

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar



“Análisis comparativo de los halos de inhibición de dos probióticos comerciales en *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*.”

PROYECTO DE GRADUACION

Previa la obtención del título de:

INGENIERO ACUICULTOR CON CERTIFICADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presentada por:

Juan Carlos Mullo Guilindro

Carlos Fernando Tamayo Segarra

Guayaquil – Ecuador

Año – 2010

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios y a nuestros padres.

DEDICATORIA

Dedicado a mis Padres.

Gracias al gran esfuerzo y sacrificio que hicieron ayudándome incondicionalmente, apoyándome en todos mis objetivos planteados para mi bienestar y conformidad como hijo.

Juan Carlos.

Dedicada a mi Padre y a mi Madre,
que gracias a su esfuerzo y apoyo he logrado alcanzar
mis metas personales y académicas.

Carlos Fernando.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Jerry Landivar, M.Sc.

PRESIDENTE

Dra. Francisca Burgos

DIRECTORA

Ecuador Marcillo, M.Sc.

EVALUADOR PRINCIPAL

DECLARACION EXPRESA

La responsabilidad del contenido
de este Proyecto de Graduación
nos corresponde exclusivamente;
y el patrimonio intelectual de la misma
a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Juan Carlos Mullo Guilindro

Carlos Fernando Tamayo Segarra

RESUMEN

En este proyecto se utilizaron 2 probióticos comerciales de fácil acceso en el mercado Ecuatoriano, los cuales serán nombrados como Probiótico (A) y Probiótico (B).

La finalidad del proyecto fue determinar cuál de los dos probióticos comerciales, tiene mayor eficiencia y demostrar que cepas bacterianas son más susceptibles a los mismos, cepas domesticadas de *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*, determinando su halo de inhibición para obtener los respectivos resultados.

Los probióticos A y B fueron activados en agua de peptona (10 mg de Probiótico en 40 ml de agua de peptona previamente auto clavada) y con suministro de aire a través de un blower por 24 horas, para adecuar las mejores condiciones entre probióticos y poder obtener buenos resultados.

Mientras que la reactivación de las cepas patógenas domesticadas (*Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*) se las llevo por medio de aislamiento por agotamiento en placas con Agar Marino como medio de cultivo, además se realizó una réplica por cada placa de microorganismo patógeno.

El probiótico que demostró ser más eficaz ante todas las cepas patógenas fue el probiótico B, aunque los dos probióticos cumplen con sus funciones específicas, inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas patógenas.

Palabras claves: halos de inhibición, patógeno, Vibrio.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
CAPITULO I.....	1
1.1._ Objetivo General.....	1
1.2._ Objetivos Específicos.....	1
1.3._ Justificación.....	1
CAPITULO II.....	6
2.1._ Antecedentes.....	6
2.2._ Marco Teórico.....	9
2.2.1._ Probiótico.....	9
2.2.2._ Aplicación de probióticos en Sistemas Acuícolas.....	10
2.2.3._ Uso de probióticos.....	12
2.2.4._ Método de acción de los probióticos.....	12
2.2.5._ Composición probiótica.....	19

2.2.6._ Generalidades de Virionacea.....	23
2.2.7._ Vibrio harveyi.....	25
2.2.8._ Vibrio parahaemolyticus.....	32
2.2.9._ Vibrio vulnificus.....	34
CAPITULO III.....	40
3.1._ Materiales.....	41
3.2._ Metodología.....	42
3.3._ Diseño.....	42
3.4._ Distribución de Presupuesto.....	42
3.5._ Cronograma.....	42
3.6._ Limitaciones.....	43
3.6.1._ Principales impactos.....	43
3.6.2._ Impacto Social.....	44
3.6._ Impacto Ambiental.....	45
CAPITULO IV.....	46
4.1._ Resultados.....	46
4.2._ Recomendaciones.....	47
4.3._ Conclusiones.....	48

4.4_ Anexos.....	49
------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Materiales y Costos.....	49
Tabla II: Cronograma de Actividades.....	50
Tabla III: Composición Probiótica.....	51
Tabla IV: Resultados de <i>V. Vulnificus</i>	51
Tabla V: Resultados de <i>V. Harveyi</i>	52
Tabla VI: Resultados de <i>V. Parahaemolyticus</i>	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reactivación de capas bacterianas.....	53
Figura 2: Preparación de materiales.....	53
Figura 3: Activación de Probióticos.....	53
Figura 4: Diseño del Proyecto.....	54
Figura 5: Halo de inhibición producido por PA en V.Vulnifucus.....	55
Figura 6: Halo de inhibición producido por PB en V.Vulnifucus.....	55
Figura 7: Halo de inhibición producido por PA en V.Harveyi.....	55
Figura 8: Halo de inhibición producido por PB en V.Harveyi.....	55
Figura 9: Halo de inhibición producido por PA en V.Paraahaemolyticus.....	55
Figura 10: Halo de inhibición producido por PA en V.Paraahaemolyticus.....	55

CAPITULO I.

1.1. Objetivo general:

Determinar el probiótico de mejor respuesta para inhibir el crecimiento bacteriano.

1.2. Objetivos específicos

- Establecer entre los dos probióticos comerciales estudiados cual tiene mayor espectro de acción contra los microorganismos probados.
- Clasificar dentro de los microorganismos probados, cual es el orden de susceptibilidad frente a los dos probióticos comerciales estudiados.

1.3. Justificación

Los Probióticos están normalmente presentes en la microbiota intestinal de organismos sanos, por lo tanto pueden ser una alternativa para reducir o eliminar el uso de antibióticos en los sistemas de cultivo (Balcázar et al., 2006). En Ecuador, el uso de probióticos ha recibido una gran acogida en los últimos años, por parte de la industria camaronera como herramienta de control de

enfermedades en los cultivos, lo que les permite mejorar los niveles de producción.

La vibriosis es una de las enfermedades más problemáticas en la Acuicultura de mariscos y peces. La vibriosis es una enfermedad bacteriana responsable de la mortalidad en cultivos de camarón. Las especies *Vibrio*, están ampliamente distribuidas en las instalaciones de cultivo de todo el mundo. Las infecciones relacionadas con el *Vibrio* frecuentemente se dan en los laboratorios de cultivos larvales, pero del mismo modo las epizootias en los estanques de crianza de las especies de camarones. La vibriosis es causada por una bacteria gram-negativa de la familia Vibrionaceae.¹

La vibriosis es una enfermedad viral presente en todos los crustáceos marinos, incluido los camarones que son los más susceptibles. Las epizootias ocurren en todos los estadios de vida. Las mayores epizootias de vibriosis han sido reportadas para *Penaeus Monodon* en la región Indo-Pacífico, *Penaeus Japonicus* de Japón, y *Penaeus Vannamei* de Ecuador, Perú, Colombia y América Central. La vibriosis se expresa de diferentes formas de síndromes. Estos incluyen: vibriosis oral y entérica, vibriosis de los apéndices y cuticular, vibriosis localizadas en las heridas, enfermedad de la concha, vibriosis sistémica y hepatopancreatitis séptica.²

La vibriosis es causada por varias especies *Vibrio*, entre las que se incluyen: *Vibrio harveyi*, *Vibrio. vulnificus*, *Vibrio. parahaemolyticus*, *Vibrio. alginolyticus*, *Vibrio. penaeicida*.³

Las especies de *Vibrio* usualmente asociados con múltiples agentes etimológicos son parte de la microflora natural en los camarones silvestres convirtiéndose en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural están suprimidos. Sin embargo, algunas especies de *Vibrio* o cepas de ciertas especies, han sido identificadas como patógenas primarias.³

En Ecuador se han evaluado varias cepas patógenas para realizar evaluaciones experimentales:

- La cepa bacteriana E22 fue aislada por Arauz en 1994 de larvas de camarón que presentaron el síndrome de “bolitas” y fue identificada bioquímicamente como *Vibrio harveyi* (Serrano, 1996).
- La cepa S2 *V. vulnificus*, aislada de larvas que presentaron el síndrome de “Bolitas”. Sotomayor (2001) demostró la naturaleza patógena de la cepa en camarones juveniles.

- La cepa PA2 (*V. parahaemolyticus*), aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).

(Ensayos de las pruebas realizados en el Dpto. de Microbiología, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano M” Centro de Información y Documentación, Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Los camarones que sufren de vibriosis pueden presentar lesiones localizadas de la cutícula que son típicas de la enfermedad bacterial del caparazón, las infecciones localizadas en las heridas, pérdidas de miembros, musculatura blanda, infección localizada en el intestino o hepatopáncreas y/o septicemia general.² Las lesiones de la enfermedad bacterial del caparazón son marrones o negras y aparecen en la cutícula del cuerpo, apéndices y branquias.⁴

Las postlarvas pueden presentar un hepatopáncreas turbio.⁵ Las branquias frecuentemente tienen un color marrón (Anderson et al., 1988). La septicemia hepatopancreatitis está caracterizada por la atrofia del hepatopáncreas con necrosis multifocal e inflamación hemolítica.

El contenido de altas cantidades de *V. parahaemolyticus* o *V. harveyi* induce a la unión y separación de las células epiteliales de la lámina basal del Tronco medio. Las células epiteliales separadas no se presentan cuando hay bacterias no patogénica (probióticos).⁵

Vibriosis es un problema común en todo el mundo, particularmente en la India. *V. harveyi* continúa causando mortalidades crónicas de hasta 30% entre las larvas, postlarvas y adultos de *P. monodon*, bajo condiciones de estrés.

Muchos productores a nivel nacional han utilizado diferentes probióticos comerciales para mejorar la eficiencia de sus cultivos un problema común entre los productores, es la falta de conocimiento al aplicar los probióticos sin efectuar la caracterización de la biodiversidad en el área de cultivo para saber qué tipo de microorganismos están presentes. Se debe identificar, cuantificar y cualificar los microorganismos causantes de problemas para determinar cómo se los pueden contrarrestar.

Es importante realizar los análisis para comprobar la eficiencia de los probióticos frente a la población de cepas aisladas de algunos microorganismos, para esto se puede realizar el método microbiológico tradicional o la biología molecular.

CAPITULO II.

2.1. Antecedentes

La actividad camaronera en el Ecuador tiene sus inicios en el año 1968, en las cercanías de Santa Rosa, provincia de El Oro, cuando un grupo de empresarios locales dedicados a la agricultura empezaron la actividad al observar que en pequeños estanques cercanos a los estuarios crecía el camarón. Para 1974 ya se contaba con alrededor de 600 hectáreas dedicadas al cultivo de este crustáceo.

Debido a que éste se convirtió en un negocio muy rentable, fueron tomando tierras agrícolas y manglares. En los ochenta, esta actividad creció agresivamente. En 1987 el Ecuador fue el primer exportador de camarón del mundo.

Las áreas dedicadas a la producción camaronera se expandieron en forma sostenida hasta mediados de la década de los 90, donde no sólo aumentaron las empresas que invirtieron en los cultivos, sino que se crearon nuevas emparadoras, laboratorios de larvas y fábricas de alimento balanceado, así como una serie de industrias que producen insumos para la actividad acuícola.

Hasta 1998 (último año en que se tienen estadísticas sobre este tema) la Subsecretaría de Recursos Pesqueros registró 2 006 camaroneras, 312 laboratorios de larvas, 21 fábricas de alimento balanceado y 76 plantas procesadoras. Para 1999 el Centro de Levantamientos Integrados de Recursos por Sensores Remotos, CLIRSEN, determinó que 175 253,5 Has. estaban ocupadas por la infraestructura camaronera.

Entre 1988 y 1990 el síndrome de la gaviota produjo reducciones en las ventas del crustáceo de un 15%. En 1993 apareció el síndrome de “taura”, que provocó una reducción de las exportaciones en un 13%. , A fines del mes de mayo de 1999, apareció el virus de la mancha blanca, ocasionando la peor recesión del sector camaronero en toda su historia, con una reducción de las exportaciones del 17% respecto al año 1998, al cierre del año 2001, las exportaciones del crustáceo bajaron en un 60%, respecto al máximo o nivel alcanzado en el año 1998.

La acuicultura y en especial la camaronicultura han sido gran fuente de empleo y generadora de divisas para el país. Según fuentes de la Cámara Nacional de Acuicultura del Ecuador las exportaciones de camarón ecuatoriano llegaron a su punto más alto en 1998 cuando alcanzó la cifra de 11 400 toneladas exportadas, por las cuales se recibió 875 millones de dólares de EE.UU.

En el año 2000 la industria camaronera tocó fondo como resultado del impacto del virus de la Mancha Blanca sobre la actividad camaronera, con una producción de tan sólo 37,7 mil toneladas. Para finales del 2002 el Ecuador alcanzó la cifra de 46,8 mil toneladas exportadas, 3,24 por ciento más que el año anterior, pero todavía lejos de una real recuperación en la producción. Adicional a la Mancha Blanca, la Industria Acuícola Camaronera ecuatoriana se ha visto afectada por una drástica caída en los precios internacionales. Las exportaciones de camarón en los primeros meses de 2005 (período Enero - Mayo), registraron una cifra récord de 35 854 toneladas, un 28 por ciento más en comparación con el mismo período en 2004.

La existencia de nuevas regulaciones para la exportación y una gran preocupación por el uso de agentes quimioterapéuticos en Acuicultura han conducido a la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades. A pesar de que los antibióticos mejoran la supervivencia (frente a las infecciones) también alteran la microbiota intestinal e inducen la aparición de poblaciones bacterianas resistentes.

2.2. Marco Teórico.

2.2.1. Probiótico

El termino probiótico se está utilizando con gran popularidad en la actividad acuícola y principalmente en la actividad camaronera, el significado de ella deriva de la exclusión de un organismo por competitividad del dominio del ambiente ecológico específico en beneficio de otro organismo.

Parker (1974) originalmente lo refirió como “organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal microbiano”. La definición fue entonces limitada a “un microbio vivo como complemento alimenticio el cual afecta benéficamente al animal hospedero mejorando el balance de los microbios intestinales” (Fuller, 1989).

Tannock (1996) se dio cuenta que el efecto sobre el “balance microbiano” no ha sido demostrado en muchos casos. El propuso referirse a “células microbianas vivas administradas como suplementos dietéticos con el fin de mejorar la salud”. Si se aplicará esta definición en el contexto acuático muchos de los llamados “probióticos” deberían ser excluidos, simplemente porque no pueden ser considerados como “suplementos dietéticos”. Sin embargo, lo siguiente mostrará que algunos de estos sustentan la relevancia del concepto original.

2.2.2. Aplicación de probióticos en sistemas acuícolas.

La forma de aplicación de los probióticos a estanques acuícolas puede ser a través de fermentaciones de levaduras en combinación con melaza y/o la adición de substratos micro porosos, que contienen los probióticos elaborados comercialmente, dentro de ellos. Al ingresar los desechos orgánicos particulados dentro de estos poros, facilitan el trabajo de los probióticos que viven o están incluidos en ellos.

Cuando se usan probióticos, se debe considerar la dosificación que se aplica en un estanque, basándose en la densidad de siembra, la flora inicial, el tamaño del estanque y las condiciones del agua (agua clara sin fertilización y/u oscura, con abundancia de algas) pH, carbono disponible, etc. de cultivo de organismos acuáticos en estanques.

La aplicación de probióticos puede iniciarse desde el laboratorio suministrándose a tanques de cultivo tanto de peces como crustáceos en estadios larvales; luego en estanques de pre-cría o racheas; y finalmente hacia estanques, para la fase de engorde en el cultivo de camarón y/o peces. Es típico, que en todas estas fases se aplique para iniciar y/o bioremediar, dando

buenas condiciones al ambiente de crianza y mejorar evitando así el uso de medios terapéuticos u antibiótico, compuestos químicos y/o medios mecánicos.

Una de las medidas comunes de contrarrestar enfermedades, es mediante la aplicación de antibióticos. Estos pueden en si también eliminar tanto a bacterias benéficas como patógenas.

Aunque el uso de antibióticos es eficaz para erradicar la patogénesis de algunos organismos de cultivo, su aplicación rutinaria no es aconsejable para la crianza de larvas de peces y otros mariscos porque puede promover la resistencia al antibiótico e influir en la microflora autóctona del organismo.⁶ Por esta razón la Unión Europea ha regulado y prohibido la aplicación de los antibióticos en organismos de consumo humano.⁷

El empleo de probióticos ha demostrado ventajas en la producción controlada de organismos acuáticos en diversas etapas de su desarrollo larval y juvenil, pero por desgracia constantemente aparecen más bacterias con carácter etológico infeccioso que se deben atacar; por lo que la búsqueda de nuevos probióticos más eficaces sería un recurso potencial en la acuicultura marina.

Generalmente, a los estanques se aplican probióticos y/o microorganismos benéficos de origen comercial, las cuales han sido obtenidas desde el ambiente marino o de estanques a través de la recolección, selección, cultivo individual y/o en mezcla.

Pero en algunos casos, las propias empresas con ayuda de microbiólogos han realizado aislamiento *in situ* de microorganismos que ellos también consideran benéficas. Los productos comerciales son presentados en envases para transportarlos en medio sólido y/o líquido.

2.2.3. Uso de probióticos.

La primera historia exitosa en la selección de probióticos del medio acuático ha sido lograda con larvas de crustáceos. En Japón aislaron una cepa bacteriana que reprime el crecimiento del *Vibrio spp.* Patógeno e incrementa la producción de la larva del cangrejo *Portunus trituberculatus*. Nogami y Maeda (1992).

Existen otras referencias de trabajos con probióticos en acuicultura, algunos de ellos por ejemplo fueron realizados por Douillet y Langdon (1994), quienes utilizaron un tipo de levadura (CA2) para incrementar la supervivencia de larvas de *Crassostrea gigas*.

Gatesoupe (1994), logro mejorar la supervivencia de larvas de *Scophthalmus maximus* al administrarles bacterias ácido lácticas. Vazquez-Juarez (1994) realizaron un experimento con levaduras aisladas de trucha arco iris silvestre y reintroducidas a otros organismos de la misma especie en cultivo, lo que incremento significativamente el crecimiento de los mismos.

En laboratorios de crianza ecuatorianos, Griffith (1995) reportó que larvas de camarón fueron afectadas por una enfermedad bacteriana caracterizada por un descenso en cantidades de *Vibrio alginolyticus* y el incremento de *V. parahaemolyticus*.

Esta cepa de *V. alginolyticus* fue exitosamente empleada para curar la enfermedad. Después, el efecto de este probiótico fue investigado por Austin et al., (1995) quienes observaron que (1) el sobrenadante del cultivo inhibió a los patógenos de los peces *in vitro*; (2) el probionte sobrevivió en el intestino del salmón Atlántico después de tres semanas; (3) un baño preliminar con el probionte mejoró la sobrevivencia del salmón puesto a prueba con patógenos. Este es un buen ejemplo de lo que podría ser esperado de los probióticos, por ejemplo, (1) antagonismo a patógenos, (2) colonización del intestino, con posible adhesión al mucus, (3) mejoramiento de la sobrevivencia.

Bogut et al. (1998) suministraron *Streptococcus faecium*, logrando incrementar el crecimiento y eficiencia alimenticia en carpas *Cyprinus carpio* y desplazando a *Escherichia coli* del tracto intestinal de las mismas. Lara (1999) llevo al cabo un trabajo sobre el efecto de la utilización de tres distintos probióticos en la alimentación de Tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* sometida a diferentes condiciones de estrés, obteniendo los mejores resultados en crecimiento y supervivencia con el hongo *Saccharomyces cerevisiae*.

Vandengerghe *et al.* (1999), mencionan que los síndromes de zoea 2, y síndrome de la muda mysis-postlarva, son síndromes en los cuales existe una alta mortalidad larvaria de crustáceos (*Litopenaeus vannamei*), estando caracterizados por la presencia de *Vibrio harveyi*, mientras que estos mismos estadios incluyendo el estadio naupliar, postlarval y juvenil con cargas bacterianas habituales de *Vibrio alginolyticus*, estaban asociados a altas sobrevivencias, por lo que se asume que la actividad probiótica o inmunológica de *Vibrio alginolyticus* sobre *Vibrio harveyi* es un hecho.

Se menciona además que otros posibles candidatos con tales características pudiesen ser *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela* y *V. mimicus*. Uma *et al.* (1999) observaron en larvas de *Penaeus indicus* el efecto sobre el crecimiento y supervivencia al emplear *Lactobacillus plantarum* (como antígeno

de *Vibrio harveyi*) bioencapsulado en nauplios de *artemia* , concluyendo sobre la eficacia del antígeno.

Esfuerzos similares han sido realizados por Torrento y Torres (1999) con *Penaeus monodon*, utilizando como antígenos en la sobrevivencia larval diferentes cepas de bacilos y pseudomonas.

Lamberth *et al.* (1999), a finales de los 90's realizaron en Noruega el aislamiento de 50 cepas de bacterias comunes, en laboratorios de producción larvaria de moluscos, encontrando solo tres especies que parecen tener actividad antigénica contra bacterias dañinas, *Vibrio pectinocida*, *V. anguillarum* y *V. Splendidus*; resultados que se encuentran en fase final de prueba. La mayoría de estas bacterias han sido reportadas con carácter etimológico infeccioso en otros sitios, observando que la patogenicidad pudiese deberse a otros patógenos que actúan en forma conjunta.

Otro posible candidato mencionado por Riquelme *et al.* (1996), que ha sido evaluado por su carácter antagonista contra bacterias del género *Vibrio* , y que incide positivamente en el desarrollo larval de escalopos, es la bacteria denominada *Alteromonas haloplanktis* la cual, mediante sus productos metabólicos, inhibe la acción de dichos vibrios.

Uc Huchin (1999), hizo un estudio comparativo del efecto de la inclusión de una mezcla probiótica (*Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus faecium*) y un antibiótico (Terramicina) como promotores de crecimiento en dietas de Tilapia nilótica *O. niloticus* observando que ciertas bacterias, de la microflora, que ocasionaban disminución en el aprovechamiento del alimento, eran eliminadas al administrarse el probiótico en la dieta, y por lo tanto aumentaba el aprovechamiento del mismo. Por otra parte el trabajo de Tovar et al. (2000) con lubina europea *Dicentrarchus labrax*, utilizando dos levaduras, como promotores de crecimiento *S. cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*, señalan que encontraron un menor crecimiento, con las dietas que contengan ambas levaduras, pero lo atribuyen a la textura de las mismas.

Tovar *et al.* (2002) describieron a la Levadura *Debaryomyces hansenii* aislada del tubo digestivo de peces, como productora de poliaminas (espermina y espermedina), las cuales se fijan con gran capacidad al mucus intestinal de larvas de lobina (*Dicentrarchus labrax*), produciendo secreciones de amilasa y tripsina que influyeron positivamente en la sobrevivencia larval pero no en el crecimiento.

2.2.4 Método de acción de los probióticos.

El interés en tratamientos amigables con el medio ambiente se está incrementando rápidamente con la demanda de una producción sustentable, y el empleo empírico ha sido desarrollado antes de la racionalización científica. Un número creciente de probióticos comerciales han sido propuestos a los acuicultores, pero estos productos se consideran aun algo disparatados. Ahora es el momento para examinar el estado de arte, desde el uso empírico hasta el uso del método científico.

En la naturaleza las bacterias juegan un rol muy importante para la descomposición de nutrientes, que posteriormente van a ser utilizados en la cadena trófica y/o en la digestión así como desechos acumulados, especialmente en los ambientes acuáticos ya sean cualesquiera fuera el sistema de cultivo: extensivo, semi-intensivo y/o intensivo. La acumulación de estos desechos conlleva al deterioro del medio ambiente presentándose seguidamente deterioro de la calidad del agua, estresando al camarón y haciéndolo más susceptible para el desarrollo de enfermedades.

La microflora de la mayoría de invertebrados marinos puede funcionar como hospederos de bacterias que son patógenas de otros organismos por lo que al

ser co-habitantes funcionan como vectores de transferencia de patógenos a estadios larvales, juveniles y adultos de peces, crustáceos y moluscos.

La actividad probiótica o inmunológica por las vías antes mencionadas es importante, ya que las larvas de organismos acuáticos al eclosionar no poseen ningún sistema inmunológico, por lo que la defensa no específica es de vital importancia en estas etapas tempranas.⁸

Los investigadores han descubierto que ciertos microorganismos pueden jugar un papel de desplazamiento de otros compitiendo por los nutrientes y espacio para su desarrollo. Y de esta manera eliminar otros microorganismos patógenos sin la necesidad de usar antibióticos.

Desde allí, su aplicación en todas las formas de producción animal se ha incrementado con la finalidad de promover mejor crecimiento, conversión alimenticia y salud; así mismo para limitar el tiempo de exposición a los organismos dañinos o perjudiciales.

Aparte del desplazamiento por exceso de poblamiento y competencia por los nutrientes con los microorganismos malos, los probióticos pueden producir excreciones de tipo enzimático u exoenzimas, que pueden dispersarse en el ambiente de cultivo alterando ciertas condiciones del medio; tal es así, que

estas exoensimas pueden colaborar en la ruptura de partículas grandes de desechos y desdoblarlos a productos finales como agua dióxido de carbono y compuestos inorgánicos como nitratos y fosfatos, que al final son absorbidos por el fitoplancton para su desarrollo y multiplicación. Estos a través de la fotosíntesis consumen el CO₂ y producen oxígeno.⁸

2.2.5. Composición probiótica.

Desde un punto de vista taxonómico, organismos gramnegativos anaerobios facultativos predominan en el tracto digestivo de peces y crustáceos, y estos son comúnmente los probióticos más eficientes para Acuicultura siendo diferentes de aquellos designados para especies terrestres.

De los géneros de bacterias mas investigados están:

Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterococcus y Escherichia, los dos primeros son los que presentan resultados más consistentes. Los Lactobacilli fueron los primeros microorganismos en ser suministrados en su forma viva, por vía oral, con el objetivo de producir efectos benéficos a la microbiota digestiva.

Además de los probióticos, un caso de inhibición competitiva, la llamada “estrategia r/K ”, ha sido también propuesta para control de la microbiota

acuática.⁹ La bacteria oportunista, incluyendo los patógenos potenciales, crecen rápidamente tanto como el suministro del recurso no sea restringido.

Su crecimiento puede ser inhibido por la competición con estrategias-K que dominan bajo condiciones de recurso limitando. Desafortunadamente, el recurso suministrado es raramente el factor limitante en acuicultura, y en principio debería aplicarse solamente al periodo inicial de colonización bacteriana en unidades de cultivo.

La idea original fue dejar madurar un biofiltro que pudiera dificultar el crecimiento de las bacterias oportunistas, y que mejorara el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de peces planos (Skjermo *et al.*, 1997). También se ha sugerido la aplicación de este principio al cultivo de Artemia (Verschuere, 1997).

Los probióticos seleccionados están lejos de ser estrategias-r, pero la combinación de ambos conceptos debería ser considerada para restringir el alimento disponible para los patógenos.

Por último, *Bacillus* spp. aislado de una capa externa de lodo parece tener la capacidad de proteger al pez de una infección dermal (Douillet, 1998). Ellos no son verdaderos probióticos, porque no involucra al tracto gastrointestinal, pero el principio es bastante similar. Este aspecto merece atención adicional, con

respecto a la importancia del mucus externo en peces que son sujetos a manipulaciones frecuentes.

El conocimiento sobre la utilización de probióticos en la acuicultura es un campo sobre el cual se requiere aun demasiada investigación, a fin de contar con ellos como una herramienta que solucione las grandes tasas de mortalidad en los primeros estadios del desarrollo larvario de peces, crustáceos y moluscos, por causa de bacterias oportunistas.

Es importante recalcar que los estudios, hasta ahora no concluyentes, sobre las ventajas de la aplicación de los probióticos en acuicultura han evidenciado que existe una disminución de las grandes tasas de mortalidad larvaria, así como el de generar un aumento de la tasa de crecimiento o metamorfosis; sin embargo, aún existe incertidumbre sobre si las cepas aisladas con capacidad antigénica encontrada en bacilos, vibrios, levaduras y lactobacilos son 100% las responsables del mejoramiento de la sobrevivencia y crecimiento, o existe un proceso que enmascara dicha actividad. Sin duda alguna, la búsqueda de probióticos ha disminuido el empleo de antibióticos debido a los efectos adversos que causa al medio ambiente y salud humana.

La perspectiva de los probióticos muestra una considerable promesa, pero debemos tener cuidado del triunfalismo. A pesar del creciente número de

pruebas exitosas en acuicultura, esos tratamientos con probióticos no son todavía un asunto de rutina. Puede ser prudente recordar algunas reglas básicas, con optimismo obviamente para todos.

El uso preventivo de preparaciones de probióticos comerciales es comúnmente seguro, pero su protección puede fallar y el acuicultor debería primeramente llamar al veterinario en caso de que comenzaran a enfermar los organismos cultivados. Además, estos tratamientos deben ser reforzados con cuidado e higiene durante el manejo, porque los probióticos forman parte del intento para el control de otros microbios acuáticos, a los cuales debe aplicárseles el “sistema 3K (3M)”. Con la finalidad de preservar el alimento libre de microbios para que no se echen a perder, este sistema propone:

1. Mantenerlos fuera.
2. Matarlos si se puede.
3. Mantener al resto creciendo

Estos objetivos deberían ser cumplidos respetando los principios de conservación del Ambiente, evitando en particular el abuso de antibióticos y la liberación de desinfectantes contaminantes. (Foster, 1989).

Las posibles desventajas que ahora pudiesen encontrarse, en los incipientes avances en el campo de la búsqueda y actividad de los probióticos de origen

marino como herramienta de la industria creciente del larvicultivo, es que aún no existe un control total sobre las bacterias utilizadas a nivel de cultivos larvarios intensivos, debido a los grandes volúmenes de agua y de organismos en cultivo que son manejados, y el poco control de la acción de factores físicos sobre el proceso, lo que podría representar grandes pérdidas (costo-efectividad).

Finalmente, debemos considerar que el uso y desarrollo de los probióticos es una actividad de manejo relativamente joven dentro de la acuicultura, por lo que muchas veces los resultados hallados no son los esperados y en algunos momentos son materia de discusión y controversia. Por otro lado, aun existe mucho por desarrollar y quizás se pueda obtener posibles beneficios de esta nueva técnica para su aplicación especialmente en la industria camaronera.

2.2.6. Generalidades de vibrionaceae

La familia *Vibrionaceae* está constituida por los géneros: *Aeromonas*, *Plesiomionas* *Photobacterium* y *Vibrio* (Baumann y Schubert, 1984). Los miembros del género *Vibrio* son bacilos curvos gramnegativos que miden de 0.5 a 0.8 mm de diámetro por 1.4 a 2.6 mm de largo; son móviles por flagelos polares.

Son anaerobios facultativos y poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo; no fijan ni desnitrifican el nitrógeno, todos son quimiorganótrofos. Fermentan la D-glucosa con producción de ácido pero no de gas. Todos utilizan la D-fructosa, la D-maltosa y el glicerol, la mayoría son oxidasa positiva y todas crecen bien entre 20°C y 30°C. Sólo unas cuantas cepas necesitan de factores orgánicos de crecimiento.

Los iones sodio estimulan el desarrollo de todas las especies, la concentración mínima necesaria de estos cationes para obtener crecimiento óptimo es del orden de 5-700 mM (Kelly *et al.*, 1991).

En el género *Vibrio* se incluyen cerca de 37 especies las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza en ambientes acuáticos con diversos grados de salinidad, algunas especies viven en el intestino de animales marinos. También se les halla en agua dulce donde sobreviven horas o semanas cuando está contaminada con materia orgánica y su pH es entre 6 y 9.

La temperatura del agua modula la población de *Vibrio*, aumentando su número durante el verano. Las bacterias del género *Vibrio* son susceptibles a desecación, ebullición, cloro y otros desinfectantes y antimicrobianos como las

tetraciclinas. La viabilidad de la bacteria disminuye por competencia de la biota contaminante.

La acidez reduce notablemente su viabilidad (Glass *et al.*, 1982; Sakazari, 1992; Thampuran y Surendran, 1998). Once especies son patógenas para el humano sobresalen *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* como agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por alimentos (Elliot *et al.*, 1998; Oliver y Kaper, 1997).

2.2.7. *Vibrio harveyi*

El *Vibrio harveyi* fue descrito por primera vez como una especie de *Acromonobacter* por Johnson y Shunk (1936). Estudios posteriores en la clasificación de bacterias luminosas informados de tres grupos principales. El primer grupo contiene *Photobacterium fischeri*, el segundo grupo se compone de *Photobacterium phosphoreum leigonathi* y *photobacterium*, y el tercer grupo contiene *Beneckea harveyi*, *Beneckea Splendida*, y *V. cholerae* biotipo *albensis*.¹⁰

Laterm, incluyó a esta bacteria en las listas de nombres de las bacterias bajo las denominaciones de *Beneckea harveyi* y *Lucibacterium harveyi*. En 1980,

Baumann et al. transfirió la especie *Vibrio* en *varius*. Las características fenotípicas de *V. harveyi* son, muy cerca de los de *carchariae* *Vibrio*. De hecho, Pedersen *et al.* (1998) concluyó que *V. carchariae* es un sinónimo de *V. harveyi* sobre la base de un análisis filogenético y un enfoque polifásico con 16 S secuenciación del rDNA, fluorescente amplificación de fragmentos polimórficos, los experimentos de hibridación ADN-ADN, y G + C, de los contenidos ADN.²

La gran diversidad de *V. harveyi* plantea ciertas dificultades en la determinación bioquímica del medio ambiente y la identificación de especies de *Vibrio*. Se concluyó que los criterios bioquímicos no son siempre suficientes para distinguir entre especies de *Vibrio* debido a su carácter variable (West et al., 1986). En los ensayos de caracterización bioquímica, *V. harveyi* y *campbellii* *V.* presentaba características muy similares debido a su estrecha relación fenotípica y genotípica (Bryant et al., 1986). El trabajo de Gómez - Gil et al. (2004) ha creado un gran debate sobre la importancia de *V. harveyi*, ya que su trabajo sugirió que *V. cambelli* era mucho más importante como un organismo causante de la enfermedad.

Sin embargo, esta confusión no debería haber ocurrido, como Alsina y Blanch (1994) mostró *V. harveyi* arginina y lisina negativa y ornitina - positivo, mientras que *V. campbelli* es siempre ornitina - negativo.

De hecho, la naturaleza ornitina- positiva de *V. harveyi* se utilizó para crear agar *V. harveyi* (Harris et al, 1996.). Además, el 85% de las células de *V. harveyi* son bioluminiscentes, mientras que las células *V. campbelli* no lo son.

Para identificar y diferenciar el medio ambiente las bacterias marinas, se sugirió que 20NE API deberían ir acompañadas de pruebas adicionales a los previstos en la que la API (Productos Analytab, Plainview, NY) para producir un resultado más contundente y realista (Breschel y Singleton, 1992). El estilo de la API del kit de pruebas bioquímicas abarca sólo 20 reacciones y los perfiles sólo las bacterias de importancia médica, tales como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Los perfiles de los aislamientos de *V. harveyi* brotes de la enfermedad de forma coincidía con las de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* obtenidos mediante la API 20NE y sistemas 20NFT.²

El uso del sistema API-NFT fue probablemente responsable de la identificación errónea de *V. harveyi* aislados como cepa luminiscentes de una serie de bacterias (por ejemplo, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* o *V. vulnificus*) que no se caracteriza como luminosos en el investigación de "síndrome de la gaviota" en el Ecuador (Mohney et al., 1994). La identificación de *Vibrio* aislados utilizando la técnica de Biolog GN no se precisa cuando se someten a un polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados genómica toma de huellas dactilares (Vandenberghe et al., 1998). Estas cepas mostraron que sólo el 30% de similitud con el grupo que contiene la cepa de tipo y cepas de referencia de *V. harveyi*.

El agar TCBS con 2% de sal es un medio ampliamente utilizado para la identificación de la especie *Vibrio*, sin embargo, se necesita un medio diferencial para *V. harveyi* como lo es el VHA (*Vibrio Harveyi Agar*) el cual posee un pH de 9, una fuerte concentración de 30g/L de NaCl y la presencia de ornitina y celobiosa.

La descarboxilación de ornitina alcaliza el medio, que contiene indicadores de pH, mientras que la acidificación de celobiosa baja el pH. Después de 48 h de incubación a 28 ° C, las colonias de *V. harveyi* tienen un diámetro de 2-5 mm, por lo general tienen contornos regulares, y su color es azul o verde ligeramente con un centro de color verde oscuro que a veces rodeadas de un halo amarillo.

Los neurofibras ganglionares de las larvas infectadas mostraron vacuolización extensa y granulación comparación con los controles sin inocular. Owens et al. (1992) informaron de la colonización extensa del tejido conectivo de *Penaeus esculentus* como infectados experimentales. Infección del tejido conectivo fue también característica de la ostra perla infectada experimentalmente en el estudio de la transferencia y otros. (1987).

Los análisis de histología de camarones moribundos mostraron extensos tubulos del hepatopáncreas necrosados y la presencia de bacterias en los nódulos hemolíticos a lo cual se atribuyo al efecto de los *V. harveyi*.(Nithimathachoke et al., 1995).

Vibrio harveyi, aislado de *Penaeus vannamei* enfermos, fueron patógenos en las larvas de camarones peneidos cuando se utiliza en una concentración de 10^5 células ml^{-1} durante 2 h. d. La enfermedad tiene como sintomatopatía el desarrollo de la bioluminiscencia, la reducción de la alimentación y las anomalías en su desarrollo, natación lenta, reducción de mecanismos de escape, la degeneración del tejido hepatopancreático.

Las pérdidas en gran escala de larvas y juveniles de peneidos se han asociado con epizootica de *Vibrio* sp. ²

En el Ecuador, el *V. harveyi* se ha implicado con mortalidades masivas de larvas de *litopennaeus vannamei*, en la condición de la enfermedad se caracteriza por una patología distintiva del hepatopáncreas donde el tejido se degenera, formando bolas que se mueven en el intestino superior, larvas con luminiscencia, cambios de conducta y falta de apetito, afortunadamente el evento fue reportado y los productores pudieron actuar. ⁷

Al mismo tiempo, las larvas se bioluminiscentes, con el acompañamiento de los cambios de conducta y falta de apetito. Afortunadamente, la enfermedad se ha registrado (Karunasagar et al. 1994).

2.2.8. Vibrio Paraemolítico

En 1950, Fujino y colaboradores fueron los primeros en aislar a *V. parahaemolyticus* como agente causal de gastroenteritis de origen alimentario, a raíz de un gran brote causado por el consumo de Shirasu (un producto de pescado semiseco) en Japón .¹¹

En este incidente, 272 pacientes sufrieron gastroenteritis aguda, 20 murieron. Desde entonces, este organismo ha sido aislado con frecuencia de los brotes y casos esporádicos de gastroenteritis en muchos países.¹²

Y ahora se sabe que el *V. parahaemolyticus* es una causa importante de gastroenteritis en todo el mundo.¹²

El *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria curva, en forma de vara, Gram-negativa encontrada en el agua salada y agua salobre, que, cuando se ingiere, causa enfermedades gastrointestinales pudiendo ser transmitida por pescados y

mariscos hacia los seres humanos (Blake et al, 1980; Janda et al, 1988; Honda y Iida, 1993; McCarter, 1999, Thompson et al, 2004). El *V. parahaemolyticus* es oxidasa positivo, aeróbico facultativo, y no forma esporas. Al igual que otros miembros del género *Vibrio*, esta especie es móvil, con un solo flagelo polar.

La mayoría de las cepas causantes de la enfermedad están asociadas con la gastroenteritis, pero también puede infectar las heridas abiertas y la septicemia causando en muchos casos de muerte. Puede ser transportado por numerosos animales que viven del mar, como los cangrejos o langostinos, y se ha sabido para causar infecciones mortales en los seres humanos durante la exposición.

Muchos también son *Vibrio* zoonóticos. Causan enfermedades en peces y mariscos, y son comunes las causas de mortalidad entre la vida marina nacional.

Aunque ha habido numerosos estudios sobre esta bacteria, el modo exacto de la OET acción patógena no ha sido bien aclarado. Un análisis reciente del genoma de *V. parahaemolyticus* (Makino et al., 2003) ha arrojado luz sobre aspectos desconocidos de su mecanismo patogénico. ¹³

2.2.9. *Vibrio vulnificus*.

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta Georgia reportó por primera vez a *V. vulnificus* (Hollis *et al.*, 1976) al cual identificó como “vibrio lactosa positivo”, “vibrio Lac+” o “vibrio L+” posteriormente se le llamó *Beneckea vulnificus* y finalmente *V. vulnificus* (Oliver y Kaper, 1997); desde entonces este patógeno ha sido objeto de numerosos estudios ya que junto *V. parahaemolyticus* son los microorganismos más comúnmente relacionados con enfermedades asociadas a la ingesta de productos de la pesca (Hlady, 1997).

V. vulnificus es una bacteria halofílica, móvil, gramnegativa, oxidasa positivo, lisina descarboxilasa positivo y arginina dihidrolasa negativo, por lo que se encuentra en el grupo 6 de los *Vibrios* junto con *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio carchariae*. Se diferencia de otros organismos en este grupo por la capacidad que tiene de fermentar salicina y celobiosa. *V. vulnificus* es resistente a la colistina pero sensible a la ampicilina y carbenicilina (Kelly *et al.*, 1991).

Brotos de *Vibrio vulnificus* ocurren comúnmente en los climas cálidos y pequeños, generalmente letales, los brotes ocurren con regularidad. Un brote ocurrido en Nueva Orleans después del huracán Katrina.

V. vulnificus tiene una excepcional capacidad invasiva, de hecho es la especie más invasiva del género *Vibrio* (Hacknery y Dicharry, 1988; Rodrigues *et al.*, 1992). Existen dos biotipos de *V. vulnificus* los cuales se diferencian en patogenicidad en anguilas (*Anguilla anguilla*) rasgos fenotípicos y variaciones genotípicas (Banerjee *et al.*, 2002).

Ambos biotipos son patógenos para ratón, pero sólo el 2 es patógeno en anguilas (Biosca *et al.*, 1996) ya que se sabe que el biotipo 1 es destruido por la acción del efecto bactericida del suero de anguilas, mientras que el biotipo 2 es resistente (Amaro *et al.*, 1997).

V. vulnificus biotipo 1 puede ser aislado de varias fuentes ambientales; se encuentra en estuarios, es oportunista y patógeno para el humano ya que es capaz de causar septicemia y severas infecciones en heridas, no es patógeno para anguilas y es indol positivo (Hoi *et al.*, 1998).

V. vulnificus biotipo 2 raramente se encuentra en el medio ambiente, se aísla de anguilas enfermas y se ha reportado que puede causar enfermedad al humano por manipulación de este pez (Amaro y Biosca, 1996). Los primeros aislados de este biotipo fueron obtenidos de anguilas japonesas entre 1975 y 1977 (Nishibuchi *et al.*, 1980).

Se observó por primera vez en 1989 en España y fue aislado por primera vez en Dinamarca en 1991 de infecciones en humanos (Hoi *et al.*, 1998). El biotipo 2 es patógeno para anguilas e indol negativo (Biosca *et al.*, 1997).

V. vulnificus es una bacteria autóctona de estuarios y aguas marinas con climas tropicales, su sobrevivencia está asociada a las condiciones ambientales de pH, salinidad y temperatura del agua, niveles de oxígeno disuelto y coliformes ya que crece mejor en ausencia de bacterias entéricas (Kaspar y Tamplin, 1993; Pfeffer *et al.*, 2003).

Se sabe que de mayo a octubre las aguas del Golfo de México poseen las características óptimas para el crecimiento y desarrollo de *V. vulnificus*, tales como 7-16‰ de salinidad y temperatura mayor de 20°C. La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es de 37°C, aunque crecen bien de 30-35°C e inclusive a 43°C como máximo, no crecen a temperatura menor de 8°C.

V. vulnificus es sensible a concentraciones salinas mayores de 28‰; la exposición de ostras durante un periodo de 7-17 días en agua con una salinidad de 30-34‰ reduce el número de bacterias de 10³-10⁴ Número Más Probable/g a menos de 10 NMP/g (Motes y DePaola, 1996).

Se ha demostrado que los microorganismos patógenos contaminantes de moluscos pueden ser eliminados si se someten a un tratamiento con calor, ya que son sensibles a este; 10 minutos a 50°C es suficiente para eliminar *V. vulnificus* en ostras (Hesselman *et al.*, 1999).

Bajo ciertas condiciones y especialmente en ambientes marinos, *V. vulnificus* desarrolla estrategias de sobrevivencia bajo condiciones de estrés. Cuando la temperatura es menor de 7°C, el organismo entra en un estadio llamado viable pero no cultivable. En esta fase, la bacteria no puede cultivarse en medios normalmente usados en su aislamiento, pero mantiene actividad respiratoria y metabólica. Este estado fisiológico es considerado como una estrategia para responder a condiciones adversas, de ahí que durante los meses de invierno se dificulte el aislamiento de *V. vulnificus* de agua y moluscos (Oliver *et al.*, 1991; Whitesides y Oliver, 1997).

V. vulnificus se ha aislado de una variedad de ecosistemas acuáticos; en los Estados Unidos ha sido reportado en el Atlántico, Pacífico y en las costas del Golfo (Kaysner *et al.*, 1987). La temporada en la cual se reportan la mayoría de los casos es principalmente en verano, ningún caso se ha descrito entre los meses de diciembre a febrero (Johnston *et al.*, 1985; Klontz *et al.*, 1988). En Florida la mayoría de los casos de infecciones por *V. vulnificus* ocurren en

mayo; durante este periodo la densidad del microorganismo en ostras es del orden de 10⁵-10⁶ organismos/g ostra (Klontz *et al.*, 1988; Hesselman *et al.*, 1999).

La infección por *V. vulnificus* puede ser de dos tipos: por contacto de heridas con el agua de mar contaminada o mediante el consumo de alimentos que contengan a este microorganismo. El periodo de incubación es de 12-36 horas después del consumo de mariscos crudos o deficientemente cocinados; la muerte sobreviene en un lapso de 1-2 días (Hill *et al.*, 1991).

Las formas clínicas de infección por *V. vulnificus* son: septicemia, infección gastrointestinal e infección de tejidos blandos. En la septicemia primaria, la sintomatología más frecuente es: fiebre, escalofrío, náusea, cambios en el estado mental, hipotensión, vómito y gastroenteritis. Del 60-70% de los pacientes con septicemia primaria también desarrollan lesiones cutáneas como celulitis, bulas y equimosis que progresa a úlceras necróticas. La razón por la que aparecen las lesiones es desconocida (Klontz *et al.*, 1988; Chuang *et al.*, 1992).

CAPITULO III.

3.1. Materiales

- 15 Cajas Petri
- 3 Asas de Platino
- 3 Esparcidoras de cristal
- 12 Pipetas Pasteur
- 5 Pipeta (10 ml)
- 1 Probeta (100 ml.)
- 4 Frascos de vidrio (250 ml)
con tapa plástica.
- Micro pipetas (100 y 1000 μ l.)
- Puntas plásticas (100 y 1000 μ l.)
- 200 ml. de Agar Marino
- 200 ml. de Agua de Peptona
- Balanza
- Autoclave
- Cámara de seguridad
- Incubadora
- Papel aluminio
- Bortex
- Mechero de Bunsen
- Fósforos
- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml.

3.2. Metodología

1) Se reactiva de las cepas bacterianas (*V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. paraemolítico*) que se encuentran con glicerol a 15% a una temperatura de - 80°C. Las cepas pertenecen al Centro de Servicio para la Acuicultura (CSA).

(Figura 1)

2) Se preparó los materiales (Figura 2)

- Medios de Cultivo (Agar marino 200 ml)
- Agua de peptona más NaCl al 2% (200ml)
- Auto clavar materiales

3) Se activo de los probióticos a una razón de 10g. en 40 ml de agua de peptona en los frascos de vidrio (250 ml.) por 24 horas con suministro de aire a través de blower. (Figura 3)

4) Se elaboró las diferentes soluciones McFarlan, haciendo soluciones con una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^8$.

5) Se realizó siembra de los Vibrios (10 ml.) en las placas con agar marino como medio de cultivo por superficie usando esparcidoras de cristal hasta agotar la muestra.

6) Se efectuaron hoyos de forma circular en las placas con el reverso de las puntas de vidrio.

7) Se colocó 50 µl de probiótico en los hoyos que se realizaron en las placas y se colocaron en la incubadora por 48 horas.

8) Se midieron los halos en el caso de haber presencia de inhibición.

3.3. Diseño

En el diseño del proyecto se realizaron una réplica por cada probiótico utilizado y para cada cepa bacteriana sembrada en las placas petri. Ver Figura 4.

3.4. Distribución de Presupuesto

En la tabla 1 se detallan los precios de los materiales y equipos utilizados para el proyecto.

3.5. Cronograma

En la tabla 2 se detalla el cronograma general del proyecto.

3.6. Limitaciones

3.6.1. Principales impactos (posología)

Material biológico

- Cepas probióticas.

Probiótico A (PA): Con tensiones de alta potencia de *Bacillus Subtilis*, *Lactobacillus Lactis*, *Nitrosomonas sp.* Y *Nitrobacter sp.* Que va de la mano con un adecuado activador y transportador. Ver tabla 3.

Probiotico B (PB): crea un medio ambiente más limpio, sano crecimiento en los criaderos de la Acuicultura y los estanques de engorda, elimina tóxicos de amoníaco y nitratos, mejora la salud animal y la resistencia a enfermedades mediante la creación de un entorno de probióticos. La presentación comercial no revela su contenido nutricional ni tampoco su contenido de microorganismos probióticos de su mezcla.

- Cepas patógenas.

Se utilizaron tres cepas patógenas para realizar las evaluaciones experimentales:

La cepa bacteriana de *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, aislada de camarones enfermos, proporcionadas por CSA Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).

3.6.2. Impacto Social

Usamos el mejor protocolo para determinar el halo de inhibición con mayor control bacteriológico, enfocamos al empleo de probióticos, como alternativa al uso de antibióticos bajo el principio de exclusión competitiva.

La aplicación de probióticos resulta viable, porque las bacterias probióticas ocupan espacios y demandan nutrientes del agua y del fondo del estanque, así como directamente del tracto digestivo de los camarones, reduciendo las posibilidades de colonización y desarrollo de otros microorganismos que sean patógenos o puedan convertirse en nocivos (Moriarty, 1999; Berger, 2000; Newman, 2000; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001; Gullian 2001).

3.6.3. Impacto Ambiental

El objetivo principal del uso de probióticos en Acuicultura es aumentar los beneficios de los organismos bióticos presentes en los sistemas de producción, mantener el equilibrio de los medios naturales sin perjudicar a ningún tipo de especies. No existe ningún tipo de explotación de los recursos al usar probióticos porque su composición se basa principalmente al tipo de sustrato que existe donde se lo va aplicar para que tenga rápida acción.

Se usan diferentes bacterias entre ellas las más conocidas las ácido lácticas (*Bacillus* sp.) La cepa *Vibrio alginolyticus* aislada por Morales Fide San Miguel en 1992, caracterizada por San Miguel (1996) y estudiada su efecto probiótico en larvas de camarón por Serrano (1996). Las cepas P62 y P63 (*Vibrio* sp.) y P64 aisladas del hepatopáncreas de animales silvestres sanos de *Litopenaeus vannamei* y estudiados sus efectos probióticos individualmente en camarones juveniles por Gullian (2001). Son las más comunes por su disponibilidad, rapidez de producción, y tecnología industrial desarrollada alrededor de este tipo de bacterias.

CAPITULO IV

4.1. Resultados:

Ambos probióticos probados en las diferentes cepas de vibrios fueron eficientes, hubo acción inhibitoria, muestran capacidad para inhibir el crecimiento de los microorganismos de manera efectiva, la diferencia entre los probióticos se da en el tamaño del halo.

- En el ensayo realizado para el *v. vulnificus*, con los probióticos **A** y **B** la variación de los diámetros de los halos es mínima como se demuestra en la tabla 4.
- En las aplicaciones realizadas para el *v. harveyi* entre el probiótico **A** y **B**, los halos de inhibición varían notoriamente en su tamaño, el probiótico **A** es muy pequeño en comparación con el probiótico **B**, que demuestra un amplio espectro de acción como se demuestra en la tabla 5.
- En las aplicaciones de los probióticos al *V. parahaemolyticus* los resultados fueron similares a los de las aplicaciones realizadas al *V. harveyi*, con una variación mínima del probiótico **A** en el tamaño del halo, el diámetro del probiótico **B** también demuestra un amplio espectro de acción como se demuestra en la tabla de resultados 6.

4.2. Recomendaciones

1. Para la inhibición del crecimiento bacteriano de los vibrios descritos en este trabajo se recomienda el uso de cualquiera de los dos probióticos, **A** ó **B**.
2. El probiótico con mayor espectro de acción es el probiótico **B**, mientras que el probiótico **A** tiene un espectro de acción pequeño también fue capaz de inhibir el crecimiento del *V. vulnificus* que es considerado el de mayor actividad patogénica.

4.3. Conclusiones

1. Entre los dos probióticos comerciales estudiados el que tiene mayor espectro de acción contra los microorganismos probados es el probiótico **B**.
2. Entre los microorganismos probados el orden de susceptibilidad de mayor variación se dio en el probiótico B, el *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, teniendo rangos de acción diferentes de mayor a menor diámetro respectivamente.
3. El probiótico **A** no presenta una variación notoria significativa como el probiótico **B**, *V. harveyi* y *V. vulnificus* presentan el mismo diámetro de acción en su halo de inhibición mientras que el *V. parahaemolyticus* es el más susceptible al probiótico A.
4. Ambos probióticos cumplen con las funciones específicas para las cuales fueron utilizados, independientemente del tamaño del diámetro del halo de inhibición los dos probióticos son eficaces para impedir el crecimiento bacteriano.

Anexos

A) Tabla I

Tabla I: Materiales y Costos

Material	Precio (\$)
15 Cajas Petri	1.95
3 Asas de Platino	36
3 Esparcidoras de cristal	6
12 Pipeta Pasteur	6
5 Pipetas (10 ml)	12
1 Probeta (100 ml.)	25
4 Frascos de vidrio (250 ml) con tapa plástica.	52.8
Micro pipetas (100 y 1000 ul.)	600
Puntas plásticas (100 y 1000 ul.)	7
200 ml. de Agar Marino	60
200 ml. de Agua de Peptona	60
Balanza	120
Autoclave	6000
Cámara de flujo laminar	17000
Incubadora	500
Papel aluminio	4.0
Bortex	400
Mechero de Bunsen	50
Fósforos	0.30
1 Erlenmeyer de 500 ml.	3.30
<i>Total de materiales</i>	24882

Fuente: Investigación realizada.

B) Tabla II

Tabla II: Cronograma de Actividades

ACTIVIDADES	TIEMPO
REVISION BIBLIOGRAFICA	1 MES
PARTE ANALITICA	1 MES
DOMESTICAR CEPA BACTERIANA	
REACTIVAR CEPA	
ELABORACION DE LA CURVA	
PREPARACION DE REACTIVOS	
CORRIDA DEL PROCEDIMIENTO	
ANALISIS DE RESULTADOS	1 MES
TOTAL DEL TIEMPO DEL PROYECTO	3 MESES

Fuente: Investigación realizada.

C) Tabla III

Tabla III: Composición Probiótica

Probiótico A (PA)

Descripción	Contenido
Ca	45.8 %
Si	3.8 %
Na	5.6 %
Mg	4.2 %
K	25.8 %
Bacillus subtilis	1 X 10 ⁹ UFC/g
Lactobacillus Lactis	1 X 10 ¹¹ UFC/g
Nitrobacter Sp.	1 X 10 ⁹ UFC/g
Nitrosomona Sp.	1 X 10 ⁹ UFC/g

Fuente: Investigación realizada.

D) Tabla IV

Tabla IV: Resultados de *V. Vulnificus*

TABLA DE RESULTADOS N°4	
Probiótico A	Probiótico B
<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
0,8 cm	1,15 cm

Fuente: Investigación realizada.

E) Tabla V

Tabla V: Resultados de V. Harveyi

TABLA DE RESULTADOS Nº5	
Probiótico A	Probiótico B
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
0,8 cm	1,7 cm

Fuente: Investigación realizada.

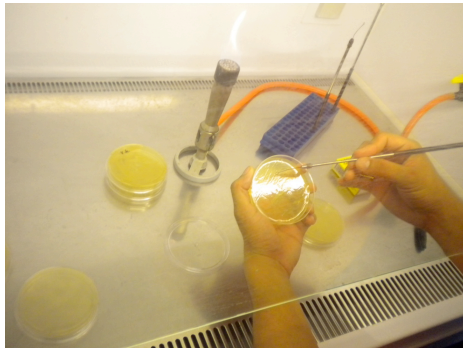
F) Tabla VI

Tabla VI: Resultados de V. Parahaemolyticus

TABLA DE RESULTADOS Nº6	
Probiótico A	Probiótico B
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
0,86 cm	1,6 cm

Fuente: Investigación realizada.

G) Figura 1



H) Figura 2



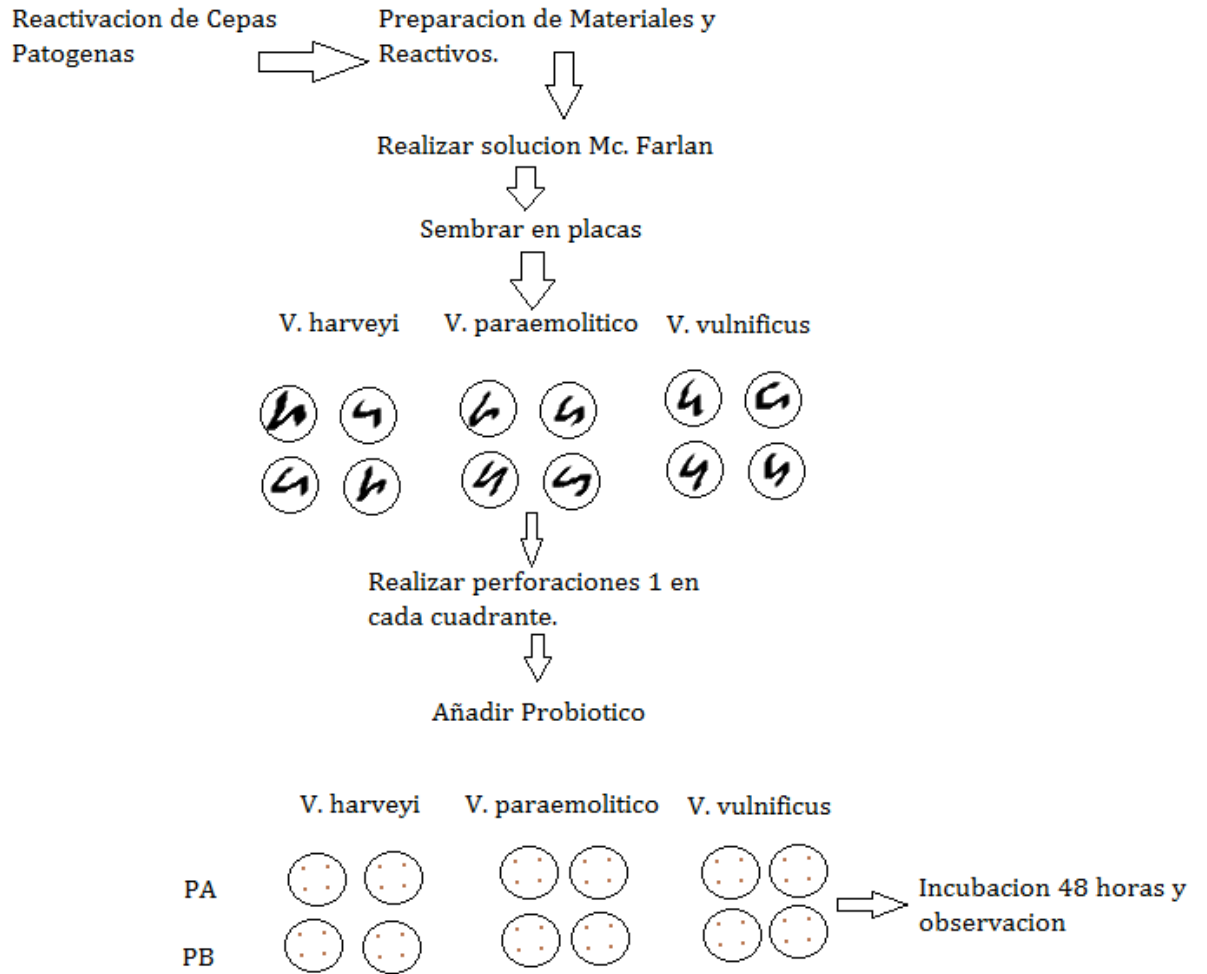
Fuente: Investigación realizada.

I) Figura 3



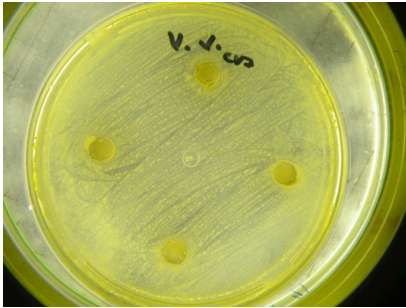
Fuente: Investigación realizada.

J) Figura 4

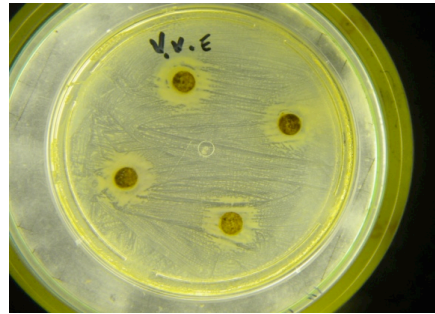


Fuente: Investigación realizada.

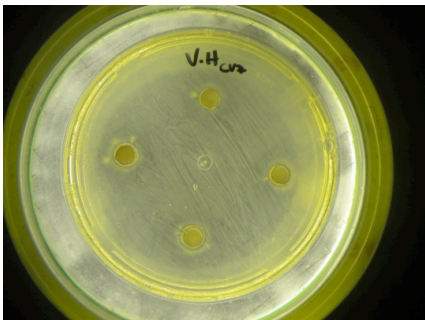
K) Figura 5 A



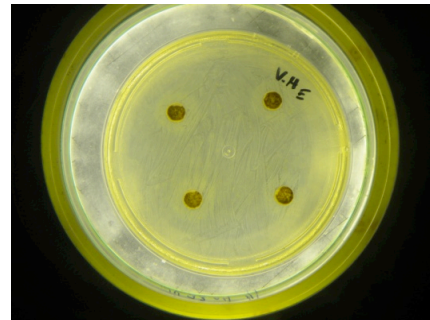
L) Figura 6



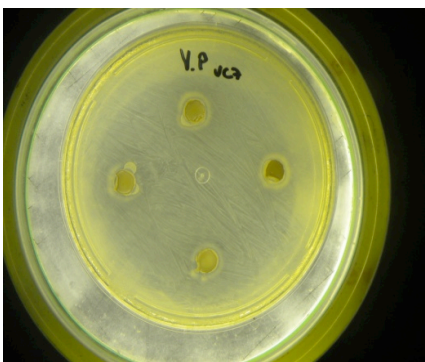
M) Figura 7



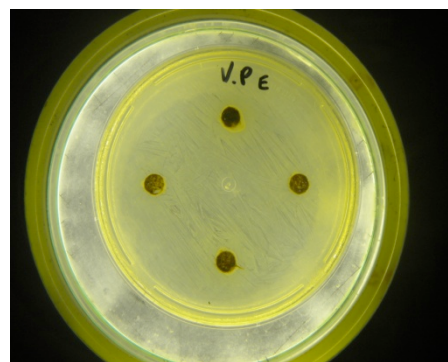
N) Figura 8



O) Figura 9



P) Figura 10



4.5. Referencias

- 1._ Enfermedades infecciosas, A. Restrepo *et al.*, corporación para investigaciones biológicas, 2003, Colombia.
- 2._ Lightner, D.V. 1996, A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA. The World Aquaculture Society.
- 3._ Brock JA and Lightner DV. 1990. Diseases of crustaceans Diseases caused by microorganisms, In: Kine O, ed. Diseases of Marine Animals, volumen 3: Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- 4._ Sindermann, C.J. 1990. Diseases of marine shellfish. En: Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Academic Press, Inc.
- 5._ Takahashi, M., Yokota, T., Kawano, H., Gondo, T., Ishihara, T. and Uchino, F. (1989). Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*
- 6._ Olafsen, J.A. (2001) Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture.

7._ Torkildsen, L., Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T. and Bergh, 2000. Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae.

8._ Probióticos en la Acuicultura, José Ángel Ronsón-Paulín y C. E. Medina-Reyna.

9._ Vadstein, O., Jensen, A., Olsen, Y., and Reinertsen, H., 1993, The role of planktonic bacteria in phosphorus cycling in lakes- Sink and Link.

10._ Thampuran, N., Surendran, P.K., 1998. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* in tropical fish and shellfish from Cochin (India).

11._ Fujino. T., Y. Okuo, D. Nakada et al. (1953). On the bacteriological examination of shirasu food poisoning.

12._ Honda, T., and T. Iida. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins.

13._ Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada, and A. Nakata. 1989. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins.

14._ Kelly, J.J., Kyle, R.A., Miles, J.M., and Dyck, P.J. (1983). Osteosclerotic myeloma and peripheral neuropathy.

15._ Tamplin, M., G. E. Rodrick, N. J. Blake, and T. Cuba. 1982. Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes.

16._ Motes. M.L., DePaola, A. 1996. Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*).

17._ Oliver, J. D., F. Hite, D. McDougald, N. L. Andon, and L. M. Simpson. 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment.

18._ Chuang JC, Wise SA, Cao SR, Judy LM (1992) Chemical characterization of mutagenic fractions of particles from indoor coal combustion: a study of lung cancer in Xuan Wei, China.