



Penaeus vannamei challenged with a *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain shows hepatopancreatic microbiota imbalance

Penaeus vannamei desafiado con una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* NHPA muestra un desequilibrio de la microbiota hepatopancreática

Lina Angélica Zermeño-Cervantes¹, Aarón Barraza², Herson Antonio González-Ponce³, Sergio Francisco Martínez-Díaz¹, César Salvador Cardona-Félix^{4*}

¹ Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, 23096 La Paz, Baja California Sur, Mexico.

² CONACYT-CIBNOR, 23096 La Paz, Baja California Sur, Mexico.

³ Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, The Netherlands.

⁴ CONACYT-Instituto Politécnico Nacional-CICIMAR, 23096 La Paz, Baja California Sur, Mexico.

* Corresponding author. E-mail: cscardonafe@conacyt.mx

ABSTRACT. White shrimp, *Penaeus vannamei*, farming represents one of the most important aquaculture activities in the world with a high growth rate. However, intensification processes induce negative side effects on the health of the organism, associated with a dysbiosis phenomenon. Consequently, illnesses, mainly attributable to *Vibrio* genus bacteria, have been reported in shrimp ponds. Studying the diversity and ecology of the associated bacteria in aquaculture systems is essential to prevent and control diseases. Therefore, the present study analyzes the bacterial load and microbial population variation in *P. vannamei* hepatopancreases infected with a pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strain (so-called CVP2) associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) under controlled conditions. The results showed an important change in the microbial community structure of the *P. vannamei* hepatopancreas. Furthermore, the presence of the *Vibrio* genus considerably increased and clearly dominated compared with the control. Dysbiosis of the hepatopancreatic microbiota and constrictions in the hepatopancreatic tubules (characteristic signs of in the early stage of AHPND) could be observed before the visible manifestation of the disease.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, AHPND, metagenomic analysis, shrimp farming, dysbiosis.

RESUMEN. El cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* representa una de las actividades acuícolas más importantes del mundo, con una elevada tasa de crecimiento. Sin embargo, el proceso de intensificación induce efectos secundarios negativos sobre la salud del organismo, relacionados con un fenómeno de disbiosis. Como consecuencia, se han reportado enfermedades en los estanques de camarón atribuibles principalmente a las bacterias del género *Vibrio*. Es fundamental estudiar la diversidad y ecología de las bacterias asociadas en los sistemas acuícolas para prevenir y controlar enfermedades. Por ello, el presente estudio analiza la carga bacteriana y la variación de la población microbiana en el hepatopáncreas de *P. vannamei* infectado con una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* (denominada CVP2) asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (NHPA) en condiciones controladas. Los resultados mostraron un cambio importante en la estructura de la comunidad microbiana del hepatopáncreas de *P. vannamei*. Además, la presencia del género *Vibrio* aumentó considerablemente y fue claramente dominante en comparación con el control. Los resultados muestran una disbiosis de la microbiota del hepatopáncreas y constricciones en los túbulos hepatopancreáticos (signos característicos de la NHPA en etapas tempranas) antes de la manifestación visible de la enfermedad.

Palabras clave: *Vibrio parahaemolyticus*, NHPA, análisis metagenómico, cultivo de camarón, disbiosis.



INTRODUCTION

Aquaculture has been the fastest-growing food production system in the world. In particular, shrimp farming represents one of the most important aquaculture activities and has been established as an important socioeconomic promoter (Ahmed and Thompson 2019). Shrimp farming conditions promote the rapid growth of opportunistic bacteria, such as many *Vibrio* species, which naturally live in coastal and estuarine waters, in sediments, and as part of the microbiota of cultured organisms (in gills, intestines, hepatopancreas, and shrimp cuticle) (Jiravanichpaisal et al. 1994). These species generally do not represent a risk for shrimp production (Gómez-Jiménez et al. 2005). However, the intensification of production systems increases the stress of the organisms and leads to water eutrophication; this promotes the proliferation of these opportunistic bacteria, which can colonize the digestive system and cause diseases in cultured animals (Johnson 2013, Engle et al. 2017).

Due to their high incidence in shrimp aquaculture, the most important losses due to pathogenic bacteria are related to *Vibrio* species, whose infections are generally known as vibriosis (Flegel 2012, de Souza-Valente and Wan 2021). Initially, this infection can be limited to specific tissues; nevertheless, in organisms with compromised immune systems, it turns rapidly into a systemic disease that can cause death (Jiravanichpaisal et al. 1994, Gómez-Jiménez et al. 2005).

Vibrio parahaemolyticus is a pathogen that infects *Penaeus vannamei* cultures, causing mortality events by vibriosis (Hong et al. 2016, Raja et al. 2017) and the acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) (Han et al. 2015). AHPND is an emergent disease characterized by a high mortality rate, which in some cases reaches 100% of the shrimp population in pond outbreaks during the first 30 days after its appearance (de Schryver et al. 2013). Identifying the disease signs in an early stage, which in some cases is asymptomatic, is crucial to be able to apply a timely treatment and counteract its progress. However, this can be complex under production conditions because certain signs may correspond not only to disease conditions but also to typical growth behaviors or stress (Egan and Gardiner 2016). Egan and Gardiner (2016) proposed that many diseases in marine systems (natural and cultured populations) must be studied from the point of view of microbial dysbiosis (a microbial community shift that has a negative impact on the host), similar to what has been demonstrated in several chronic human diseases (Vijay and Valdes 2022). Stressors in the environment and the weakening of the host's defense system can lead to the proliferation of opportunistic pathogens from the surrounding environment, which promote the development of the disease.

Currently, one of the most effective and precise tools to analyze microbial communities used in the aquaculture sector is the metagenomic analysis. Metagenomics is an

INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha sido el sistema de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo. En particular, el cultivo de camarón representa una de las actividades acuícolas más importantes y se ha establecido como un importante promotor socioeconómico (Ahmed y Thompson 2019). Las condiciones de cultivo de camarón permiten el rápido crecimiento de bacterias oportunistas, como lo son muchas especies de *Vibrio*, que habitan naturalmente en las aguas costeras y estuarinas, en los sedimentos y como parte de la microbiota de los organismos cultivados (en las branquias, el intestino, el hepatopáncreas y la cutícula de camarón) (Jiravanichpaisal et al. 1994). En general, estas especies no representan ningún riesgo para la producción de camarón (Gómez-Jiménez et al. 2005). Sin embargo, la intensificación de los sistemas de producción aumenta el estrés de los organismos y conduce a la eutrofización del agua; esto promueve la proliferación de estas bacterias oportunistas que pueden colonizar el sistema digestivo y causar enfermedades en los animales cultivados (Johnson 2013, Engle et al. 2017).

Debido a su alta incidencia en la acuicultura de camarón, las pérdidas más importantes debidas a bacterias patógenas están relacionadas con especies de *Vibrio*, cuyas infecciones se conocen generalmente como vibriosis (Flegel 2012, de Souza-Valente y Wan 2021). Inicialmente, esta infección puede limitarse a tejidos específicos; sin embargo, en organismos con el sistema inmune comprometido, se convierte rápidamente en una enfermedad sistémica que puede causar la muerte (Jiravanichpaisal et al. 1994, Gómez-Jiménez et al. 2005).

Vibrio parahaemolyticus es un patógeno que infecta los cultivos de *Penaeus vannamei*, causando eventos de mortalidad por vibriosis (Hong et al. 2016, Raja et al. 2017) y la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (NHPA) (Han et al. 2015). La NHPA es una enfermedad emergente caracterizada por una alta tasa de mortalidad, la cual en algunos casos alcanza el 100% de la población de camarones en brotes en estanques durante los primeros 30 días tras su aparición (de Schryver et al. 2013). Identificar los signos de la enfermedad en una etapa temprana, que en algunos casos es asintomática, es crucial para poder aplicar un tratamiento oportuno y contrarrestar su avance. Sin embargo, en condiciones de producción, esta situación se complica porque ciertos signos pueden corresponder no solo a condiciones de enfermedad sino también a comportamientos típicos de crecimiento o estrés (Egan y Gardiner 2016). Egan y Gardiner (2016) propusieron que muchas enfermedades en sistemas marinos (poblaciones naturales y cultivadas) deben estudiarse desde el punto de vista de la disbiosis microbiana (un cambio en la comunidad microbiana que tiene un impacto negativo en el hospedero), similar a lo que se ha demostrado en varias enfermedades crónicas humanas (Vijay y Valdés 2022). Los factores de estrés ambiental y el debilitamiento del sistema de defensa del hospedador pueden conducir a

emerging tool in aquaculture that helps to understand the relationship between the host, microbiota, and pathogens by monitoring the microbial diversity dynamics in production systems (Tello et al. 2019). Although AHPND is known to be caused by the pathogenic *V. parahaemolyticus* and other *Vibrio* species hosting the binary toxin gene PirAB, microbiome alterations in the digestive tract of *P. vannamei* during AHPND outbreaks only recently began to be studied (Chen et al. 2017, Cornejo-Granados et al. 2017). In particular, the analysis of the microbial structure in the digestive tract of shrimp could serve as a timely diagnosis of dysbiosis before the macroscopic signs of AHPND are observed; this would allow timely management actions to be implemented and preparations to be made to administer a subsequent treatment, if necessary. Therefore, the present study performed a metagenomic analysis on the microbial community structures of *P. vannamei* hepatopancreases after a challenge with a pathogenic strain of *V. parahaemolyticus* associated with AHPND under controlled conditions. The results showed an important change of the microbial community structure in *P. vannamei* hepatopancreases and constrictions in the hepatopancreatic tubules (a characteristic sign of the AHPND in early stages) before the visible manifestation of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The management of the organisms was carried out following the Official Mexican Standard NOM-030-PESC-2000 that establishes the requirements to determine the presence of viral diseases in live and dead aquatic crustaceans, their products or by-products in any presentation, and *Artemia* (*Artemia* spp.) for their introduction into the national territory and mobilization in it

Bacterial strains

Zermeño-Cervantes et al. (2018) isolated the *V. parahaemolyticus* CVP2 strain (subsequently called CVP2) used in the present study from an AHPND outbreak in Sinaloa, Mexico, and previously reported on it. As a control treatment, *Escherichia coli* genotype DH5 α (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA) was used as a halotolerant and non-pathogenic bacterium for *P. vannamei*. CVP2 was cultured in marine agar (5.000 g of peptone, 1.000 g of yeast extract, 0.002 g of Fe₃SO₄, and 17.000 g of agar per liter of seawater) at 35 °C for 24 h. The *E. coli* strain DH5 α was cultured in Luria-Bertani (10.000 g of tryptone, 10.000 g of NaCl, and 5.000 g of yeast extract per liter of distilled water) at 37 °C for 24 h. The bacterial suspensions from both strains were prepared at OD₅₈₅ of 1.0 (approximately 1.8 × 10⁹ colony forming units [CFU · mL⁻¹] in saline solution NaCl 2.5% [w/v]).

la proliferación de patógenos oportunistas del entorno que promueven el desarrollo de la enfermedad.

Actualmente, una de las herramientas más eficaces y precisas para el análisis de la comunidad microbiana aplicada al sector acuícola es el análisis metagenómico. La metagenómica es una herramienta emergente en acuicultura que ayuda a comprender la relación entre el hospedero, la microbiota y los patógenos mediante el seguimiento de la dinámica de la diversidad microbiana en los sistemas de producción (Tello et al. 2019). Aunque se sabe que la NHPA es causada por el patógeno *V. parahaemolyticus* y otras especies de *Vibrio* que albergan el gen de la toxina binaria PirAB, las alteraciones del microbioma en el tracto digestivo de *P. vannamei* durante los brotes de NHPA comenzaron a estudiarse recientemente (Chen et al. 2017, Cornejo-Granados et al. 2017). En particular, el análisis de la estructura microbiana del tracto digestivo en camarones podría servir como diagnóstico oportuno de disbiosis antes de observar los signos macroscópicos de la NHPA. Esto permitiría implementar acciones de manejo oportunas y estar preparados, de ser necesario, para administrar un tratamiento posterior. Por ello, en el presente estudio se realizó un análisis metagenómico de la estructura de la comunidad microbiana del hepatopáncreas de *P. vannamei* tras un desafío con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* asociada a NHPA en condiciones controladas. Los resultados mostraron un cambio importante de la estructura de la comunidad microbiana en el hepatopáncreas de *P. vannamei* y constricciones en los túbulos hepatopancreáticos (un signo característico de la NHPA en etapas tempranas), antes de la manifestación visible de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración de ética

El manejo de los organismos se realizó siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-030-PESC-2000 que establece los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales en crustáceos acuáticos vivos y muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación, y *Artemia* (*Artemia* spp.) para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo.

Cepas bacterianas

Zermeño-Cervantes et al. (2018) aislaron la cepa de *V. parahaemolyticus* CVP2 (en adelante denominada CVP2) utilizada en el presente estudio de un brote de NHPA en Sinaloa, México, y reportaron sobre ella previamente. Como tratamiento de control, se utilizó *Escherichia coli* genotipo DH5 α (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, EE. UU.) como bacteria halotolerante y no patógena para *P. vannamei*. La CVP2 se cultivó en agar marino (5.000 g de peptona, 1.000 g de extracto de levadura, 0.002 g de Fe₃SO₄ y 17.000 g de agar por litro de agua de mar) a 35 °C durante 24 h. La

PirA toxin gene verification by single-step polymerase chain reaction

The presence of the encoding gene for the PirA toxin (AP3; associated with AHPND) was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) amplification using genomic DNA isolated from the CVP2 strain. The AP3 method for DNA amplification was carried out as described by Sirikharin et al. (2015). The PCR amplification products were sequenced by MacroGen (Seoul, South Korea).

Organism management and maintenance

The organisms were obtained from a shrimp farm in La Paz, Baja California Sur, Mexico. To acclimate the organisms, shrimp were kept for 3 weeks in filtered and ultraviolet-treated seawater, with temperature and salinity of 28 °C and 35, respectively, and constant aeration. The organisms were fed twice per day (09:00 and 17:00 h) in a proportion of 5% of the total shrimp biomass weight per container with the commercial food formulated with >35% protein, 5% lipids, <12% humidity, and <4% ash. The average weight of the organisms was 2.5–2.9 g.

Challenge test for *Penaeus vannamei*

An experimental design consisting of 2 treatments (organisms challenged with CVP2 and *E. coli*) and one negative control (without treatment [NC]) was performed in triplicate. After organisms were acclimated, bioassays were performed in 4-L experimental units with seawater with salinity of 35 ppt, which had been previously filtered and sterilized, with 10 shrimp per experimental unit. The organisms were washed by immersion in sterile seawater to reduce surface bacteria, and then placed into the experimental units. Food was impregnated with 20 mL of bacterial suspensions (CVP2 or DH5 α). The organisms were kept at a controlled temperature of 28 °C, with constant aeration, and with no water exchange for biosafety reasons (to prevent the release of the pathogen). On the fifth day of treatment, after 5 h of the first feeding, 4 organisms of each experimental unit were sacrificed to dissect the hepatopancreas and evaluate the load of *V. parahaemolyticus*. The survival rate and visual signs of the disease were recorded daily.

Dissection and tissue sample preparation

The organisms were sacrificed by thermal shock induced by freezing for 10 min and dissected in a sterile area. The exoskeleton was removed by a longitudinal cut from head to telson. Using a phase contrast microscope (Axio Scope.A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), hepatopancreas samples were obtained from a dorsal transversal cut and embedded in isotonic solution (0.85%) for fresh analysis, according to

cepa de *E. coli* DH5 α se cultivó en Luria-Bertani (10.000 g de triptona, 10.000 g de NaCl y 5.000 g de extracto de levadura por litro de agua destilada) a 37 °C durante 24 h. Las suspensiones bacterianas de ambas cepas se prepararon a una DO₅₈₅ de 1.0 (aproximadamente 1.8×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC·mL⁻¹] en solución salina NaCl 2.5% [p/v]).

Verificación del gen de la toxina PirA mediante reacción en cadena de la polimerasa de punto final

La presencia del gen codificante de la toxina PirA (AP3, asociada a NHPA) se confirmó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando ADN genómico aislado de la cepa CVP2. El método AP3 para la amplificación del ADN se llevó a cabo según lo descrito por Sirikharin et al. (2015). Los productos de la amplificación por PCR fueron secuenciados por MacroGen (Seúl, Corea del Sur).

Manejo y mantenimiento de los organismos

Los organismos se obtuvieron de una granja camaronesa en La Paz, Baja California Sur, México. Los camarones fueron aclimatados por 3 semanas en agua de mar filtrada y tratada con radiación ultravioleta a 28 °C, 35 de salinidad y con aireación constante. Los organismos fueron alimentados 2 veces al día (09:00 y 17:00 h), en una proporción del 5% del peso total de la biomasa de los camarones por recipiente, con el alimento comercial formulado con >35% de proteína, 5% de lípidos, <12% de humedad y <4% de cenizas. El peso medio de los organismos fue de 2.5–2.9 g.

Prueba de desafío para *Penaeus vannamei*

Se realizó un diseño experimental que consistió en 2 tratamientos (organismos desafiados con CVP2 y *E. coli*) y un control negativo (sin tratamiento [CN]) por triplicado. Tras la aclimatación de los organismos, los bioensayos se realizaron en unidades experimentales de 4 L con agua de mar a 35 ppm de salinidad, previamente filtrada y esterilizada, con 10 camarones por unidad experimental. Los organismos se lavaron por inmersión en agua de mar estéril para reducir las bacterias superficiales y luego se colocaron en las unidades experimentales. El alimento fue impregnado con 20 mL de las suspensiones bacterianas (CVP2 o DH5 α). Los organismos se mantuvieron a una temperatura controlada de 28 °C, con aireación constante y sin recambios de agua por razones de bioseguridad (evitar la liberación del patógeno). En el quinto día de tratamiento, tras 5 h de la primera administración de alimento, se sacrificaron 4 organismos de cada unidad experimental para realizar la disección del hepatopáncreas y evaluar la carga de *V. parahaemolyticus*. Se registraron diariamente la tasa de supervivencia y los signos visuales de la enfermedad.

the methodology established by Cuéllar-Anjel (2014). For the bacterial load and metagenomic analyses, tissues were homogenized individually in 500 μL of sterile saline solution using a tissue disruptor DragonLab model D-160 (DLAB Scientific Inc., Riverside, CA, USA).

Bacterial load analyses

Samples from organisms challenged with the CVP2 strain and those from NC were plated on selective media to corroborate the increase of *V. parahaemolyticus* in the hepatopancreas after oral administration in contrast to NC without treatment. To discard the initial presence of *Vibrio* species, a preliminary determination of the bacterial load in the organisms and food was performed before the experimental procedure. To estimate the load of *V. parahaemolyticus*, 100 μL of each homogenized hepatopancreas was diluted to 1×10^{-4} in a sterile saline solution and spread on thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar plates in triplicate. The TCBS agar plates were incubated at 35 °C for 12 h, and green colonies were counted. The CFUs per hepatopancreas that resulted from the CVP2 treatment and NC were statistically analyzed using the total CFUs of all the dilutions with the *t.test* function of the R statistical programming language (www.r-project.org). The results were visualized in a bar plot with the package ‘ggplot2’ (Wickham 2011).

DNA extraction and metagenomic analysis

The composition of the microbiota associated with shrimp hepatopancreases was determined by a metagenomic analysis using 16S gene rDNA sequencing (V4 region). Total DNA, either from the NC, the *V. parahaemolyticus* treatment (CVP2, administered in the diet), or the *E. coli* treatment (Eco, administered in the diet), was directly obtained from the mash of hepatopancreases by using the Miniprep Fungal/Bacterial Quick-DNA kit (Zymo Research, CA, USA) and pooled according to each treatment. The total extracted DNA was sent to the Next Generation Sequencing Core at Argonne National Laboratory (Argonne, IL, USA) for amplicon sequencing. Briefly, the microbial 16S rDNA gene V4 regions were amplified using the primer set 515F and 806R following the method described by Kozich et al. (2013). We used the Illumina MiSeq 500-cycle kit (Illumina, San Diego, CA) and an Illumina MiSeq sequencer for the paired-end sequencing (150 \times 150 bp) of 16S rDNA gene amplicons of the V4 regions. Primer trimmed pair-ended bacterial 16S rDNA gene sequences were merged using the Ribosomal Database Project (RDP) paired-end reads assembler. Assembled sequences with an expected maximum error adjusted Q score less than 25 ($Q > 25$) over the entire sequence were eliminated (Cole et al. 2014). VSEARCH (v2.4.3, 64 bit) was used to remove chimeras *de novo*, followed by removing chimeras by reference using the RDP 16S rDNA gene (Rognes et al. 2016). High quality and chimera-free sequences were

Discción y preparación de muestras de tejido

Los organismos se sacrificaron mediante choque térmico inducido por congelación durante 10 min y se diseccionaron en una zona estéril. El exoesqueleto se retiró mediante un corte longitudinal desde la cabeza hasta el telson. Usando un microscopio de contraste de fases (Axio Scope.A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), se obtuvieron muestras de hepatopáncreas a partir de un corte transversal dorsal y se embebieron en una solución isotónica (0.85%) para su análisis en fresco, según la metodología establecida por Cuéllar-Anjel (2014). Para analizar la carga bacteriana y realizar los análisis metagenómicos, los tejidos se homogeneizaron individualmente en 500 μL de solución salina estéril utilizando un disruptor de tejidos DragonLab modelo D-160 (DLAB Scientific Inc., Riverside, CA, EE.UU.).

Análisis de la carga bacteriana

Las muestras de los organismos desafiados con la cepa CVP2 y las del control negativo se sembraron en medios selectivos para corroborar el aumento de *V. parahaemolyticus* en el hepatopáncreas después de la administración oral, en contraste con el control negativo sin tratamiento. Se realizó una determinación preliminar de la carga bacteriana tanto de los organismos como del alimento antes del procedimiento experimental para descartar la presencia inicial de especies de *Vibrio*. La estimación de la carga de *V. parahaemolyticus* se realizó con 100 μL de cada hepatopáncreas homogeneizado, diluido a 1×10^{-4} en solución salina estéril y sembrado en placas de agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) por triplicado. Las placas de agar TCBS se incubaron a 35 °C durante 12 h y se contaron las colonias verdes. Para los análisis estadísticos de las UFC por hepatopáncreas resultantes de los tratamientos CVP2 y CN se tomaron las UFC totales de todas las diluciones y se usó la función *t.test* del lenguaje de programación estadística R (www.r-project.org). Los resultados se visualizaron en un gráfico de barras con el paquete ggplot2 (Wickham 2011).

Extracción de ADN y análisis metagenómico

La composición de la microbiota asociada al hepatopáncreas de los camarones se determinó mediante un análisis metagenómico a través de la secuenciación del gen de ADNr 16S (región V4). El ADN total, ya fuera del control negativo (CN, no sometido a tratamiento), del tratamiento con *V. parahaemolyticus* (CVP2, administrado en la dieta) o del tratamiento con *E. coli* (Eco, administrado en la dieta), se obtuvo directamente del macerado del hepatopáncreas utilizando el kit Miniprep Fungal/Bacterial Quick-DNA (Zymo Research, CA, EE.UU.) y se mezcló según cada tratamiento. El ADN total extraído se envió al Next Generation Sequencing Core del Laboratorio Nacional Argonne (Argonne, IL, EE.UU.), para la secuenciación de amplicones. Brevemente,

then clustered at 97% sequence similarity using CD-HIT (v4.6.1) and the RDP Classifier with a confidence cutoff at 50%, which resulted in the identification of unique operational taxonomic units (OTU) and their abundance in each sample (Wang et al. 2007, Bonder et al. 2012, Fu et al. 2012, Chen et al. 2013). The resulting OTU table was then processed to be analyzed with R programming language using a variety of packages and custom scripts (www.r-project.org). The alpha biodiversity indices Chao1, Shannon, and Simpson were estimated with the *vegan* package (Oksanen et al. 2014). The distributions of the bacterial community structure were subsequently tested for significant differences between the different treatments using the Kruskal–Wallis test. To assess differences between the bacterial community structures from the hepatopancreas samples of the CVP2, Eco, and NC treatments, a principal component analysis (PCA) was performed using the *prcomp* function with the *ggfortify* package (Oksanen et al. 2014, Coleman-Derr et al. 2016, Castañeda and Barbosa 2017).

RESULTS

No death of any organism in any of the different experimental groups was recorded within 5 days of the bioassay, thus, the survival rate in this experiment was 100%. In addition, the organisms did not show swimming difficulties, lethargy, empty intestines, or pale hepatopancreases after the treatments. A direct fresh analysis from shrimp hepatopancreatic tubules challenged with strains of *V. parahaemolyticus* (CVP2) and *E. coli* (Eco) was performed to determine some presumptive morphological alterations related to AHPND. As expected, the NC showed no alterations of the hepatopancreatic tubules (Fig. 1a). The Eco treatment did not induce morphological alterations neither compromised the hepatopancreatic tubule integrity of *P. vannamei* (Fig. 1b). However, the CVP2 treatment group showed a hepatopancreatic tubular constriction, which is a presumptive characteristic of the acute stage of AHPND (Fig. 1c).

As a first approach to assess the CVP2 strain load in shrimp hepatopancreases after the bacterial challenge, the CFUs from this organ were estimated using a selective media (TCBS) for the *Vibrio* genus. The results showed a significant ($P = 0.0004438$) increase in CVP2 load of more than one order of magnitude (>10-fold) compared to the NC (Fig. 2).

To infer whether the structure of the bacterial community in the hepatopancreas was affected by the treatments, a next-generation sequencing (NGS) coupled with 16S rDNA metagenomic exploratory analysis was performed. The bacterial community in hepatopancreases with the CVP2 and Eco treatments showed a marked and characteristic structure that was dominated by a particular genus (Fig. 3a). The samples of hepatopancreases with the CVP2 treatment were dominated by the *Vibrio* genus. Hepatopancreases in the Eco treatment group were dominated by *Acinetobacter* and

las regiones V4 del gen de ADNr 16S microbiano se amplificaron utilizando el conjunto de cebadores 515F y 806R siguiendo el método descrito por Kozich et al. (2013). Utilizamos el kit Illumina MiSeq 500-cycle (Illumina, San Diego, CA) y un secuenciador Illumina MiSeq para la secuenciación de lectura pareada (150 × 150 pb) de los amplicones de las regiones V4 del gen del ADNr 16S. Las secuencias pareadas de los genes bacterianos de ADNr 16S recortadas de los cebadores fueron fusionadas utilizando el ensamblador de lecturas pareadas (Paired-end Reads Assembler) del Proyecto de Base de Datos Ribosomal (Ribosomal Database Project [RDP]). Se eliminaron las secuencias ensambladas con una puntuación Q ajustada de error máximo esperado inferior a 25 ($Q > 25$) (Cole et al. 2014). Se utilizó VSEARCH (v2.4.3, 64 bits) para eliminar quimeras *de novo*, seguido de la eliminación de quimeras por referencia utilizando el gen de ADNr 16S RDP (Rognes et al. 2016). A continuación, las secuencias de alta calidad y libres de quimeras se agruparon con una similitud de secuencia del 97% mediante CD-HIT (v4.6.1) y RDP Classifier con un corte de confianza del 50%, lo que dio lugar a la identificación de unidades taxonómicas operativas (UTO) únicas y su abundancia en cada muestra (Wang et al. 2007, Bonder et al. 2012, Fu et al. 2012, Chen et al. 2013). La tabla de las UTO resultante se procesó a continuación para ser analizada con el lenguaje de programación R utilizando diversos paquetes y scripts personalizados (www.r-project.org). Los índices de biodiversidad alfa Chao1, Shannon y Simpson se estimaron con el paquete *vegan* (Oksanen et al. 2014). Posteriormente, se comprobó si las distribuciones de la estructura de la comunidad bacteriana presentaban diferencias significativas entre los distintos tratamientos mediante la prueba de Kruskal–Wallis. Para evaluar las diferencias entre las estructuras de las comunidades bacterianas de las muestras de los tratamientos CVP2, Eco y CN, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando la función *prcomp* con el paquete *ggfortify* (Oksanen et al. 2014, Coleman-Derr et al. 2016, Castañeda y Barbosa 2017).

RESULTADOS

No se registró la muerte de ningún organismo en ninguno de los grupos experimentales en los 5 días posteriores al bioensayo, por lo que la tasa de supervivencia en este experimento fue del 100%. Además, los organismos no mostraron dificultades para nadar, letargo, intestino vacío ni hepatopáncreas pálido después de los tratamientos. Se realizó una preparación en fresco de los túbulos hepatopancreáticos de los camarones desafiados con las cepas de *V. parahaemolyticus* (CVP2) y *E. coli* (Eco) para determinar algunas alteraciones morfológicas presuntivas relacionadas con la NHPA. Como se esperaba, el CN no mostró alteraciones de los túbulos hepatopancreáticos (Fig. 1a). El tratamiento Eco no indujo alteraciones morfológicas ni comprometió la integridad de los túbulos hepatopancreáticos de *P. vannamei* (Fig. 1b). El grupo con el tratamiento con CVP2 mostró una constricción

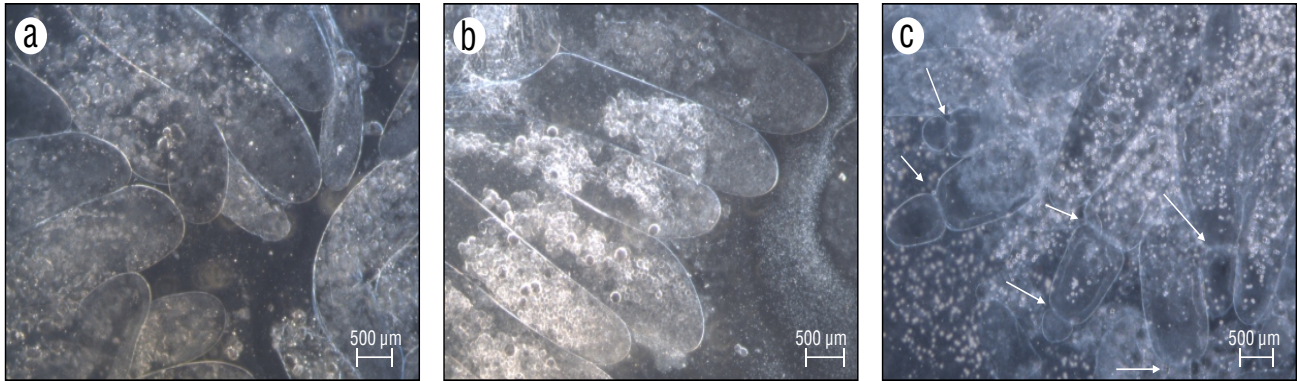


Figure 1. Fresh preparation of hepatopancreatic tubules from *Penaeus vannamei*. Hepatopancreatic tubules from (a) organisms without treatment (NC) and (b) organisms challenged with *Escherichia coli* DH5α strain (Eco). (c) Hepatopancreatic tubule constriction (highlighted with arrows) from organisms challenged with the *Vibrio parahaemolyticus* CVP2 strain (CVP2). 100× magnification.

Figura 1. Preparación en fresco de los túbulos hepatopancreáticos de *Penaeus vannamei*. Túbulos hepatopancreáticos de (a) organismos sin tratamiento (NC) y (b) organismos desafiados con la cepa *Escherichia coli* DH5α (Eco). (c) Constricción de los túbulos hepatopancreáticos (resaltada con flechas) de organismos desafiados con la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* CVP2 (CVP2). Aumento 100×.

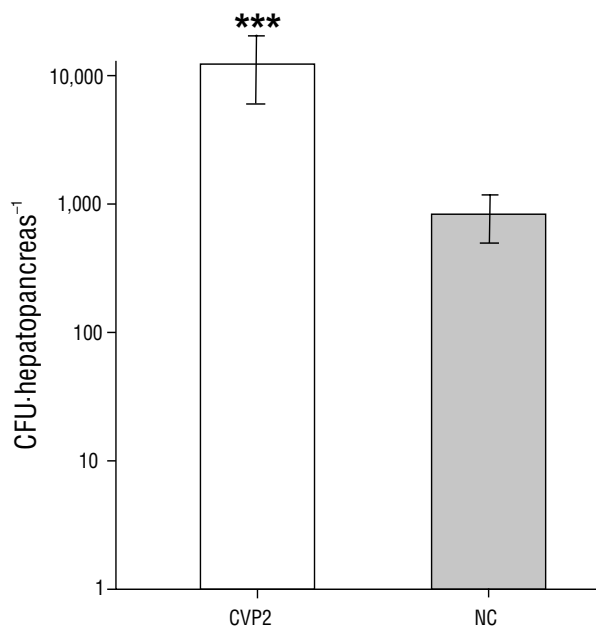


Figure 2. *Vibrio parahaemolyticus* load estimation expressed as colony forming units (CFU) per hepatopancreas from organisms challenged with *V. parahaemolyticus* CVP2 strain and from non-challenged organisms (negative control [NC]). The results are represented as mean ± standard deviation. Statistical significance was determined using a Student unpaired, 2-tailed *t* test (***, $P < 0.001$).

Figura 2. Estimación de la carga de *Vibrio parahaemolyticus* expresada como unidades formadoras de colonia (CFU) por hepatopancreas, a partir de organismos desafiados con la cepa CVP2 de *V. parahaemolyticus* y de organismos no desafiados (control negativo [NC]). Los resultados se representan como media ± desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante una prueba *t* de Student no pareada de 2 colas (***, $P < 0.001$).

tubular hepatopancreática, la cual es una característica presuntiva de la fase aguda de la NHPA (Fig. 1c).

Como primera aproximación para evaluar la carga de la cepa CVP2 en el hepatopáncreas de los camarones tras el desafío, las UFC de este órgano se estimaron utilizando un medio selectivo (TCBS) para el género *Vibrio*. Los resultados mostraron un aumento significativo ($P = 0.0004438$) en la carga de CVP2 de más de un orden de magnitud (>10 veces), en comparación con el CN (Fig. 2).

Para inferir si los diferentes tratamientos afectaron a las estructuras de la comunidad bacteriana del hepatopáncreas, se realizó la secuenciación de nueva generación (SNG), junto con el análisis exploratorio metagenómico del ADNr 16S. Las comunidades bacterianas en los hepatopáncreas con los tratamientos CVP2 y Eco mostraron una estructura marcada y característica, dominada por un género en particular (Fig. 3a). En la muestra de los hepatopáncreas con CVP2 predominó el género *Vibrio*. En la muestra de los hepatopáncreas con Eco predominaron los géneros *Acinetobacter* y “*Candidatus Pelagibacter*”. La muestra de los hepatopáncreas en el CN mostró una diversidad más rica y mayor que la observada en la muestra de los hepatopáncreas con CVP2 y Eco: *Roseibacillus*, *Lewinella*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Algoriphagus* y *Formosa* se encontraron entre los géneros más abundantes sin una dominancia obvia para ningún género en particular (Fig. 3a). Para apoyar nuestras observaciones, se realizaron estimaciones de diversidad alfa para las muestras CVP2, Eco y CN. La estimación de la riqueza (índice de Shannon) reveló que la muestra CN tuvo la mayor riqueza bacteriana y la muestra CVP2 la menor; esto se relacionó con la dominancia del género *Vibrio* en la muestra CVP2 (Tabla 1, Fig. 3a). Resultó interesante que los índices de diversidad alfa mostraron un rango estrecho para las UTO observadas e incluso una similitud estrecha entre las muestras CVP2 y CN

'*Candidatus Pelagibacter*' genera. Compared to the diversity observed in the samples from hepatopancreases with CVP2 and Eco treatments, the diversity in hepatopancreases in the NC was richer and higher: *Roseibacillus*, *Lewinella*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Algoriphagus*, and *Formosa* were among the most abundant genera with no obvious dominance for any particular genus (Fig. 3a). To support our observations, alpha-diversity estimations were performed for CVP2, Eco, and NC samples. The richness estimation (Shannon index) showed that the NC sample had the highest bacterial richness and the CVP2 sample the lowest; this was associated with the dominance of the *Vibrio* genus in the CVP2 sample (Table 1, Fig. 3a). Interestingly, the alpha-diversity indices showed a narrow range for the OTUs observed

(índice de Chao1; Tabla 1). El índice de Simpson reveló que todas las muestras eran uniformes y que estaban compuestas mayoritariamente por organismos bacterianos; el índice de cobertura de Good mostró que la cobertura de secuencias de todas las muestras se realizó correctamente (>99%; Tabla 1). La prueba de Kruskal-Wallis mostró que los tratamientos ejercieron un efecto significativo ($P = 0.0002927$) sobre la distribución de la estructura de la comunidad bacteriana. Además, el ACP mostró que no hubo ninguna agrupación entre todas las muestras; estas se localizaron en un cuadrante diferente en el gráfico del ACP (Fig. 3b). El APC coincidió con la determinación de las estructuras de la comunidad bacteriana (Fig. 3a), las estimaciones de la diversidad alfa (Tabla 1) y los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis.

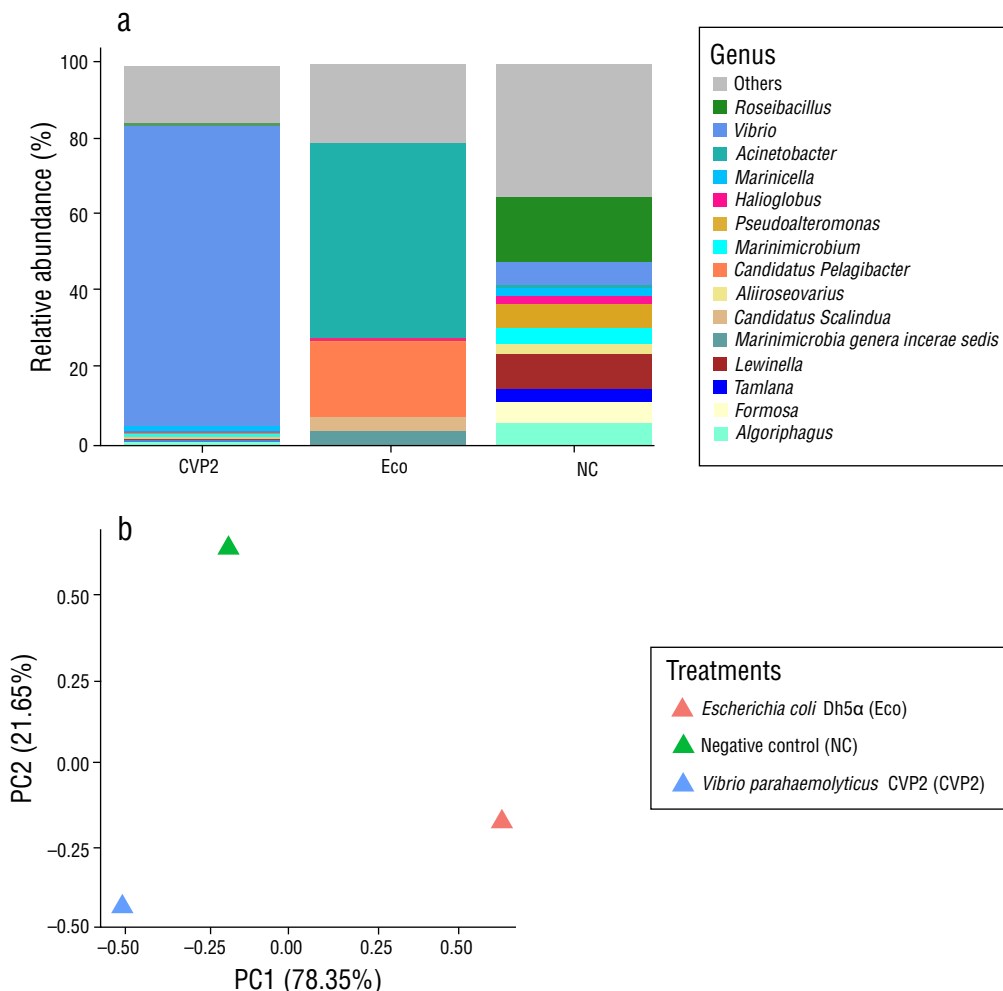


Figure 3. Metagenomic analysis through 16S rDNA gene sequencing (V4 region) from shrimp hepatopancreases challenged with the *Vibrio parahaemolyticus* CVP2 strain. **(a)** Shrimp hepatopancreas bacterial community structures compared between treatments (CVP2, Eco, and NC) at genus taxonomic level; **(b)** Principal components analysis of the bacterial community structures between treatments: *V. parahaemolyticus* (CVP2), *Escherichia coli* (Eco), and organisms without treatment (NC).

Figura 3. Análisis metagenómico mediante la secuenciación del gen de ADNr 16S (región V4) del hepatopáncreas de camarones desafiados con la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* CVP2. **(a)** Estructuras de las comunidades bacterianas del hepatopáncreas de camarón comparadas entre tratamientos (CVP2, Eco y NC) al nivel taxonómico de género. **(b)** Análisis de componentes principales de las estructuras de las comunidades bacterianas entre tratamientos: *V. parahaemolyticus* (CVP2), *Escherichia coli* (Eco) y organismos sin tratamiento (NC).

Table 1. Alpha diversity estimations. Organisms challenged with the CVP2 strain (CVP2). Organisms challenged with the *Escherichia coli* strain (Eco). Organisms without treatment (NC).

Tabla 1. Estimaciones de diversidad alfa. Organismos desafiados con la cepa CVP2 (CVP2). Organismos desafiados con de la cepa de *Escherichia coli* (Eco). Organismos sin tratamiento (NC).

Sample	Treatment	Observed OTU	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	Good's coverage
CVP2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	157	185.0000000	2.886180166	0.996649153	99.57%
Eco	<i>Escherichia coli</i>	191	215.8965517	3.909714410	0.934122365	99.77%
NC	Negative Control	172	184.2500000	5.686276534	0.996264740	99.84%

and even high similarity between CVP2 and NC samples (Chao1 index; Table 1). The Simpson index showed that all the samples were uniform and composed mainly of bacterial organisms; the Good's coverage index showed that sequence coverage for all samples was properly conducted (>99%; Table 1). The Kruskal–Wallis test showed that the treatments exerted a significant effect ($P = 0.0002927$) on the distribution of the bacterial community structure. Furthermore, the PCA analysis showed no clustering among all the samples; these were located in a different quadrant in the PCA plot (Fig. 3b). The PCA was consistent with the bacterial community structures determined (Fig. 3a), the alpha-diversity estimations (Table 1), and the Kruskal–Wallis test results.

DISCUSSION

In healthy shrimp, bacteria have been shown to reside in different internal organs, even in the circulatory system, for a few minutes or hours. Therefore, bacteria are commonly found in abundances of up to 1×10^3 CFU·mL⁻¹ in the hemolymph of healthy organisms (Gomez-Gil et al. 2016). In Asia and America, several bacterial species are associated with white shrimp diseases. Nevertheless, the role of *Vibrio* has not been demonstrated as a primary agent and is considered a secondary or opportunistic pathogen (Flores-Miranda et al. 2012). *Vibrio* species are considered a component of normal microbiota in farmed organisms. However, under stress conditions or deficient management in production systems, *Vibrio* species have caused critical problems related to the appearance of related diseases (Peña-Navarro and Varela-Mejías 2015, de Souza-Valente and Wan 2021).

Under the experimental conditions used in the present study, we were able to demonstrate the presumptive signs of AHPND with the distinctive morphological alterations in shrimp hepatopancreases directly associated with this disease (Fig. 1c), as reported previously by Peña-Navarro and Varela-Mejías (2015). To determine the impact of challenging *P. vannamei* hepatopancreases with the CVP2 strain, *V. parahaemolyticus* load (CFU·hepatopancreas⁻¹) were estimated using TCBS. These results, together with the metagenomic analysis, showed the same trend for both

DISCUSIÓN

En camarones sanos, se ha demostrado que las bacterias residen en diferentes órganos internos, incluso en el sistema circulatorio, durante unos minutos u horas. Por lo tanto, frecuentemente se encuentran bacterias en cantidades de hasta 1×10^3 UFC·mL⁻¹ en la hemolinfa de organismos sanos (Gómez-Gil et al. 2016). En Asia y América, varias especies bacterianas se asocian con enfermedades del camarón blanco. Sin embargo, el papel de *Vibrio* no se ha demostrado como un agente primario y se considera un patógeno secundario u oportunista (Flores-Miranda et al. 2012). Las especies de *Vibrio* se consideran un componente de la microbiota normal en los organismos de cultivo. Sin embargo, bajo condiciones de estrés o manejo deficiente en los sistemas de producción, las especies de *Vibrio* han generado problemas críticos relacionados con la aparición de enfermedades asociadas (Peña-Navarro y Varela-Mejías 2015, de Souza-Valente y Wan 2021).

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, demostramos los signos presuntivos de la NHPA, con las alteraciones morfológicas distintivas en el hepatopáncreas de camarón (Fig. 1c) que se relacionan directamente con esta enfermedad, tal como fue reportado previamente por Peña-Navarro y Varela-Mejías (2015). Para determinar el impacto del desafío con la cepa CVP2 en el hepatopáncreas de *P. vannamei*, se estimó la carga de *V. parahaemolyticus* (UFC·hepatopáncreas⁻¹) utilizando TCBS. Estos resultados, junto con el análisis metagenómico, mostraron la misma tendencia tanto para las UFC por hepatopáncreas como para las lecturas del género *Vibrio* por muestra, con una diferencia de más de un orden de magnitud (>10 veces) para el tratamiento CVP2 en comparación con el CN (Figs. 2, 3a). Sin embargo, cabe destacar que, a través del análisis metagenómico, determinamos que las especies relacionadas con *Vibrio* no estuvieron presentes en el tratamiento Eco. Por otro lado, las especies relacionadas con el género *Escherichia* estaban presentes en el hepatopáncreas con recuentos de lecturas extremadamente bajos (solo 4 lecturas). El enfoque de utilizar un medio selectivo, como el TCBS, y estimar las UFC por hepatopáncreas es restringido para la detección de especies de *Vibrio*. Esto nos permitió determinar si

CFUs per hepatopancreas and *Vibrio* genus reads per sample with a difference of more than one order of magnitude (>10-fold) for the CVP2 treatment compared to the NC (Figs. 2, 3a). However, it is worth noting that, through the metagenomic analysis, we determined that *Vibrio*-related species were not present in the Eco treatment. On the other hand, *Escherichia*-related species were present in hepatopancreases with extremely low read counts (only 4 reads). The approach to use a selective media, such as TCBS, and estimate CFUs per hepatopancreas is restricted for *Vibrio* species detection and allowed us to determine if indeed an increase in the *V. parahaemolyticus* content (green colonies) had taken place with respect to the negative control (NC). However, more information is needed for determining a dysbiosis, since the data on the proportion of *Vibrio*-related species in the microbiota are null.

The effect of challenging *P. vannamei* with the CVP2 strain on the hepatopancreas microbial community structure was assessed through a metagenomic exploratory analysis approach. The bacterial community structure of the hepatopancreas underwent a drastic change in all the organisms supplemented with a specific bacterium (CVP2 or Eco) in the diet. The hepatopancreas samples from the CVP2-challenged organisms were dominated by the *Vibrio* genus. The Eco sample was dominated by *Acinetobacter* and “*Candidatus Pelagibacter*” genera; this shows the impact exerted by *E. coli*, which was fed into the hepatopancreas microbiota and stimulated the proliferation of other genera.

In shrimps (*P. vannamei*, *Penaeus monodon*, and *Litopenaeus stylirostris*), bacterial community structures in several organs are in a delicate balance that shifts with the development and health status of the organism (Rungrassamee et al. 2013, Cardona et al. 2016, Chen et al. 2017, Cornejo-Granados et al. 2017). The characterization of microbiota in an organism is crucial to understand the interactions and relationships between the host and its colonizing microorganisms (Gao et al. 2019).

Altogether, the data in the present study displayed an altered microbiota structure in the hepatopancreases of white shrimp (*P. vannamei*) inoculated by feeding with the *V. parahaemolyticus* strain CVP2, which is associated with AHPND. These results, obtained under controlled conditions, are consistent with field studies during AHPND outbreaks which report an enrichment in the digestive tract of species of the order Vibrionales that leads to changes in the relative abundance in the bacterial community, specifically, a simplification of microbial diversity (reduction in the Shannon index) (Chen et al. 2017, Dong et al. 2021).

On the other hand, although no signs of disease were observed at the macroscopic level or mortality during the evaluation period, at a microscopic level (Fig. 1), hepatopancreatic tubule morphology changed in the challenged organisms. This change is a characteristic sign observed in the organisms infected with AHPND-associated strains (Carrillo-Méndez et al. 2019).

efectivamente se había producido un aumento en la carga de *V. parahaemolyticus* (colonias verdes), con respecto al control negativo (CN). Sin embargo, se necesita más información para determinar una disbiosis, ya que los datos sobre la proporción de especies de *Vibrio* en la microbiota son nulos.

Se evaluó el efecto del desafío con la cepa CVP2 en la estructura de la comunidad microbiana del hepatopáncreas de *P. vannamei*, mediante un enfoque de análisis exploratorio metagenómico. Las comunidades bacterianas del hepatopáncreas del camarón experimentaron un cambio drástico en todos los organismos suplementados en la dieta con una bacteria específica (CVP2 o Eco). El género *Vibrio* dominó las muestras de los hepatopáncreas de los organismos desafiados con CVP2. En la muestra de Eco predominaron los géneros *Acinetobacter* y “*Candidatus Pelagibacter*”, lo que demuestra el impacto ejercido por *E. coli*, que se introdujo en la microbiota del hepatopáncreas y estimuló la proliferación de otros géneros.

Las estructuras de la comunidad bacteriana en varios órganos de camarones (*P. vannamei*, *Penaeus monodon* y *Litopenaeus stylirostris*) se encuentran en un delicado equilibrio que se modifica fácilmente por el desarrollo y estado de salud del camarón (Rungrassamee et al. 2013, Cardona et al. 2016, Chen et al. 2017, Cornejo-Granados et al. 2017). La caracterización de la microbiota de un organismo es crucial para comprender las interacciones y relaciones entre el hospedero y sus microorganismos colonizadores (Gao et al. 2019).

En conjunto, los datos del presente estudio mostraron una alteración de la estructura de la microbiota en el hepatopáncreas del camarón blanco (*P. vannamei*) inoculado mediante la alimentación con la cepa CVP2 de *V. parahaemolyticus*, la cual se asocia con NHPA. Estos resultados, obtenidos en condiciones controladas, concuerdan con estudios de campo durante brotes de NHPA que describen un enriquecimiento en el tracto digestivo de especies del orden Vibrionales que a su vez provoca cambios en la abundancia relativa en la comunidad bacteriana, específicamente, una simplificación de la diversidad microbiana (reducción del índice de Shannon) (Chen et al. 2017, Dong et al. 2021).

Por otro lado, aunque no se observaron signos de enfermedad a nivel macroscópico ni mortalidad durante el periodo de evaluación, a nivel microscópico la morfología de los túbulos hepatopancreáticos cambió en los organismos desafiados (Fig. 1). Este cambio es un signo característico observado en los organismos infectados con cepas asociadas a NHPA (Carrillo-Méndez et al. 2019).

El presente estudio proporciona información sobre el desequilibrio de la microbiota del hepatopáncreas de *P. vannamei* tras un desafío con una cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a NHPA en condiciones experimentales. Los resultados muestran una disbiosis de la microbiota del hepatopáncreas y alteraciones en este órgano antes de la manifestación visible de la enfermedad.

The present research study provides insight into the imbalance of microbiota in the hepatopancreas of *P. vannamei* following a challenge with an AHPND-associated *V. parahaemolyticus* strain under experimental conditions. The results show dysbiosis of the hepatopancreas microbiota and alterations in this organ before the visible manifestation of the disease. More studies are needed to establish the baseline of what would be a healthy microbial structure of shrimp digestive tracts under culture conditions to discriminate what magnitude of change in microbial structures would be a dysbiosis indicator.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Virginia Carrillo-Pineda for her technical support. Funding for this research was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT-México, grant Ciencia de Frontera 2019-549477). LAZC acknowledges the Doctoral fellowship provided by CONACYT No. 239000 and BEIFI-IPN No. 2466.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Data accessibility

All raw and processed sequencing data that support the findings of this study have been submitted and are openly available in the NCBI BioProject database under accession number PRJNA560228 at <https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA560228?reviewer=q3b4291uru02vheavlsiflmp>

REFERENCES

- Ahmed N, Thompson S. 2019. The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Sci Total Environ.* 652:851-861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.163>
- Bonder MJ, Abeln S, Zaura E, Brandt BW. 2012. Comparing clustering and pre-processing in taxonomy analysis. *Bioinformatics.* 28:2891-2897. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts552>
- Cardona E, Gueguen Y, Magré K, Lorgeoux B, Piquemal D, Pierrat F, Noguier F, Saulnier D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol.* 16:157. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>
- Carrillo-Méndez GJ, Zermeño-Cervantes LA, Venancio-Landeros AA, Díaz-Martínez SF, Cardona-Félix CS. 2019. Natural genetic transformation of *Vibrio parahaemolyticus* via pVA1 plasmid acquisition as a potential mechanism causing AHPND. *Dis Aquat Organ.* 137(1):33-40. <https://doi.org/10.3354/dao03420>
- Castañeda LE, Barbosa O. 2017. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ.* 5:e3098. <https://doi.org/10.7717/peerj.3098>
- Chen W, Zhang CK, Cheng Y, Zhang S, Zhao H. 2013. A comparison of methods for clustering 16S rRNA sequences into OTUs. *PLoS ONE.* 8:e70837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070837>
- Chen WY, Ng TH, Wu JH, Chen JW, Wang HC. 2017. Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Sci Rep.* 7:9395. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09923-6>
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, Mc Garrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42(D1):D633-D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-García C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martínez LP, Tringe SG. 2016. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytol.* 209:798-811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>
- Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, Mendoza-Vargas A, Sánchez F, Vichido R, Brieba LG, Viana MT, Sotelo-Mundo RR, Ochoa-Leyva A. 2017. Microbiome of pacific whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between wild, aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Sci Rep.* 7:11783. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w>

Se necesitan más estudios para establecer la línea base de lo que es una estructura microbiana saludable del tracto digestivo del camarón en condiciones de cultivo para discriminar qué magnitud del cambio en la estructura microbiana sería un indicador de disbiosis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Virginia Carrillo-Pineda su apoyo técnico. La investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT-México, proyecto Ciencia de Frontera 2019-549477). LAZC agradece la beca doctoral otorgada por CONACYT No. 239000 y BEIFI-IPN No. 2466.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Accesabilidad de los datos

Todos los datos de secuenciación brutos y procesados que respaldan las conclusiones de este estudio se han sometido y están disponibles abiertamente en la base de datos BioProject del NCBI con el número de acceso PRJNA560228 en <https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA560228?reviewer=q3b4291uru02vheavlsiflmp>

Traducido al español por los autores.

- Cuéllar-Anjel J. 2014. Métodos para el diagnóstico de enfermedades en camarones Penaeidos. In: Morales V, Cuéllar-Anjel (eds.), Guía técnica - patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: OIRSA. 1-52 p.
- De Schryver P, Defoirdt T, Sorgeloos P. 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? PLoS Pathog. 10:e1003919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>
- De Souza-Valente C, Wan AHL. 2021. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. J Invertebr Pathol. 181:107527. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>
- Dong P, Guo H, Wang Y, Wang R, Chen H, Zhao Y, Wang K, Zhang D. 2021. Gastrointestinal microbiota imbalance is triggered by the enrichment of *Vibrio* in subadult *Litopenaeus vannamei* with acute hepatopancreatic necrosis disease. Aquaculture. 533:736199. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736199>
- Egan S, Gardiner M. 2016. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. Front Microbiol. 7:991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00991>
- Engle CR, McNevin A, Racine P, Boyd CE, Paungkaew D, Viriyatum R, Tinh HQ, Minh HN. 2017. Economics of sustainable intensification of aquaculture: Evidence from shrimp farms in Vietnam and Thailand. J World Aquacult Soc. 48(2):227-239. <https://doi.org/10.1111/jwas.12423>
- Flegel TW. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. J Invertebr Pathol. 110(2):166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Flores-Miranda MC, Luna-González A, Campa-Córdova AI, Fierro-Coronado JA, Partida-Arangure BO, Pintado J, González-Ocampo HA. 2012. Isolation and characterization of infectious *Vibrio* sinaloensis strains from the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Rev Biol Trop. 60(2):567-576. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i2.3914>
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. 2012. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics. 28(23):3150-3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Gao S, Pan L, Huang F, Song M, Tian C, Zhang M. 2019. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 499:109-118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.026>
- Gomez-Gil B, Roque A, Rotllant G, Romalde JL, Doce A, Eggermont M, Defoirdt T. 2016. *Photobacterium sanguinicancris* sp. nov. isolated from marine animals. Anton Van Lee. 109:817-825. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0681-x>
- Gómez-Jiménez S, González-Félix ML, Perez-Velazquez M, Trujillo-Villalba DA, Esquerria-Brauer IR, Barraza-Guardado R. 2005. Effect of dietary protein level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* (Boone) raised in a zero water exchange culture system. Aquac Res. 36(9):834-840. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01287.x>
- Han JE, Tang KFJ, Tran LH, Lightner DV. 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. Dis Aquat Organ. 113:33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Hong XP, Xu D, Zhuo Y, Liu HQ, Lu LQ. 2016. Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). J Fish Dis. 39(9):1085-1097. <https://doi.org/10.1111/jfd.12441>
- Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J Aquat Anim Health. 6(1):27-35. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1994\)006<0027:HBAPOV>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1994)006<0027:HBAPOV>2.3.CO;2)
- Johnson CN. 2013. Fitness factors in *Vibrios*: a mini-review. Microb Ecol. 65(4):826-851. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0168-x>
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Appl Environ Microb. 79(17):5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MH, Wagner H. 2014. Vegan: community ecology package. R package version 2.2-0. New Zealand: R project; accessed 2019 March 08. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>
- Peña-Navarro N, Varela-Mejias A. 2015. Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrioparahaemolyticus* = Histopathological analysis in *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio parahaemolyticus*. Agron Mesoam. 26:43-53. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16892>
- Raja RA, Sridhar R, Balachandran C, Palanisammi A, Ramesh S, Nagarajan K. 2017. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Fish Shellfish Immun. 67:368-381. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.020>
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ. 4:e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Runggrasamee W, Klanchui A, Chaiyapechara S, Maibunkaew S, Tangphatsornruang S, Jiravanichpaisal P, Karoonuthaisiri N. 2013. Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. PLoS ONE. 8:e60802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060802>
- Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, Chi TD, Mavichak R, Proespraiwong P, Nuangsaeng B, Thitamadee S, Flegel TW, Sritunyaluksana K. 2015. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. PLoS ONE. 10:e0126987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>
- Tello M, Valdes N, Vargas R, Rojas J, Parra M, Gajardo G, Gonzalez A. 2019. Application of Metagenomics to Chilean Aquaculture. Metagenomics - Basics, Methods and Applications. United Kingdom: IntechOpen. 162 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86302>
- Vijay A, Valdes AM. 2022. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. Eur J Clin Nutr. 76:489-501. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00991-6>
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microb. 73(16):5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wickham H. 2011. ggplot2: ggplot2. WIREs Comp Stat. 3(2):180-185. <https://doi.org/10.1002/wics.147>
- Zermeño-Cervantes LA, Makarov R, Lomeli-Ortega CO, Martínez-Díaz SF, Cardona-Félix CS. 2018. Recombinant LysVPMS1 as an endolysin with broad lytic activity against *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to acute hepatopancreatic necrosis disease. Aquac Res. 49(4):1723-1726. <https://doi.org/10.1111/are.13577>