ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales.

"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DIFERENTES ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE DISTINTAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA ACUÍCOLA"

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentado por:

Marina Dalinda Chávez Alcívar

Kimberly Karolina Llanos Fernández

Guayaquil – Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

Las autoras deseamos agradecer en primer lugar a Dios por acompañarnos, guiarnos y permitirnos culminar una meta.

A nuestros padres y hermanos, por el amor, paciencia y el apoyo brindado a lo largo de nuestras vidas.

Al Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA), al Blgo. Alberto Lino ya que fue uno de los últimos proyectos que realizamos juntos en el laboratorio, por su infinita paciencia con nosotras y presta colaboración para la realización de este trabajo, a la Srta. Liliana Lima personal del CSA por el apoyo al ingreso de las instalaciones.

A nuestra tutora de tesis, Dra. Ana Tirapé, por sus conocimientos y su guía a lo largo de este proyecto.

A nuestros evaluadores, Dr. Marcelo Muñoz Naranjo y Dr. Washington B. Cárdenas, por las opiniones brindadas en el proyecto.

A nuestros profesores que nos formaron, en especial al M. Sc. Ecuador Marcillo y M. Sc. Francisca Burgos, que desde lejos nos brindaron apoyo incondicional.

Al Blgo. Javier Gilbert ya que sin él no hubiésemos sido el mejor equipo "bacteria" en laboratorio.

DEDICATORIA

A mis padres:

Walter Chávez y María Elena Alcívar

A mis hermanos

A mis tíos

A Daniel

A Juanito

A mis amigos

No sería quien soy, sin su apoyo y consejos.

Marina Dalinda Chávez Alcívar

DEDICATORIA

A mi mamá Cecilia Fernández por ser mi motivación a seguir con mis metas;

A mis hermanas Karlita y Konnig Llanos

A mi hijo Christopher

Y a Javi por ser su apoyo incondicional a lo largo de estos años

A todos los que creyeron en mí en especial al M. Sc. Eduardo Molina.

Kimberly Llanos Fernández

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Eduardo Cervantes, M.Sc.	Ana Jesenia Tirapé, Ph.D.
Presidente del Tribunal	**Directora de tesis**
Washington B. Cárdenas, Ph.D.	Marcelo Muñoz, Ph.D.
Miembro del Tribunal	**Miembro del Tribunal**

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta Tesis de Grado, nos corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la Escuela Superior Politécnica del Litoral"

(Reglamento de exámenes y títulos profesionales de la ESPOL)

Marina Dalinda Chávez Alcívar

Kimberly Karolina Llanos Fernández

RESUMEN

La industria acuícola en el Ecuador es de gran importancia por las altas divisas que genera durante todo el año (150 millones de dólares en Diciembre del 2014, Cámara Nacional de Acuacultura). Sin embargo, esta se ve afectada muchas veces por la aparición de enfermedades originadas por patógenos oportunistas, que de no ser descubiertos a tiempo pueden llegar a ocasionar pérdidas económicas importantes. Es una tendencia mundial, durante varias décadas, el combatir dichas enfermedades con en el empleo de antibióticos. Pero a partir del primero de enero del 2006, la Unión Europea prohibió el uso de antibióticos en la producción animal, debido a la posibilidad de transferir resistencia a especies bacterianas patógenas para los animales y seres humanos.

En este contexto, la búsqueda de alternativas a los antibióticos ha tomado mayor interés para encontrar sustancias que puedan inhibir el crecimiento de patógenos, tal es el caso de los ácidos orgánicos. De esta manera, el objetivo de

esta investigación fue la de analizar la actividad antibacteriana de diferentes ácidos orgánicos (Ac Fórmico, Ac. Cítrico, Ac. Láctico, Ac. Ascórbico y Ac. Etilendiaminotetraacético-EDTA), como una alternativa de menor costo al uso de antibióticos para contrarrestar enfermedades causadas por patógenos como *Vibrio vulnificus, V. harveyi, V. parahaemolyticus, Pseudomona aeruginosa* en la Industria Acuícola.

A fin de evaluar la capacidad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se realizó pruebas de laboratorio usando el Método de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Las cepas bacterianas seleccionadas ($1x10^5$cel/ml), previamente domesticadas, fueron sometidas a la acción diferentes concentraciones de ácidos orgánicos para poder determinar un efecto inhibitorio en el crecimiento de las mismas, a través de mediciones de absorbancia (650 nm de longitud de onda) y siembra en agar nutritivo (TSA con 2% NaCl). Los datos obtenidos se emplearon para calcular el porcentaje de inhibición y posterior evaluación estadística a través de un Análisis de Varianza de un factor ($p=0,02$).

Los resultados de este estudio indican que bajo condiciones de laboratorio, los ácidos orgánicos empleados poseen actividad antibacteriana y que pueden ser aprovechados como agentes inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas en cultivos acuícolas. Así mismo, podemos mencionar que se encontró más eficiencia inhibitoria en el EDTA y el Ácido Fórmico. El EDTA frente a *V. harveyi*

exhibió una capacidad inhibitoria a 100 ppm. Sin embargo, para ver sus efectos en el campo otros experimentos deben llevarse a cabo.

Palabras Claves: ácidos orgánicos, patógenos, acuicultura, bacterias Gram negativas, porcentaje de inhibición, EDTA y ácido Fórmico.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……VIII

ÍNDICE GENERAL……XI

ABREVIATURA……XIV

ÍNDICE DE TABLAS……XV

ÍNDICE DE GRÁFICOS……XVI

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES……XVIIII

INTRODUCCIÓN……1

CAPÍTULO 1……5

1. GENERALIDADES……5
   - 1.1 Ácidos Orgánicos…… 5
   - 1.2 Procesos de producción de Ácidos Orgánicos……6
     - 1.2.1 Ácidos orgánicos producidos por síntesis química……7
     - 1.2.2 Ácidos orgánicos extraídos directamente de fuentes naturales……12
     - 1.2.3 Ácidos orgánicos producidos por fermentación……12
   - 1.3 Breve descripción de los ácidos orgánicos empleados en el proyecto……14
     - 1.3.1 Ácido Cítrico……15
     - 1.3.2 Ácido Láctico……15
     - 1.3.3 Ácido Fórmico……16
     - 1.3.4 Ácido Ascórbico……16
     - 1.3.5 Ácido Oxálico……17
     - 1.3.6 EDTA……18
   - 1.4 Uso de Ácidos Orgánicos en las diferentes Industrias……18
     - 1.4.1 Uso de Ácidos Orgánicos en la Industria Acuícola……21
   - 1.5 Bacterias Patógenas de la Acuicultura empleadas en el proyecto……22
     - 1.5.1 *Vibrio vulnificus*……24
     - 1.5.2 *Vibrio harveyi*……26

1.5.3 *Vibrio parahaemolyticus*……26
1.5.4 *Pseudomona aeruginosa*……28
1.6 Modo de acción de los ácidos orgánicos en el crecimiento de bacterias……29

CAPÍTULO 2……35

2. Materiales y Métodos para las pruebas de evaluación in vitro……35
2.1 Materiales Biológicos……36
2.1.1 Cepas Bacterianas……36
2.1.2 Medios de Cultivo……37
2.1.3 Domesticación de bacterias……37
2.1.4 Productos a evaluar……39
2.2 Métodos……40
2.2.1 Preparación del inóculo bacteriano para las diversas pruebas……40
2.2.2 Método in vitro para determinar la capacidad antimicrobiana de ácidos orgánicos……42
2.2.2.1 Método de Concentración Mínima Inhibitoria……42
2.2.2.2 Medición de Absorbancia……43
2.2.2.3 Corroboración de inhibición de crecimiento bacteriano en placa……44
2.3 Análisis Estadístico……44

CAPÍTULO 3……45

3. RESULTADOS……45
3.1 Resultados *Pseudomona aeruginosa*……46

3.2 Resultados *Vibrio harveyi*……51

3.3 Resultados *Vibrio vulnificus*……57

3.4 Resultados *Vibrio parahaemolyticus*……62

DISCUSIÓN……64
CONCLUSIONES……69

RECOMENDACIONES……72

ANEXO A……75

ANEXO B……84

ANEXO C……85

BIBLIOGRAFÍA……88

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

CSA: Centro de Servicios para la Acuicultura.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

LDH: Lactato deshidrogenasa

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

NaCl: Cloruro de Sodio

Nm: Nanómetro

***P. aeruginosa*:** Pseudomona aeruginosa

ppm: Parte por millón

Sal. : Salinidad

TSA: Agar Tríptico de Soja

TSV: Síndrome de Taura

UFC: Unidades formadores de colonias

µl: Microlitros

***V. harveyi*:** *Vibrio harveyi*

***V. parahaemolyticus*:** *Vibrio parahaemolyticus*

***V. vulnificus*:** *Vibrio vulnificus*

WSSV: Mancha Blanca

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Uso de los ácidos orgánicos en las diferentes Industrias……..20

Tabla 2. Cálculo de número de células/ml a partir de la domesticación bacteriana……..39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Modo de acción de ácidos orgánicos sobre bacterias (insensibles al pH; arriba/ sensibles al pH: abajo)……..32

Gráfico 2. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Ascórbico……..46

Gráfico 3. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Fórmico……..47

Gráfico 4. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Láctico 85%.....48

Gráfico 5. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Oxálico……..49

Gráfico 6. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Etildiaminotetraacético……50

Gráfico 7. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Ascórbico……..51

Gráfico 8. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Cítrico……52

Gráfico 9. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Fórmico……53

Gráfico 10. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Láctico 85%……54

Gráfico 11. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Oxálico……55

Gráfico 12. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Etildiaminotetraacético……56

Gráfico 13. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Ascórbico……57

Gráfico 14. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Cítrico……58

Gráfico 15. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Fórmico……59

Gráfico 16. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Láctico 85%……60

Gráfico 17. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Oxálico……61

Gráfico 18. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con Ácido Cítrico……62

Gráfico 19. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con Ácido Oxálico……63

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Oxidación de alquilbencenos……8

Ilustración 2. Oxidación de alcoholes primarios……8

Ilustración 3. Oxidación de alquenos……9

Ilustración 4. Organometálicos con CO2……10

Ilustración 5. Hidrólisis de Nitrilo……10

Ilustración 6. Hidrólisis de Nitrilo en medio básico……11

INTRODUCCIÓN

Los ácidos orgánicos, compuestos que están presentes en la naturaleza tanto en plantas como en animales, son compuestos oxigenados que se presentan en diversas formas y concentraciones (1). En la actualidad, los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en diferentes industrias de interés para la humanidad, entre las que se incluyen la industria alimenticia, agrícola, acuícola y química (1). En la industria alimenticia, estos compuestos pueden ser empleados como aditivos en forma de agentes aglutinantes útiles para controlar la alcalinidad de muchos productos, pudiendo actuar como tampón químico o como agentes neutralizantes. Como conservantes, son aprovechados por sus características antimicrobianas. En su gran mayoría, la utilidad de los ácidos orgánicos en

ámbitos industriales se basa en distintos procesos de inhibición del crecimiento de bacterias patógenas de plantas, animales e inclusive del ser humano.
A manera de ejemplo citamos varios géneros como: *Salmonella, Pseudomona, Vibrios, Bacillus,* entre otros (1, 2).

Dentro de la industria de producción animal, se destaca el uso de compuestos orgánicos como el ácido acético y el ácido láctico, que son añadidos a las raciones alimenticias de animales para controlar la contaminación por bacterias como la *Salmonella* (3). Con respecto a la industria acuícola, la cual es el ámbito del presente proyecto, podemos citar el uso de ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Este es un ácido con efecto quelante, utilizado en el tratamiento de suelos y aguas de los cultivos larvarios de camarón para minimizar la biodisponibilidad de metales pesados en el cuerpo de agua, a través de su precipitación (4).

En el Ecuador, el cultivo de camarón representando por cerca del 95% de la producción acuícola del país. Esta actividad es una de las mayores fuentes de ingreso económico para el país; en el 2014 representó un ingreso anual de 150 millones de dólares (5). Sin embargo, esta industria se ha visto afectada en los últimos años debido a la aparición de enfermedades ocasionadas por virus o bacterias. Entre las cuales podemos mencionar brotes virales como el Síndrome de *Taura* (TSV), el virus de la mancha blanca (WSSV) y enfermedades bacterianas como la vibriosis causada por *V. harveyi, V. vulnificus, V.*

parahaemolyticus y V. alginolyticus. Los tres primeros vibrios, fueron empleados en el presente proyecto debido a las altas tasas de mortalidad que generan en los cultivos, si se suprime el uso de antibióticos (6, 7).

Los antibióticos son moléculas de síntesis químicas empleadas para inhibir el crecimiento y proliferación de patógenos microbianos, contrarrestando de esta forma las enfermedades. En la actualidad, estos compuestos están siendo restringidos por la resistencia que pueden inducir a distintos grupos de microorganismos, bien sea por mala administración de la dosis efectiva, o por nuevos mecanismos de respuesta que les permiten generar resistencia (8, 9).

Por lo antes mencionado, es evidente que las investigaciones de métodos alternativos de control bacteriano son muy relevantes. Es por esto que el uso de ácidos orgánicos ha incrementado notoriamente en las últimas décadas como una alternativa de menor costo a las actualmente vigentes para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos en la industria acuícola. Para el Ecuador sería vital implementar los resultados de este tipo de estudios ya que su uso en la industria acuícola disminuiría los costos en el control de enfermedades y, debido a que son en su mayoría productos finales de la fermentación de hidratos de carbonos por microorganismos, de baja toxicidad y rápida absorción, constituyen una alternativa amigable para el medio ambiente (10, 11, 12).

Por lo tanto, en este proyecto de tesis se planteó como objetivo general analizar la actividad antibacteriana y dosis efectiva de diferentes ácidos orgánicos que inhiban el crecimiento de bacterias patógenas Gram negativas, tales como *V. harveyi, V. vulnificus, V. parahaemolyticus* y *P. aeruginosa*, de gran interés en la industria acuícola.

CAPÍTULO I

1. GENERALIDADES

1.1 Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos son una variedad de ácidos que se encuentran usualmente en la naturaleza disponibles en los frutos de algunas plantas, en animales o como productos derivados de microorganismos; además se pueden obtener por distintos procesos químicos (1, 2).Estructuralmente son compuestos oxigenados que se derivan de los hidrocarburos los cuales al tener alto peso molecular como es el caso del ácido benzoico, poseen bajo potencial de disociación en agua.

Mientras que, los compuestos de bajo peso molecular como el ácido fórmico y láctico son miscibles en agua (1, 2, 4, 9).

Los ácidos orgánicos son compuestos que tienen propiedades ácidas, entre los más comunes tenemos los ácidos carboxílicos, cuya acidez se relaciona con su grupo carboxilo –COOH, los ácidos sulfónicos, que contienen el grupo –SO2OH son ácidos relativamente fuertes (9). La estabilidad referente a la base conjugada del ácido establece su acidez. Otros grupos de ácidos también pueden otorgar la acidez y, por lo general, suelen ser más débiles: -OH, -SH, el grupo enol y el grupo fenol. En los medios biológicos, compuestos orgánicos que contienen solo estos grupos no se conocen usualmente como ácidos orgánicos (1, 2, 9).

Diversos ácidos orgánicos, aislados en primer orden de fuentes naturales (plantas o animales), han sido sintetizados por procesos industriales; ejemplos de éstos son el ácido cítrico, fórmico, acético, málico, tartárico, salicílico, oxálico y los ácidos grasos (2, 10).

1.2 Procesos de producción de Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos y sus sales se producen de diversas maneras. Entre las principales se pueden citar:

- Producidos a través de síntesis química.

- Producidos a partir de la extracción de productos naturales.

- Producidos por fermentación en procesos industriales.

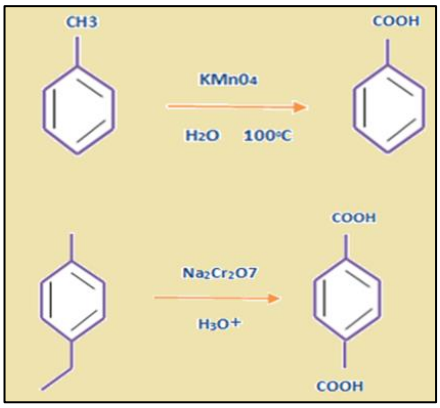
La mayoría de los ácidos orgánicos que son obtenidos microbiológicamente, proceden del ciclo de Krebs. En teoría son muchísimos los microorganismos capaces de sintetizarlos, aunque sólo unos pocos en cantidades adecuadas para la aplicación industrial. Así también, sólo unos pocos de estos ácidos son más rentables producidos por vía microbiológica que por vía química. Cabe mencionar que debido a que estos procesos de producción son extensos en este capítulo se describirán sus principales características (11, 13, 14).

1.2.1 Ácidos orgánicos producidos por síntesis química

Existen diferentes métodos para la producción de ácidos orgánicos por síntesis química, los cuales son descritos a continuación:

- **Oxidación de alquilbencenos:** Los bencenos sustituidos con grupos alquilo, partiendo de la oxidación con permanganato de potasio o dicromato de sodio, son compuestos capaces de producir ácidos carboxílicos (15).

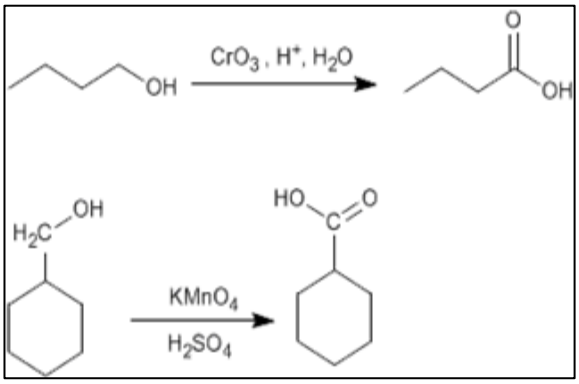
Ilustración 1. Oxidación de alquilbencenos



Fuente: Disponible en www.quimicaorganica.org

- **Oxidación de alcoholes primarios:** Otra forma de obtención de ácidos orgánicos es producto de la oxidación de alcoholes primarios. Para la producción de dicha reacción química, diversos reactivos pueden emplearse, por ejemplo el oxidante de Jones, permanganato de potasio y dicromato de sodio (15).

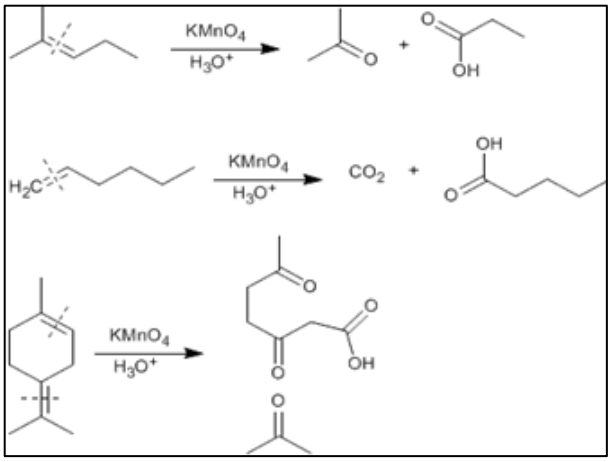
Ilustración 2. Oxidación de alcoholes primarios



Fuente: Disponible en www.quimicaorganica.org

- **Oxidación de alquenos**: La oxidación de alquenos con agentes oxidantes (permanganato de potasio), en una solución con medio ácido, es una metodología empleada para producir ácidos orgánicos, siempre y cuando el alqueno posea en su estructura atómica un átomo de hidrógeno sobre el carbono en el suborbital sp^2. En caso de que no se presente el átomo de hidrógeno, el resultado final sería la producción de cetonas y dióxido de carbono (15).

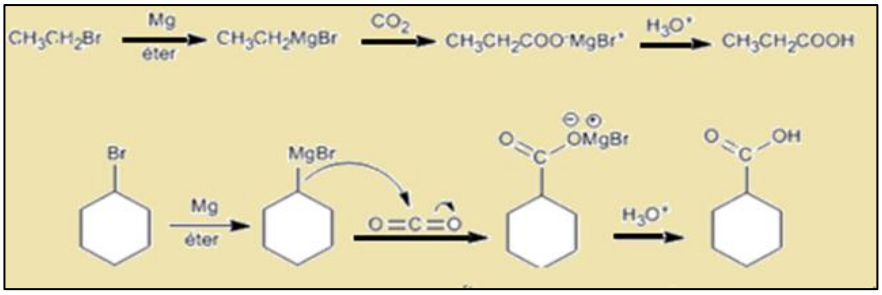
Ilustración 3. Oxidación de alquenos



Fuente: Disponible en www.quimicaorganica.org

- **Organometálicos con CO_2**: Los reactivos de Grignard (organometálicos de magnesio) reaccionan con dióxido de carbono para formar las sales de los ácidos carboxílicos. Una hidrólisis ácida posterior permite la conversión de estas sales en el correspondiente ácido (15).

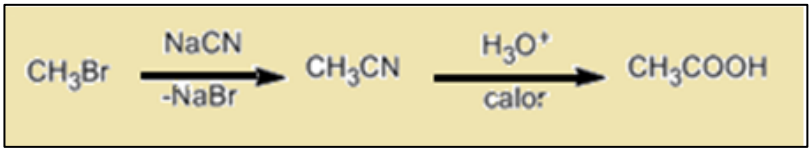
Ilustración 4. Organometálicos con CO_2



Fuente: Disponible en www.quimicaorganica.org

- **Hidrólisis de nitrilos:** A través de reacciones de sustitución nucleofílica tipo II, los haloalcanos primarios y secundarios que reaccionan con cianuro de sodio son capaces de producir nitrilos; compuestos que, posterior a una hidrólisis producen ácidos carbóxílicos. Este tipo de reacción permite seleccionar el ácido que se desea producir mediante el uso de haloalcanos con un carbono menos que el ácido a obtener (15).

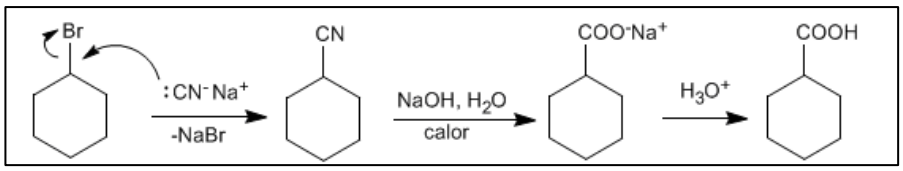
Ilustración 5. Hidrólisis de Nitrilos



Fuente: Disponible en www.quimicaorganica.org

Por otra parte, si la hidrólisis del nitrilo se lleva a cabo en medio básico, el producto final a obtener será un carboxilato, el cual se protona en una etapa de acidulación final (15).

Ilustración 6. Hidrolisis de Nitrilo en medio básico



Fuente: Disponible en www.quimicaorganica.org

Entre los principales ácidos orgánicos que se usan en la industria, para producirlos químicamente, se encuentran el ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido sórbico y ácido fumárico (13, 15).

De manera general, para la producción química de ácidos orgánicos, se necesita de una reacción de materias primas seguido de la separación del ácido de otras fracciones, para finalmente llegar como proceso final a la destilación; lo que permite producir el ácido a diversas concentraciones (15).

Para el proceso de producción de sales de ácidos orgánicos estas requieren ser neutralizadas con un agente apropiado dentro del reactor, tal es el caso de sales de amonio y sodio, resultando un líquido tamponado. En el caso de formas sólidas en materia prima, los pasos a seguir son la evaporación, cristalización y secado (11, 13).

1.2.2 Ácidos orgánicos extraídos directamente de fuentes naturales

El proceso de extracción de ácidos orgánicos a partir de fuentes naturales corresponde a procesos empíricos que han sido implementados desde la época de los 80 aproximadamente. En estos procesos, el punto primordial consistía en analizar y triturar organismos que por diversos factores, eran capaces de producir reacciones alergénicas y/o curativas en el ser humano (11, 13, 14).

Actualmente, este proceso ha sido implementado, modificado y tecnificado a mayor escala por diversos naturalistas. El proceso consiste en extraer ácidos orgánicos de fuentes naturales, empleando la destilación para separar mediante vaporización y condensación los diversos compuestos líquidos y sólidos que se encuentras disueltos en líquidos o gases licuados de una mezcla. Adicionalmente, es importante mencionar que, para conseguir esta separación de la manera más eficiente, la destilación se efectúa empleando los diferentes puntos de ebullición de cada sustancia (11, 14, 16).

1.2.3 Ácidos orgánicos producidos por fermentación

Tal como se mencionó con anterioridad, la fermentación es ampliamente utilizada para la obtención de ácidos orgánicos, la misma que consiste en un proceso metabólico realizado por microorganismos tales como levaduras, hongos o bacterias, en el cual los azúcares se convierten en ácidos, gases y/o

alcohol (13, 14, 16). Las condiciones de fermentación se ajustan dependiendo del ácido orgánico que se desee obtener; para ello es necesario considerar algunos factores, como la selección de ingredientes, microorganismos a emplear; así también, se debe tener control del pH y la temperatura. Después del proceso de fermentación, el caldo acuoso obtenido debe ser tratado para finalmente conseguir el ácido orgánico purificado. La eliminación de los microorganismos y la biomasa producida se realiza por calentamiento o aumentando el pH, seguido por decantación y filtración (13, 14, 16).

Entre los materiales necesarios para la producción de ácidos orgánicos por fermentación tenemos:

- Sustratos y/o materia prima
- Nutrientes para el crecimiento de microorganismos
- Agentes neutralizantes
- Microorganismos

Ejemplificación de los pasos a seguir en un proceso de fermentación para la obtención de ácido láctico:

- Fermentación
- Remoción de biomasa
- Acidificación

- Filtración de yeso
- Desmineralización
- Concentración, purificación y filtración

Basados en este método de obtención de ácidos orgánicos, el empleo de microorganismos permite producir otros ácidos orgánicos, por ejemplo usando celulosa como sustrato y un cultivo mixto de bacterias celulolíticas y *Clostridium acetobutylicum.* En este proceso la velocidad de producción del solvente se ve limitada por la lenta degradación de la celulosa, se puede obtener ácido propiónico (13, 14, 16).

1.3 Breve descripción de los ácidos orgánicos empleados en el presente proyecto

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos orgánicos se clasifican en ácidos de alto y bajo peso molecular. En el presente proyecto se empleó una diversidad de ácidos orgánicos entre los que se encuentra uno de los ácidos de menor peso molecular, como el ácido fórmico, y uno de los ácidos de alto peso molecular, como el cítrico.

A continuación se describen brevemente los ácidos empleados y sus principales características:

1.3.1 Ácido Cítrico.

Es un ácido tricarboxílico cuya fórmula molecular es $C_6H_8O_7$, y su nomenclatura sistemática es Ácido 2-hidroxipropano-1, 2, 3-tricarboxílico. Es un compuesto acidulante soluble en agua, éter y etanol, que a temperatura ambiente (22ºC) se descompone en carbono y agua. Su descubrimiento se atribuye al alquimista Jabir lbn Hayyan en el siglo VIII (17). Adicionalmente se conoce que este ácido cumple un rol como controlador de pH en alimentos y que se caracteriza por su sabor agradable. En bioquímica aparece como un metabolito intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílico, proceso realizado por la mayoría de los seres vivos. Adicionalmente, el ácido cítrico es un sólido incoloro, con forma de cristales granulares, anhidro, inodoro, traslúcido fluorescente al aire, el mismo que se puede descomponer a una temperatura mayor a 175°C (17, 18).

1.3.2 Ácido Láctico

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanóico, es un ácido carboxílico representado por la fórmula química H_3C-CH (OH)-COOH. Se encuentra como un líquido incoloro que, en ocasiones, puede presentarse con tonalidad ligeramente café. Descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, por su aislamiento a partir de la leche agria. Es reconocido en 1847 por el científico Blonodeaurse como un compuesto producido a partir del ácido pirúvico por intervención de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en procesos de fermentación,

característica que posteriormente fue ratificada en 1881 (19, 20, 21). Además, podemos mencionar que dicho ácido posee diversos usos y aplicaciones, por ejemplo en la industria alimenticia como regulador de acidez; inclusive en diagnósticos clínicos médicos como medida diferencial de meningoencefalitis bacteriana (10, 22).

1.3.3 Ácido Fórmico

El ácido fórmico o ácido metanóico, es el ácido orgánico más simple, conformado por un solo átomo de carbono y representado por la fórmula química (CH_2O_2). Fue inicialmente aislado por el naturalista John Ray en 1671, como producto de la destilación de un conglomerado molido de hormigas rojas, *Formica rufa*, de donde se deriva su nombre (23). El ácido fórmico es empleado como aditivo preservante en materias primas capaz de ser digerido por los animales, el mismo que, debido a su fuerte propiedad bactericida ha sido utilizado también a nivel industrial en mezclas de pienso animal para inhibir bacterias patógenas (24, 25).

1.3.4 Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico también conocido como vitamina C, ácido cevilámico o antiescorbuto, está representado por la fórmula química $C_6H_8O_6$, y su nomenclatura sistemática es Ácido 5-((s)-1,2-dihidroxietil)-3,4-dihidroxifuran-2(5H)-ona. Es un ácido con propiedades reductoras debido a su estructura

enediol y la capacidad de desplazar el ácido L-ascórbico a su forma oxidativa L-dehidro-ascórbico, permitiendo que la molécula pueda eliminar radicales oxidativos y acuosos (26). Su descubrimiento se debe a dos médicos noruegos que dejaron establecido la presencia de una sustancia o químico en frutos como el limón, con ciertas propiedades que prevenía el escorbuto y lo llamaron vitamina C (27).

Por otra parte, químicamente, el ácido ascórbico se puede sintetizar a partir de la glucosa, la cual se degrada con mucha facilidad mediante procesos oxidativos por la transferencia de electrones debido a su pH, concentración de oxígeno, enzimas y/o catalizadores metálicos (26, 28, 29).

1.3.5 Ácido Oxálico

El ácido oxálico o ácido etanodióico, cuya fórmula química es $C_2H_2O_4$, es uno de los ácidos dicarboxílicos más simples (30). El ácido oxálico fue descubierto por primera vez en plantas del género *Oxalis*, por el científico Wiegleb y posteriormente aislado en alimentos como la espinaca, chocolate y frijoles. Sus características básicas son la insolubilidad en benceno y su elevada solubilidad en agua, alcohol etílico, éter y glicerol (31).

1.3.6 EDTA

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), representado por la fórmula química $C_{10}H_{16}N_2O_8$, y cuyo nombre sistemático es Ácido 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil}(carboximetil)amino)acético, es un ácido orgánico tetra carboxílico, sólido, incoloro y anhidro, derivado del etano (32). El EDTA es empleado con mayor frecuencia como reactivo analítico debido a su propiedad química de combinarse a iones metálicos en una solución (33, 34). Su descubrimiento no está esclarecido debido a que es un derivado comúnmente obtenido como producto de diversas combinaciones de sustancias químicas para potencializar su concentración y efecto (34). La "Food and Drug Administration" (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado su uso como conservante químico que se puede emplear en la industria alimenticia debido a su acción quelante; mientras que la "Organización Mundial de la Salud" (OMS) ha evaluado y establecido que la ingesta diaria aceptable es de 2,5 mg/kg por persona (32, 34).

1.4 Uso de Ácidos Orgánicos en las diferentes Industrias

A partir de la década de los 40, los ácidos orgánicos e inorgánicos han sido utilizados en la dieta de diversos animales de producción y cultivo, debido a su potencial de reducir el pH dentro del estómago e incrementar la digestibilidad de los nutrientes (9, 35). Podemos encontrar algunos ácidos orgánicos presentes en los alimentos o por acumulación por los procesos de fermentación. Pero también estos se pueden añadir de forma intencionada en la formulación

alimenticia (36, 37). De esta manera cabe recalcar la importancia que ha traído a la industria animal, el uso de ácidos orgánicos, principalmente los de cadena corta como el ácido fórmico, el ácido láctico y el ácido propiónico; siendo este último empleado durante diversos años como inhibidor de hongos en piensos para la industria ganadera (38, 39).

En la actualidad, el uso de ácidos orgánicos ha ido incrementando en diferentes industrias de interés para la humanidad, su importancia ha sido evaluada en industrias como la alimenticia, agrícola, acuícola y química. En las cuales principalmente se ha observado una disminución del uso y aplicación de compuestos químicos como antibióticos que, debido a su mala administración, han generado resistencia microbiana a los mismos y, a su vez, posible problemas ambientales de contaminación (40, 41, 42, 43). En su gran mayoría, la utilidad de los ácidos orgánicos en ámbitos industriales se basa en distintos procesos de inhibición del crecimiento de bacterias como la *Salmonella, Pseudomonas, Vibrios, Bacillus*, entre otras (42, 43).

Algunas industrias que se benefician del uso de los ácidos orgánicos empleados en el presente proyecto se muestran en la Tabla 1

Tabla 1. Uso de los ácidos orgánicos en las diferentes Industrias.

Acido Orgánico	Industria	Usos	Referencia
Ácido Láctico	Alimenticia	Acidulante y conservante	(13, 19,20,21)
	Farmacéutica	Producción de drogas ricas en hierro y calcio.	
	Química	Solubilizador y agente controlador de pH.	
	Médica	Polímero biodegradable, precursor del ácido poliláctico (polímero biodegradable de interés en uso médico)	
Ácido Cítrico	Alimentos y Bebidas	Retarda oxidación de las grasas, ajusta pH, mejora sabor, inactivar enzimas.	(17, 18)
	Farmacéutica	Anticoagulante, disolución de ingredientes activos, mejora sabor.	
	Cuidado Personal	Ajuste pH, quelación de iones metálicos.	
	Detergentes y Limpiadores	Buffer, secuestra trazas de iones metálicos.	
	Transporte	Usado en asientos, pisos, ventanas,	
	Consumo Humano	Quelación de iones metálicos, desinfección de agua, frutas, verduras,	
	Industria Avícola	Eliminar bacterias del ambiente y de huevos de cascarón.	
Ácido Fórmico	Textil	Secante para teñido y como agente reductor	(23, 24, 25)
	Agroquímica	Manufactura de fumigantes e insecticidas	
	Saborizantes y Perfumes,	Formación de esteres característicos	
	Avícola	Tratamiento contra Salmonera en balanceados	
Ácido Ascórbico	Agrícola	Promotores de germinación de semillas, crecimiento de raíces, evitar el daño por ozono y polución.	(25, 26, 27, 28, 29)
	Piscicultura	Fuente de vitamina c en dieta.	
	Veterinaria	Contrarresta enfermedades virales en caninos y felinos.	
	Alimenticia	Inhibe procesos oxidativos, estabilizador de color y sabor en carnes.	
Ácido Oxálico	Textil	Blanqueo y recuperación de tejidos manchados por hierro, catalizador para planchado permanente.	(30, 31)
	Cuero	Blanqueo y protección contra la putrefacción de cueros curtidos.	
	Construcción	Pulir pisos de mármol y descurtidos de baños, sanitarios y lavamanos.	
	Lavanderías	Remoción de hierro y otros metales que manchan ropa	
	Metal-mecánica	Remover óxidos y depósito de películas que proveen protección y lubricación.	
EDTA	Medicina	Quelador de metales pesados tóxicos	(32, 33, 34)
	Salud e Higiene	Componente quelador de shampoo, agentes líquidos, cremas, lociones y productos de higiene.	
	Farmacéutica	Antioxidante	
	Ambiental	Quelador de metales pesados (Calcio y Cadmio) principalmente en aguas residuales	

1.4.1 Uso de Ácidos Orgánicos en la Industria Acuícola

El incremento en la investigación con ácidos orgánicos durante los últimos 10 años ha tomado considerable importancia debido a la poca efectividad de distintos antibióticos para contrarrestar enfermedades como consecuencia de mecanismos de respuesta bacteriana, producto de la aplicación incontrolada de antibióticos o a la mala aplicación de la dosis efectiva (12, 21, 44).

En la actualidad se está buscando alternativas para reemplazar los antibióticos por productos más amigables con el ambiente, que fortalezcan el sistema inmune de los organismos y que eviten el crecimiento de bacterias patógenas (44).

En los cultivo de camarón, el uso de antibióticos para contrarrestar distintas enfermedades bacterianas se ha vuelto menos frecuente en la actualidad, incrementando las investigaciones con ácidos orgánicos, llegando a obtener mezclas de ácidos orgánicos con probióticos que son empleadas como aditivos en el alimento para el camarón y como sustrato para evitar la proliferación de bacterias en las piscinas de cultivos. (21, 42, 44).

De esta manera, diversos estudios indican que la presencia de ácidos orgánicos en conjunto con el balanceado, incrementan la productividad de cultivos de

origen acuícola y/o marino en gran parte del mundo; reduciendo las infecciones bacterianas e incrementando la tasa de supervivencia de los organismos cultivados (44).

La combinación de probióticos con ácidos orgánicos, en el alimento balanceado, ha dado excelentes resultados como biorremediadores en la acuicultura (45). Otro uso de los ácidos orgánicos en esta industria es para mejorar la salud integral del organismo cultivado, principalmente en los que se refiere al tracto digestivo, usando una combinación de bacterias acido lácticas y levaduras (44, 46).

1.5 Bacterias Patógenas de la Acuicultura empleadas en el proyecto

En la acuicultura desde los años 90 se han reportado casos de enfermedades severas causadas por bacterias patógenas, una de las cuales ocurrió en el año 1996, donde se reportó una pandemia causado por el género *Vibrio*, expandiéndose principalmente por Asia, Rusia, norte de Estados Unidos, Canadá y Chile (6, 47).

El género *Vibrio,* un serio patógeno para los animales criados en la acuicultura y además considerado como un microorganismo oportunista para el camarón y otras especies de vida marina (44, 48). La Vibriosis, es una de las enfermedades más prevalentes en peces y otros organismos criados en acuicultura (48, 49).

Además, dicha enfermedad es responsable de gran parte de la mortalidad en los sistemas acuícolas en todo el mundo, dentro de los cuales podemos enumerar al *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, y *V. splendidus* que se asocian directamente con enfermedades del camarón (44, 49).

Estos patógenos pueden estar presentes en diferentes etapas del cultivo de camarón, tanto en la fase larvaria como en la de engorde. Entre los diversos tipos de bacterias podemos indicar que las bacterias luminiscentes son las que mayormente afectan en los laboratorios de larvicultura, presentando altas tasas de mortalidad (44, 48, 49).

En el cultivo de camarón, distintos tipos de Vibrios proliferan cuando los animales se encuentran con su sistema inmune deprimido a causa de diversos factores ambientales (temperatura, pH, salinidad, entre otros) (48, 49, 50). Brevemente podemos enunciar que en la fase de engorde los vibrios que mayormente predominan son *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, mientras que en la fase larvaria el más predominante es el *V. harveyi*. Subsecuentemente, en cualquiera de estas fases, es posible encontrar Vibrios dentro de los organismos de cultivo, tanto en el hepatopáncreas como en la hemolinfa (45, 48, 50).

Adicionalmente, las *Pseudomonas* son conocidas por su carácter de oportunistas, es decir, especies de bacterias que pueden afectar a organismos sensibles producto de una enfermedad previa o momentánea causada por otros patógenos

(51). Adicionalmente, este patógeno tiene la característica de generar altos niveles de resistencia a antibióticos, causando altas tasas de mortalidad en los cultivos acuícolas; motivo por el cual su uso en el presente proyecto fue primordial para conocer su comportamiento frente al uso de ácidos orgánicos como reemplazo de antibióticos (52, 53).

Por consiguiente, las cepas empleadas para el presente proyecto, definidas por el alto impacto en la industria acuícola, fueron *V. harveyi, V. vulnificus, V. parahaemoliticus* y *P. aeruginosa,* las cuales fueron suministradas por el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA-ESPOL).

1.5.1 Vibrio vulnificus

El *V. vulnificus* pertenece a la familia Vibrionaceae, son bacterias Gram negativas, oxidasa positiva y anaerobia facultativa. Posee forma de bastoncillo con gran movilidad debido a la presencia de un flagelo polar, no forma esporas ni cápsulas y tolera alcalinidades relativamente altas, hasta el pH 9 (49, 54,55). Esta bacteria fue descrita por primera vez en el año de 1976 y se lo denominó *Vibrio lactosa positivo*. Posteriormente se lo nombró *Beneckea vulnificus* y finalmente se lo designó como *V. vulnificus* (49, 54, 55).

El *V. vulnificus* es muy común en aguas de estuario, especialmente de climas tropicales. Sin embargo, se la puede encontrar también en sedimento marino,

plancton, etc. (49, 56). El *V. vulnificus*, es una de las especies que ha sido reportada como patógena para el ser humano de entre las 30 especies de Vibrio descritas, pudiendo causar infecciones cuando se exponen las heridas al agua de mar, además de causar septicemia primaria y gastroenteritis (49, 54, 56). Una de las vías por las cuales el ser humano puede enfermarse a causa de este microorganismo es por la ingesta de animales crudos (peces, ostiones, mejillones, entre otras), por lo cual, el aumento en número de esta especie en la pesca está relacionado con el incremento de algunos parámetros físicos y ambientales como la temperatura, el pH, la salinidad y el incremento de materia orgánica (49, 54, 55).

En consecuencia, la especie de *V. vulnificus* ha sido reportada en la zona costera del Golfo de México en los ostiones y en el agua durante la época lluviosa o cuando hay incrementos en la temperatura del agua, generalmente a partir de 23°C (49, 55). Además, se ha reportado que durante los meses de abril a octubre hay una mayor probabilidad de que los ostiones que han sido capturados contengan este patógeno, ya que pueden prevalecer en simbiosis con dichos bivalvos a través de la adhesión a su concha (49, 57).

1.5.2 Vibrio harveyi

Este microorganismo, Gram negativo, ha sido aislado en varios puntos geográficos; se lo puede encontrar tanto en zonas costeras como en aguas abiertas; inclusive, también se ha podido aislar en heces de peces y de calamares (58).

Ha sido denominado uno de los mayores causantes de enfermedades en los cultivos de invertebrados marinos, por ejemplo, el cultivo de camarón (58, 59). Entre las enfermedades más importantes que causa *V. harveyi* tenemos la mancha blanca del pie en los abalones japoneses, Vibriosis luminiscente, las bolitas negras en los camarones penaeidos, y ulceraciones en pepinos de mar (58, 59, 60).

Dentro de los cultivos de camarón, en Ecuador se ha relacionado al *V. harveyi*, con las muertes masivas de larvas de camarón, caracterizadas por una diferencia patológica en el hepatopáncreas, degenerando este tejido a través de la formación de "bolas" que se mueven en el intestino superior, y generan luminiscencia y falta de apetito (60, 61).

1.5.3 Vibrio parahaemolyticus

El *V. parahaemolyticus* es un organismo de vida marina, que se encuentra comúnmente en sedimentos, plancton, almejas, calamar, ostiones, entre otros

(55, 62). Esta bacteria se caracteriza por encontrarse presente en la quitina de algunos organismos como el camarón, alcanzando altas concentraciones debido a la disponibilidad de nutrientes presentes en dichas estructuras (62).

Este microorganismo que mide aproximadamente de 1.4 a 2.6 μm de longitud y de 0.5 a 0.8 μm de diámetro. Crece favorablemente a una salinidad de 3-8%, teniendo un óptimo crecimiento a temperaturas de 35-37°C. Son móviles, su tiempo de generación es de 10 a 12 minutos y es uno de los microorganismos que tolera el oxígeno con un metabolismo oxidativo y fermentativo (62).

Una de las características principales de este Vibrio es que fermenta glucosa sin producir gas, además de fermentar manitol, arabinosa y manosa, con excepción de sacarosa, lactosa, inositol y ramnosa (55, 62, 63, 64). Una de las vías de infección al ser humano es por la ingesta de animales marinos como pescados y mariscos enfermos. Usualmente causa gastroenteritis por la ingesta cruda o de poca cocción de estos animales (62, 63, 64). Por este motivo, el *V. parahaemolyticus*, al ser un organismo marino, es una de las principales causas de gastroenteritis en Japón. Además, se le ha responsabilizado por brotes de trastornos semejantes en otras partes del mundo incluyendo Estados Unidos (62, 64).

1.5.4 Pseudomona aeruginosa

La *P. aeruginosa* tiene forma de bastones finos, mide de 1-3 µm de largo y 0,5-1,0 µm de ancho. Tienen la facultad de producir un pigmento como la "pioverdina" que da un color verde amarillento o marrón amarillento. Son bacterias Gram negativas que poseen un flagelo polar único y se caracterizan por ser desnitrificantes (65, 66).

Adicionalmente, la *P. aeruginosa* se encuentra entre las *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a infecciones de los tractos respiratorios y urinario en seres humanos; no es considerado un parásito estricto debido a su condición de patógeno oportunista altamente adaptable, el cual puede iniciar una infección cuando un individuo se encuentra con defensas bajas (66). Estos microorganismos al ser patógenos oportunistas, se encuentran comúnmente en medios hospitalarios en pacientes con problemas hematológicos, tumorales, infecciones por traqueotomías, transfusiones, entre otras, en pacientes con tratamientos prolongados (67, 68, 69).

Este microorganismo, que se encuentra tanto en el suelo como en el agua y generalmente son oportunistas de plantas y animales, es mayormente resistente a muchos de los antibióticos utilizados rutinariamente; resistencia que se puede deber a la transferencia de plásmidos o a su capacidad de sobrevivir a una variedad de ambientes, incluido los ambientes acuícolas (67, 69).

Por este motivo, debido al uso inadecuado de diversos antibióticos dentro de la industria acuícola, la *P. aeruginosa* se ha convertido en un patógeno de interés de estudio debido a su resistencia a antibióticos, lo cual, por ser causante de enfermedades relacionadas con el sistema respiratorio en el ser humano, podría generar múltiples complicaciones (67).

1.6 Modo de acción de los ácidos orgánicos en el crecimiento de bacterias

Los ácidos orgánicos poseen diferentes modos de acción referente a la inhibición del crecimiento bacteriano, los cuales no son totalmente conocidos hasta la actualidad. Por ejemplo, uno de los mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal podría estar relacionado al incremento en la digestibilidad y retención de diversos nutrientes, modificando así la población microbiana del mismo (70, 71, 72, 73).

Adicionalmente, el potencial como inhibidores del crecimiento bacteriano depende de su poder acidificante y la capacidad de penetrar en forma no disociada en la pared celular de microorganismos, alterando su metabolismo y pudiendo ocasionar su muerte (35, 66, 71). En este contexto podemos indicar que, diferentes ácidos como el acético y cítrico son ácidos orgánicos débiles que ejercen un efecto mayor debido a la presencia de moléculas altamente permeables y no disociadas que promueven la penetración del ácido a la bacteria, pudiendo generar su muerte o inhibición del crecimiento (3, 73).

De igual manera, agregado al efecto antibacteriano, diferentes ácidos orgánicos poseen efectos antifúngicos, los mismos que se producen al ingresar a la célula y alterar sus funciones. Dichos ácidos pueden ingresar a la célula fúngica de la molécula no disociada. La constante de disociación del ácido y el pH del medio son los factores más importantes debido a que los aniones orgánicos penetran lentamente mientras que las formas no disociadas lo hacen rápidamente (3).

Finalmente, basados en el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos, podemos mencionar que sus diferentes modos de acción se basan en la acidificación del medio externo, acidificación del citoplasma, acción sobre los lípidos y proteínas de las membranas, quelación de metales y acción sobre el metabolismo (35).

Acidificación del medio externo.

La acidificación es el proceso en el cual un elemento se modifica obteniendo características ácidas, de ese modo es posible que el efecto antimicrobiano sea positivo por la adición de ácidos orgánicos a alimentos y bebidas; acción que provocaría un aumento de la concentración de protones (descenso del pH), lo que conllevaría a la muerte de los microorganismos (73).

De igual manera, se conoce que con un pH menor a 4,0 se podría inhibir el desarrollo vegetativo y con un pH menor a 4,5 podría existir inhibición en la germinación de esporas, en mohos y levaduras que pueden desarrollarse a un

pH de 1,6 (74). Por consiguiente, el pH necesario para el crecimiento de microorganismos al emplear acidulantes ácidos vs ácidos débiles, sería menor al pH óptimo para su desarrollo, lo que hace suponer que la inhibición por ácidos orgánicos se llevaría a cabo por la interacción con otros mecanismos (50, 74).

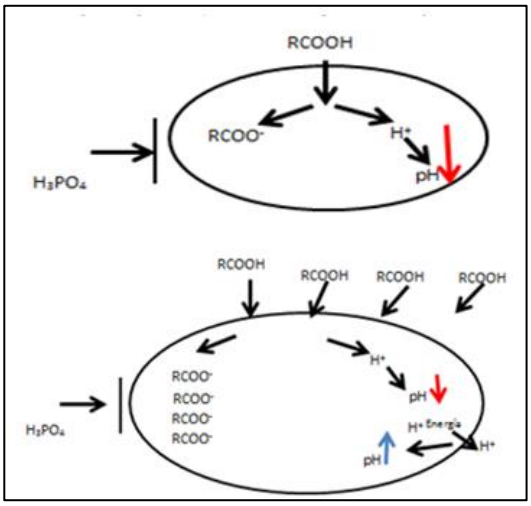
Acidificación del citoplasma.

Los ácidos orgánicos se encuentran en equilibrio en una solución dependiendo del pH del medio entre las moléculas del ácido y su anión (75). Subsecuentemente, la disociación del ácido, separación de un protón, va aumentando conforme el pH disminuye. Adicionalmente, esta acidificación, producto de la presencia y actividad de ácidos orgánicos, provoca un declive de la actividad antimicrobiana, inhibiendo prioritariamente la glicólisis y el transporte activo a través de la membrana plasmática. Esto provoca un déficit en la actividad celular y posiblemente la alteración y ruptura de la membrana. Es importante mencionar que este mecanismo no se aplica para ácidos insuficientemente hidrofóbicos (76).

Este mecanismo de acción antimicrobiano de los ácidos orgánicos provoca la liberación de protones y aniones (desbalance osmótico), convirtiendo a la célula en sensible a las alteraciones del medio externo, en respuesta a lo cual se activan los mecanismos “bomba de H^{+}” y “ATPasa”, consumiendo altas cantidades de

energía, deteniendo por consiguiente su crecimiento y provocando la muerte (73, 76).

Gráfico 1. Modo de acción de ácidos orgánicos sobre bacterias (insensibles al pH: arriba/ sensibles al pH: abajo)



Fuente: Elaborado por las autoras

Acción en lípidos y proteínas de membranas

Los ácidos orgánicos por sus propiedades lipídicas, al contacto con la célula, pueden emplear los canales lipídicos como difusión simple o en su defecto, el transporte activo producto de la interacción con canales proteicos (77).

Adicionalmente, una vez encontrados los ácidos en el interior de la célula, su porción lipídica puede adherirse y formar parte de la membrana citoplasmática, influyendo en la fluidez de la misma (aumento en la porosidad), incrementando

la permeabilidad para protones e iones los cuales, en últimas circunstancias, podrían provocar una alteración interna de pH de la célula, la cual puede recurrir en una inhibición de diversos procesos celulares (76, 77).

Quelación de metales.

Los ácidos orgánicos tienen propiedades quelantes, uno de los más conocidos su acción queladora de metales pesados en diferentes industrias, por ejemplo en medicina como agente quelador en casos de arterosclerosis, es el ácido etilendiaminotetraacético (78). Dicho mecanismo de quelación se fundamenta en que los cationes metálicos formen complejos con los aniones cargados negativamente, generando complejos que precipitan, ejemplos claros de este proceso se evidencian en el caso de los citratos de calcio, lactato de calcio y en el vino (79).

El mecanismo inhibitorio de microorganismos, basado en el principio químico de quelación, se produce mediante la adhesión y eliminación de iones metálicos del medio y de cationes en la pared del microorganismo, aumentando la susceptibilidad celular en bacterias Gram negativas, en las cuales, la eliminación de iones metálicos de la pared celular aumenta su susceptibilidad ante diversos agentes como antibióticos, ácidos orgánicos o diversos agentes que provoquen toxicidad (79).

Acción sobre el metabolismo.

Los ácidos en general son moléculas reactivas las cuales se encuentran involucradas en diversas actividades como procesos de respiración, fermentación y en interacción armónica con procesos que involucran enzimas específicas (80).

Por este motivo, la inhibición del metabolismo celular se puede dar a causa de diferentes ácidos orgánicos; los mismos que provocarían toxicidad celular, como resultado de la acumulación de aniones en el interior de la célula (80).

CAPÍTULO II

2. Materiales y Métodos para las pruebas de evaluación in vitro

El desarrollo del proyecto tiene como puntos primordiales la selección y uso de diversos ácidos orgánicos y bacterias patógenos de la industria acuícola.

Dentro del marco de selección de los ácidos orgánicos se tuvo como criterio primordial la selección de los más disponibles en la literatura consultada, para poder efectuar contrastes al momento de evaluar los resultados. De esta primera selección se procedió a efectuar la adquisición de los ácidos orgánicos, los mismos que fueron en su totalidad de síntesis química, por su bajo costo y disponibilidad en el mercado.

Los ácidos orgánicos seleccionados poseen diversas funciones en la industria animal, las cuales ya han sido descritas en el Capítulo I. La mayoría de ellos, según la literatura, presentan inhibición bacteriana principalmente en países europeos.

La selección de las cepas bacterianas obedece a la disponibilidad de patógenos que se encuentran frecuentemente en cultivos acuícolas y que se relacionan comúnmente a enfermedades, tanto para larvas como para estadíos de desarrollo más avanzados del cultivo de camarón.

2.1 Materiales Biológicos

2.1.1Cepas Bacterianas

Para el presente proyecto se emplearon cuatro de las principales cepas bacterianas patógenas de la industria Acuícola del Ecuador, las cuales fueron aisladas de cultivos de camarones enfermos y proporcionadas por el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA). Dichas cepas correspondieron a:

- *Pseudomona aeruginosa*,
- *Vibrio harveyi*,
- *Vibrio vulnificus*,
- *Vibrio parahaemolyticus*

2.1.2 Medios de Cultivo

La activación del crecimiento bacteriano en placa a partir de los viales proporcionados por el CSA se la realizó en medio de cultivo de "Agar Tríptico de Soja" (TSA por sus siglas en inglés), al cual se le ajustó la salinidad al 2% con NaCl.

Por otra parte, tanto para la domesticación bacteriana como para el crecimiento bacteriano necesario para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés), se empleó como medio líquido agua de peptona y como medio sólido TSA, ambos al 2% de NaCl. Además, previo a efectuar las MICs de cada bacteria y ácidos orgánicos, al momento de efectuar las diluciones de los microorganismos también se usó como medio líquido agua de peptona al 2% de NaCl. De igual manera, Agua Destilada autoclavada, fue necesaria para la preparación de los medios de cultivo y la dilución de los ácidos orgánicos.

2.1.3 Domesticación de bacterias

Los cultivos de bacterias en el laboratorio producen importantes variaciones que se heredan y perduran. El presente trabajo supuso un proceso de domesticación. En el proceso de domesticación se dispuso del número de células/ml semejante a la densidad óptica o absorbancia que presenta el

organismo control (*E. coli*), para cada cepa analizada: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomona aeruginosa*, es decir, se trabajó con todas las cepas a una absorbancia equivalente a 1. En primer lugar, se realizó el crecimiento de bacterias conservadas por congelación a -80 °C, en medio de cultivo sólido (TSA al 2% de NaCl). Transcurridas 16 horas desde su siembra, 1 UFC (unidad formadora de colonias), aislada de cada cepa bacteriana, fue inoculada en agua de peptona al 2% de NaCl.

Posteriormente, transcurridas 24 horas de crecimiento bacteriano exponencial, en una microplaca de Elisa se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro a 650 nm de longitud de onda (longitud adecuada para medios de cultivo de tonalidad amarilla), donde se obtuvo los valores respectivos de turbidez para cada bacteria. Posteriormente, los valores de turbidez fueron estandarizados empleando los valores de referencia de la cepa *Escherichia* coli D31; la misma que posee un valor referencial estándar establecido de $1.2x10^9$cel/ml, cuya equivalencia en turbidez/absorbancia es de 1. Dichos valores fueron registrados en una matriz del software "Excel", los mismos que servirán para determinar el número de células de trabajo ($1x10^5$cel/ml), para las MIC, y el volumen de trabajo necesario para estandarizar el número de células (Véase Tabla 2).

Tabla 2. Cálculo de número de células/ml a partir de la domesticación bacteriana.

Cepas bacterianas	Absorbancia				# $^{cel}/_{ml}$
V. parahaemolyticus	0,136	0,144	0,139	0,139666667	1,20E+09
V. vulnificus	0,127	0,14	0,137	0,134666667	1,12E+09
V. harveyi	0,157	0,164	0,198	0,173	6,24E+08
P. aeruginosa	0,131	0,148	0,146	0,141666667	4,24E+08

Fuente: Elaborado por las Autoras

2.1.4 Productos a evaluar

Los ácidos orgánicos empleados en el presente proyecto fueron obtenidos por un distribuidor local, en su mayoría químicamente puros y de síntesis química debido a su bajo costo de producción, ya que su proceso es a partir de precursores químicos; a excepción del UltraPure™ EDTA (Reactivo de grado molecular fabricado por Invitrogen), que fue proporcionado por el CSA; a continuación se nombran los ácidos orgánicos empleados:

- Ácido Cítrico100%
- Ácido Ascórbico 100%
- Ácido Láctico 85%
- Ácido Fórmico 100%
- Ácido Oxálico 100%
- EDTA

2.2 Métodos

2.2.1 Preparación del inóculo bacteriano para las diversas pruebas

Para las diversas pruebas, se preparó placas con medio sólido de TSA con 2% de NaCl. Dichas placas sirvieron para llevar a cabo la siembra de las bacterias a partir de los viales seleccionados en la domesticación. La siembra de las bacterias *P. aeruginosa*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* se realizó con la técnica de rayado por agotamiento para obtener colonias (UFC) aisladas. Finalmente, las placas debidamente sembradas con las diferentes cepas bacterianas fueron incubadas durante 24 horas a 35˚C.

Cabe mencionar que de cada bacteria sembrada en placas TSA-2% NaCl, se realizaron 2 placas réplica, para asegurar tener colonias debidamente aisladas sobre todo por el rápido crecimiento de alguna de las cepas, principalmente *V. vulnificus*.

Luego de 24 horas de incubación, 1 UFC fue inoculada en 10 ml de agua de peptona con 2% de NaCl, y se procedió a una nueva incubación por 24 horas, con la finalidad de evidenciar el crecimiento exponencial de las distintas cepas bacterianas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir la absorbancia de cada una de las cepas bacterianas. Para esto, se homogenizó la muestra y se

colocó 200µl de cada bacteria en las microplacas tipo Elisa. De igual manera, con miras a obtener una cantidad de datos representativa y reproductibilidad de la técnica, se realizaron 5 réplicas de cada bacteria.

Adicionalmente, 5 pocillos con agua de peptona con 2% de NaCl fueron empleados como "blanco" experimental. Las lecturas de absorbancia, al igual que en la domesticación, fueron obtenidas con ayuda de un espectrofotómetro a 650nm de longitud de onda.

Los valores de espectrofotometría obtenidos para las bacterias fueron restados del "blanco" para obtener el valor estimado de la densidad bacteriana en la muestra. Dichos valores fueron comparados con los resultados de la domesticación bacteriana y empleados para calcular el volumen del tubo de cultivo a partir de las fórmulas descritas a continuación, determinando como volumen estandarizado de trabajo un número aproximado de $1x10^{5cel}/_{ml}$.

Fórmula para cálculo del número de cel/ml

10D	$1,2x10^{9Cel/ml}$
Absorbancia obtenida	x

x= absorbancia obtenida * $1,2x10^{9}$

Fórmula de Cálculo de Volumen de trabajo (cel/ml)

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$V1= \frac{\frac{1x10^{5}cel/ml}{0,2ml\ (valor\ medido)} \times 0,2\ ml\ (valor\ final)}{X}$$

De acuerdo a la fórmula empleada, la concentración final obtenida para empezar el experimento corresponde a un aproximado de $1x10^5$ cel/ml, empleando un volumen de 20 µl por cada pocillo para proceder a la medición de su absorbancia.

2.2.2 Método in vitro para determinar la capacidad antimicrobiana de ácidos orgánicos

2.2.2.1 Método de Concentración Mínima Inhibitoria

Para la determinación de la MIC se diseñó un "Plan de Placa" (Véase Anexo B Gráfico 20), para lo cual se realizaron diferentes diluciones de los ácidos orgánicos en agua de peptona, a las cuales se adicionaron las cantidades deseadas de células bacterianas para estimar su inhibición. Las concentraciones empleadas de los ácidos orgánicos fueron 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3500, 5000 ppm (partes por millón). Adicionalmente, se emplearon tres controles para cada MIC a efectuar. El primero, el control positivo (medio de

cultivo al que se añade la suspensión bacteriana); el segundo, el control negativo (medio de cultivo sin suspensión bacteriana), y el tercero corresponde a un control de observación para determinar la presencia o ausencia de contaminación en la preparación de las diluciones de los ácidos orgánicos (ácidos orgánicos de las distintas concentraciones).

2.2.2.2 Medición de Absorbancia

Una vez preparadas las diferentes concentraciones se procede a realizar las MICs correspondientes dentro de cada microplaca. Por cada microplaca se emplea 1 bacteria expuesta a 1 ácido y sus 3 réplicas por cada concentración. De igual manera se utiliza en cada microplaca los 3 controles antes mencionados. En cada pocillo se emplearon 200 µl de cada concentración de ácido orgánico y 20 µl de la cepa bacteriana; esta microplaca se incuba durante 24 horas a 35ºC previo a la lectura, con la finalidad de determinar si las bacterias, pese a estar en condiciones óptimas para su crecimiento (nutrientes, temperatura y salinidad), pueden ser inhibidas por la presencia de ácidos orgánicos.

Para la obtención de los resultados de absorbancia, la lectura se efectuó con la metodología explicada anteriormente en la domesticación bacteriana, con una longitud de onda de 650 nm, ideal para medios de cultivo de tonalidad amarilla.

2.2.2.3 Corroboración de inhibición de crecimiento bacteriano en placa

Para corroborar la inhibición del crecimiento bacteriano en placas, posterior al uso de los ácidos orgánicos, basado en los resultados de espectrofotometría, las muestras que presentaron inhibición en la siembra en microplacas fueron sembradas en medio sólido (TSA con 2% de NaCl). Para realizar esta siembra fueron utilizados 200 µl de cada concentración sembrada, los cuales fueron depositados en cajas Petri y esparcidos con ayuda de la técnica de "barrido en placa". Adicionalmente, las cajas Petri fueron incubadas durante 24 horas a 35°C. Transcurrido este tiempo, la ausencia de crecimiento bacteriano en las cajas Petri sirvió como constatación física del efecto bactericida de los distintos ácidos orgánicos.

2.3 Análisis Estadístico

El análisis estadístico del efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos sobre el crecimiento de las distintas cepas bacterianas fue realizado con el programa Statística 7, empleando un análisis de Varianza de una sola vía (1 way ANOVA) con un 98% de confianza. Dentro del cual, el análisis de comparación de medias empleado corresponde al método de Scheffé, esta prueba "post hoc" es usada para determinar las diferencias significativas entre las medias de grupo en un análisis de ajuste de varianza. En adición, es importante mencionar que es considerada una de las pruebas "post hoc" más conservadoras.

CAPÍTULO III

3.- RESULTADOS

Previo a efectuar el análisis de varianza de una vía (ANOVA), para cada cepa bacteriana empleada (*V. harveyi, V. vulnificus, V. parahaemolyticus, P. aeruginosa*); se efectúo la determinación del porcentaje de inhibición obtenido por cada ácido orgánico, permitiéndonos obtener valores unitarios que permitan interpretar en mejor medida los resultados del ANOVA de 1 vía. Adicionalmente, por medio de una comparación de medias utilizando el método de Scheffé, se determinó cual es el ácido orgánico más efectivo de este proyecto.

El nivel estadístico de confianza del 98% fue empleado debido a que este porcentaje es ideal en ensayos de laboratorio para tener una mayor probabilidad de que el parámetro que se estima se ajuste de mejor manera a un posible escenario "in vivo".

Los resultados de los diferentes patógenos de la Industria Acuícola, *P. aeruginosa, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* frente a los diversos agentes de inhibición (ácidos orgánicos de síntesis química), se detallan a continuación:

3.1 Resultados *Pseudomona aeruginosa*

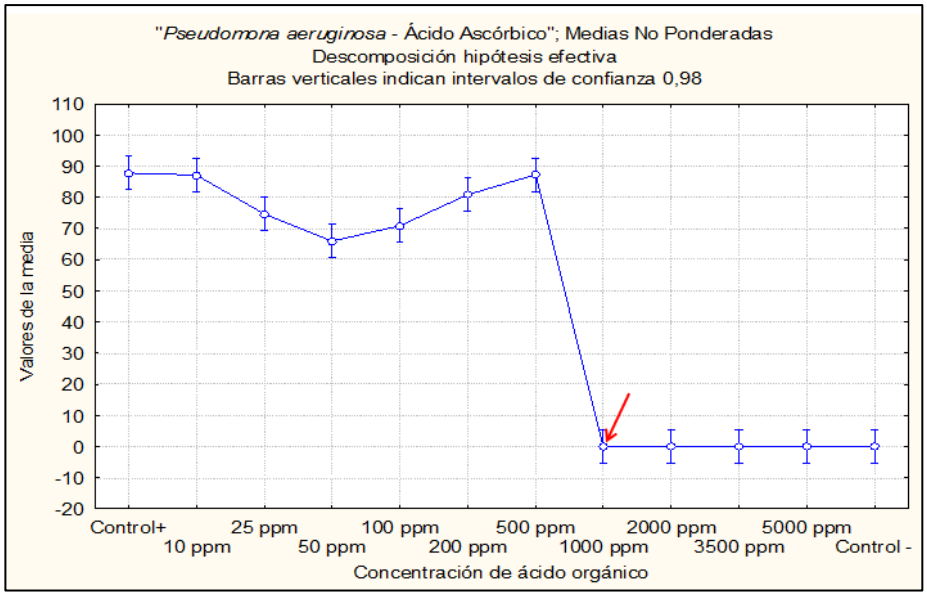


Gráfico 2. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Ascórbico.

El Gráfico 2 denota la presencia de inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 1000 ppm en el Ácido Ascórbico para *P. aeruginosa*. Por

otra parte, no se evidencian diferencias significativas en las concentraciones de 10, 25, 200 y 500 ppm (Véase Anexo A Tabla 3).

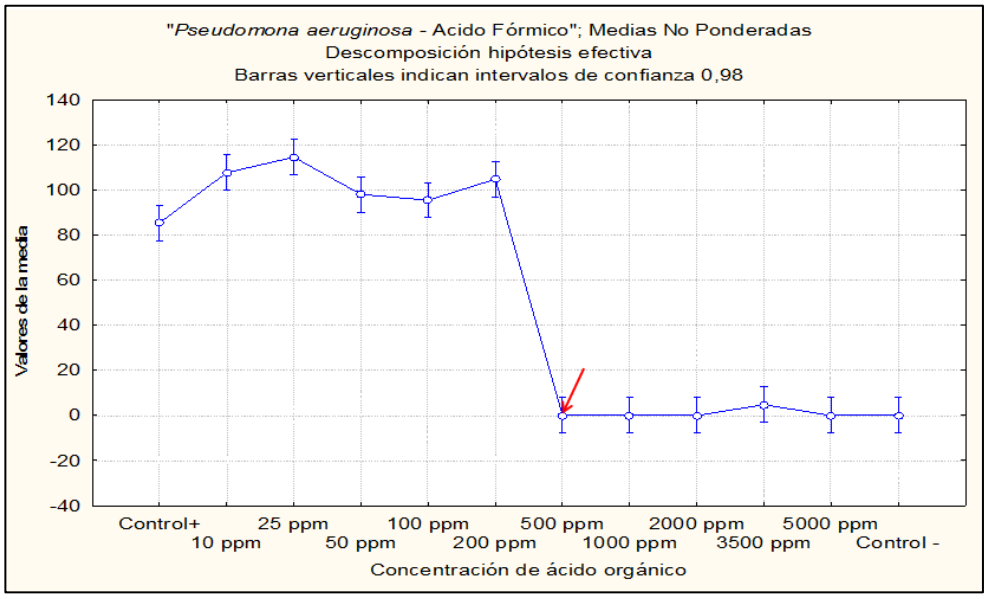


Gráfico 3. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Fórmico.

El Gráfico 3 podemos observar que existe una inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 500 ppm en presencia del Ácido Fórmico para el caso de *P. aeruginosa*. Adicionalmente en las concentraciones de 10, 50, 100 y 200 ppm no se evidencian diferencias significativas (Véase Anexo A Tabla 4).

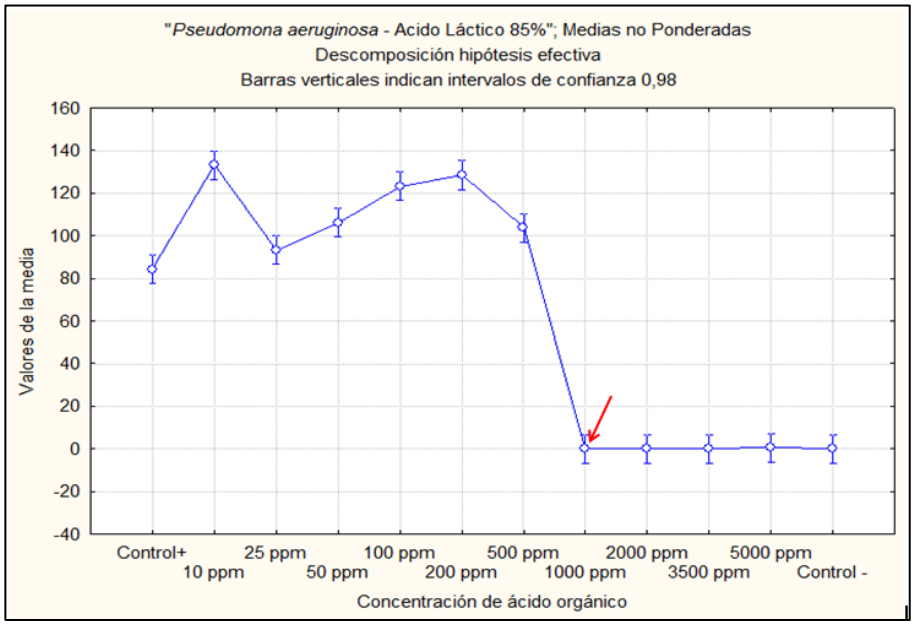


Gráfico 4. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Láctico 85%.

El Gráfico 4 nos muestra que la presencia de inhibición de crecimiento bacteriano es llevada a cabo a partir de una concentración de 1000 ppm en el Ácido Láctico al 85% para el caso de *P. aeruginosa*. Además, en todas las concentraciones se evidencian diferencias significativas. (Véase Anexo A Tabla 5).

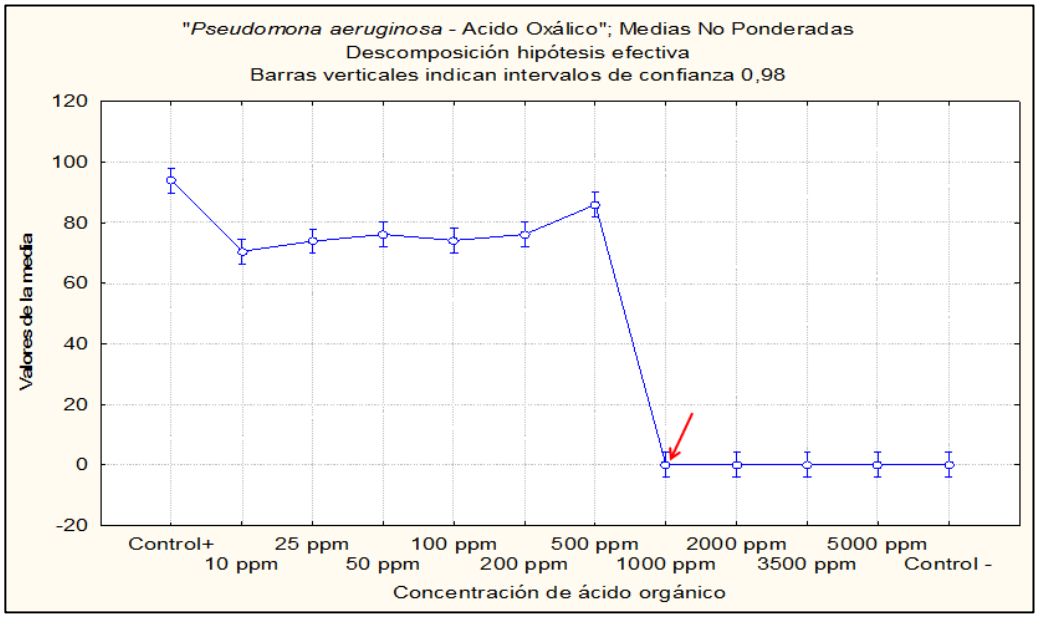


Gráfico 5. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Oxálico.

El Gráfico 5 evidencia la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 1000 ppm en el Ácido Oxálico para el caso de *P. aeruginosa*. Además, en todas las concentraciones se evidencian diferencias significativas, excepto en la concentración de 500 ppm (Véase Anexo A Tabla 6).

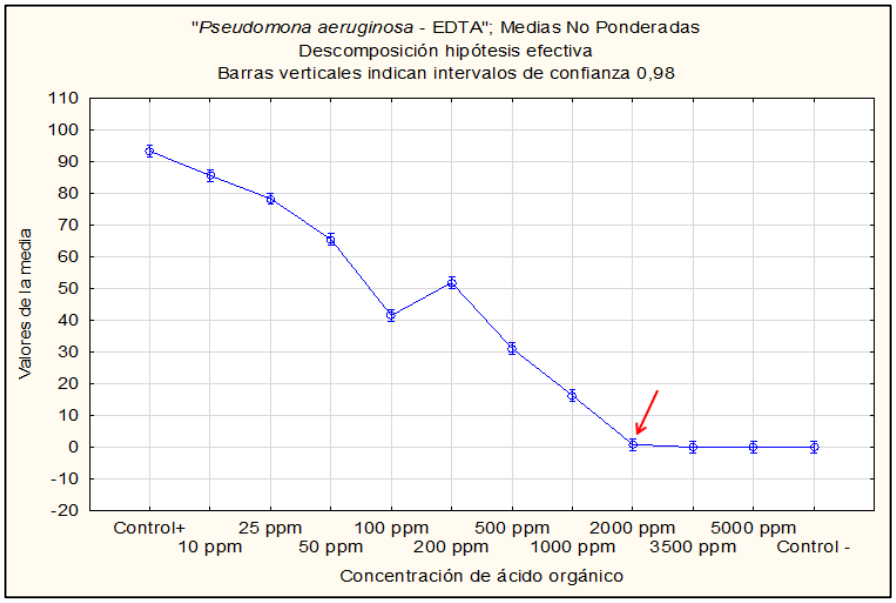


Gráfico N.-6. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Etildiaminotetraacético.

El Gráfico 6 podemos observar la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 2000 ppm en el Ácido Etildiaminotetraacético para el caso de *P aeruginosa*. De igual manera, existen diferencias significativas en todas las concentraciones probadas. (Véase Anexo A Tabla 7).

Como se mencionó en sección 2.3 Análisis Estadístico, los resultados aquí presentados tienen que cumplir con la homogeneidad de varianzas, el cual es un requerimiento estadístico necesario para efectuar el análisis de varianza, como esta condición no se obtuvo en el análisis de los resultados del ácido cítrico para *P. aeruginosa*, no se muestran los resultados para esta prueba.

3.2 Resultados *Vibrio harveyi*

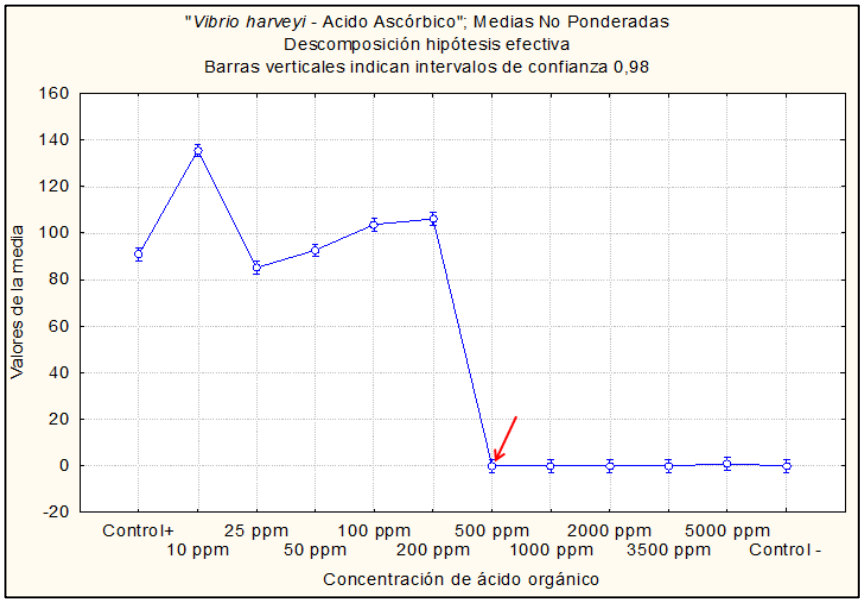


Gráfico 7. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Ascórbico.

El Gráfico 7 muestra que la inhibición de crecimiento bacteriano puede observarse a partir de una concentración de 500 ppm en el Ácido Ascórbico para el caso de *V harveyi*. De igual manera denota que existen diferencias significativas en todas las concentraciones empleadas en relación al crecimiento bacteriano obtenido del grupo control; excepto en 25 y 50 ppm. (Véase Anexo A Tabla 8).

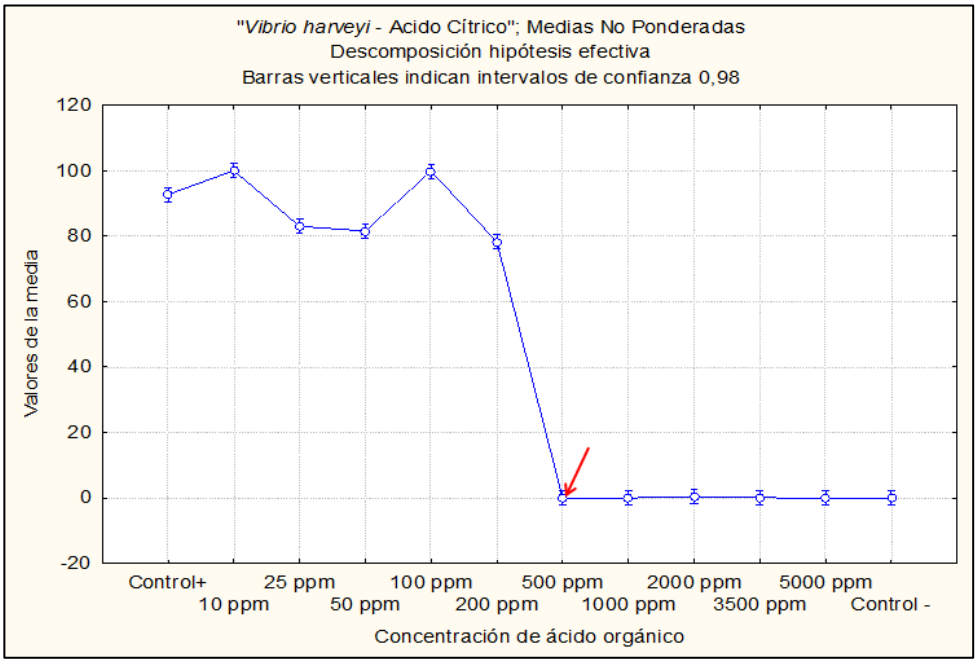


Gráfico 8. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Cítrico.

El Gráfico 8 evidencia la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 500 ppm en el Ácido Cítrico para el caso de *V. harveyi*. De igual manera denota que existen diferencias significativas en todas las concentraciones empleadas (Véase Anexo A Tabla 9).

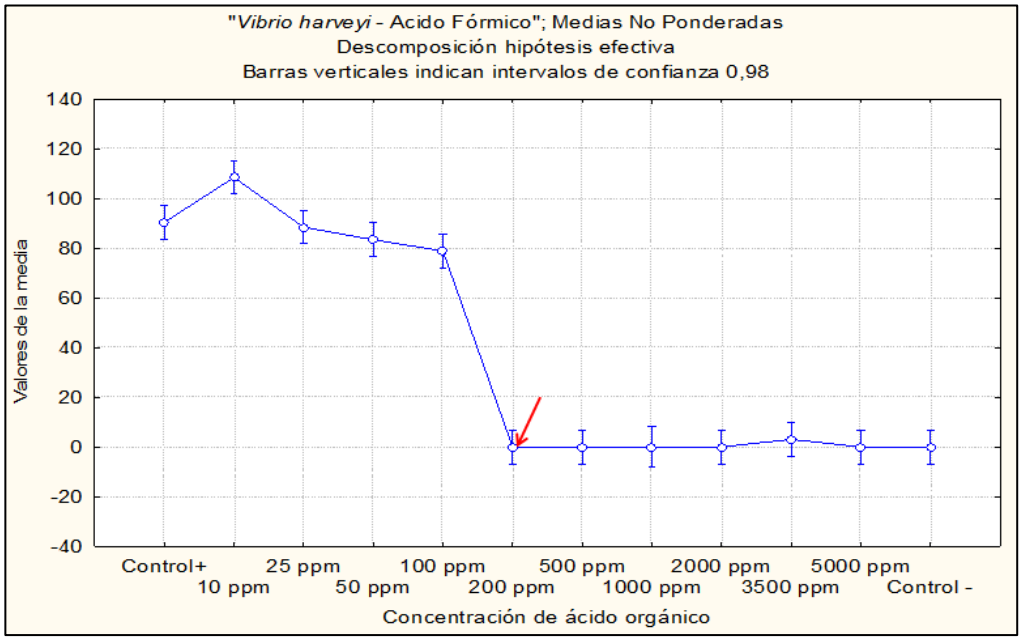


Gráfico 9. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Fórmico.

El Gráfico 9 permite evidenciar la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 200 ppm en el Ácido Fórmico para el caso de *V. harveyi*. Por otra parte, en las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ppm, no se presentan diferencias significativas (Véase Anexo A Tabla 10).

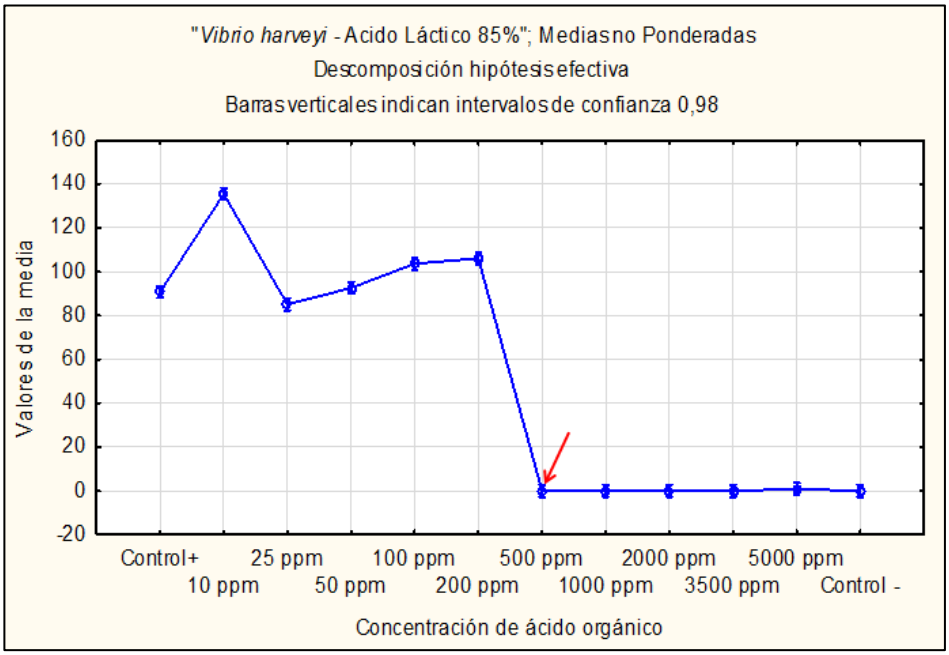


Gráfico 10. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Láctico 85%.

El Gráfico 10 permite evidenciar una inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 500 ppm en presencia del Ácido Láctico al 85% para el caso de *V. harveyi*. Adicionalmente, podemos mencionar que entre todas las concentraciones, solamente las de 25 y 50 ppm no presentan diferencias significativas (Véase Anexo A Tabla 11).

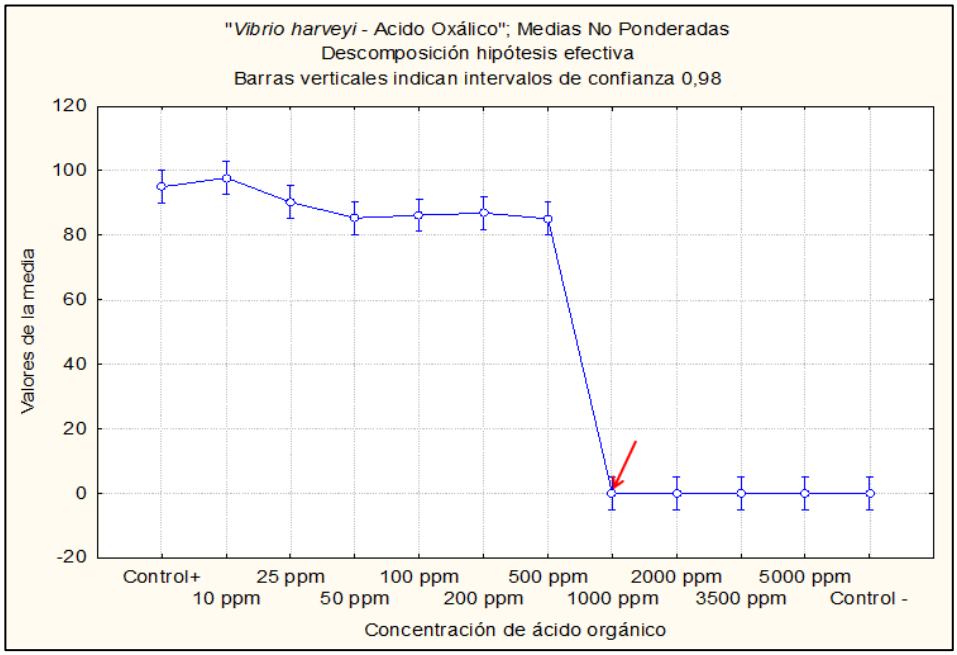


Gráfico 11. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Oxálico.

El Gráfico 11 denota la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 1000 ppm en el Ácido Oxálico para el caso de *V. harveyi*. De igual manera, existen diferencias significativas en las otras concentraciones superiores a 1000 ppm. Sin embargo las concentraciones de menor espectro de 10 – 500 ppm no presentan diferencias (Véase Anexo A Tabla 12).

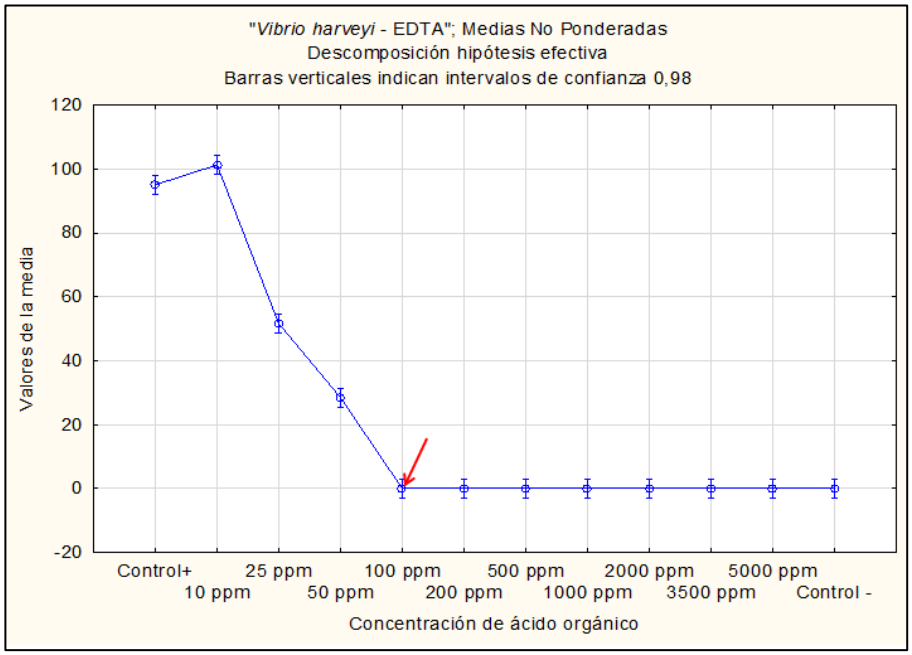


Gráfico 12. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* con Ácido Etildiaminotetraacético.

El Gráfico 12 se evidencia la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 100 ppm en presencia del Ácido Etildiaminotetraacético para el caso de *V. harveyi*. De igual manera existen diferencias significativas a partir de la concentración de 25 ppm (Véase Anexo A Tabla 13).

3.3 Resultados *Vibrio vulnificus*

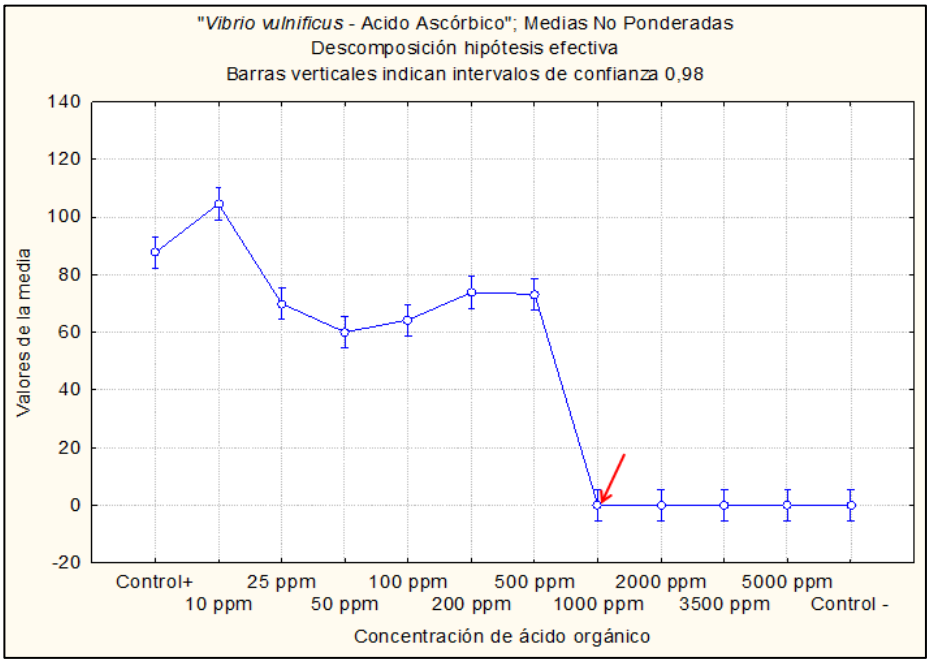


Gráfico 13. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Ascórbico.

El Gráfico 13 evidencia la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 1000 ppm del Ácido Ascórbico para el caso de *V. vulnificus*. De igual manera existen diferencias significativas en todas las concentraciones exceptuando las concentraciones de 10, 200 y 500 ppm (Véase Anexo A Tabla 14).

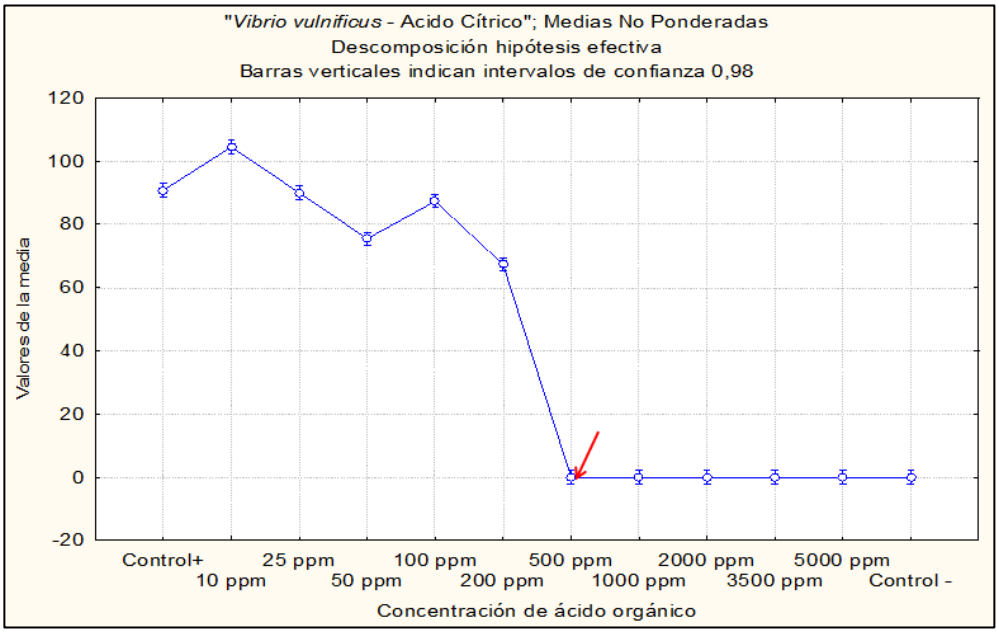


Gráfico 14. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Cítrico.

El Gráfico 14 denota el proceso de inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 500 ppm en el Ácido Cítrico para el caso de *V. vulnificus*. De igual manera, existen diferencias significativas en todas las concentraciones exceptuando 25 y 100 ppm (Véase Anexo A, Tabla 15).

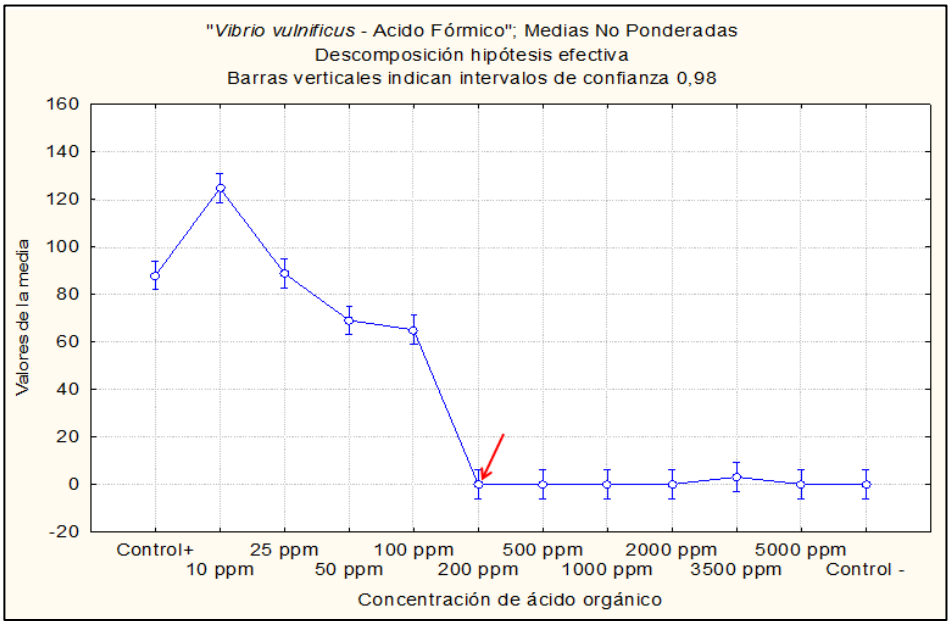


Gráfico 15. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Fórmico.

El Gráfico 15 muestra la inhibición de crecimiento bacteriano obtenido a partir de una concentración de 200 ppm en el Ácido Fórmico para el caso de *V. vulnificus*. De igual manera existen diferencias significativas a partir de la concentración de 10 ppm, exceptuando las concentraciones de 25 y 50 ppm (Véase Anexo A, Tabla 16).

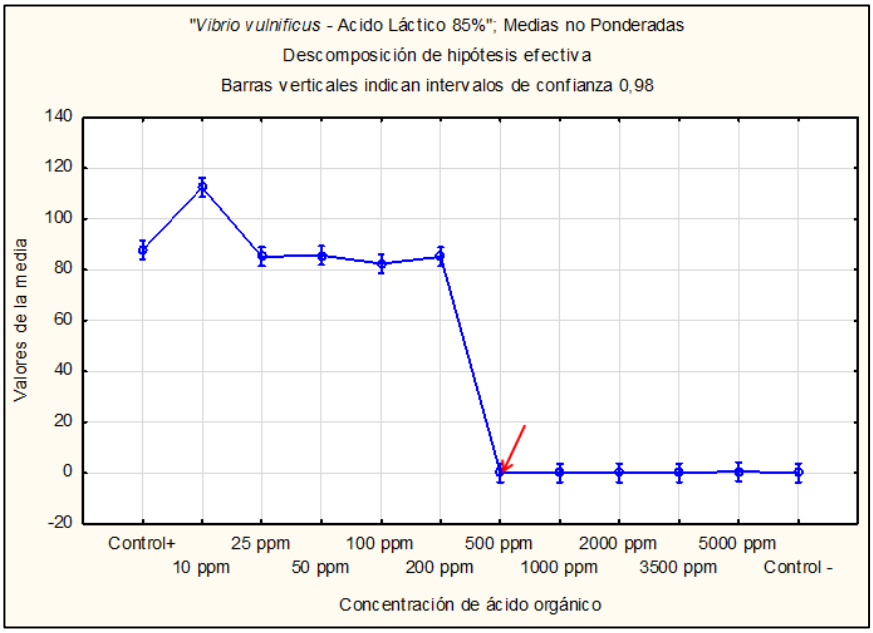


Gráfico 16. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Láctico 85%.

El Gráfico 16 denota el proceso de inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 500 ppm del Ácido Láctico al 85% para el caso de *V. vulnificus*. De igual manera, existen diferencias significativas en las concentraciones de 10, 500, 1000, 2000, 3500 y 5000 ppm (Véase Anexo A, Tabla 17).

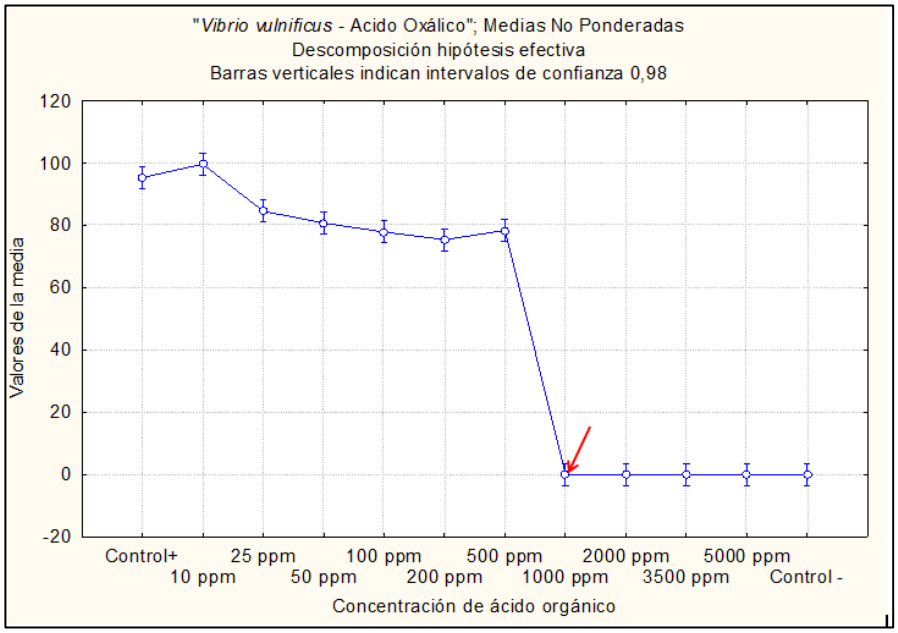


Gráfico 17. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio vulnificus* con Ácido Oxálico.

El Gráfico 17 muestra la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 1000 ppm en el Ácido Oxálico para el caso de *V. vulnificus*. Así mismo, se puede evidenciar que existen diferencias significativas en las concentraciones a partir de 50 ppm, exceptuando las concentraciones de 10 y 25 ppm (Véase Anexo A, Tabla 18).

En el caso del *V. vulnificus* en presencia de EDTA no se cumplió la homogeneidad de varianzas, por lo cual no se continuó con el análisis estadístico que determine si existe inhibición del crecimiento bacteriano en esta condición particular.

3.4 Resultados *Vibrio parahaemolyticus*

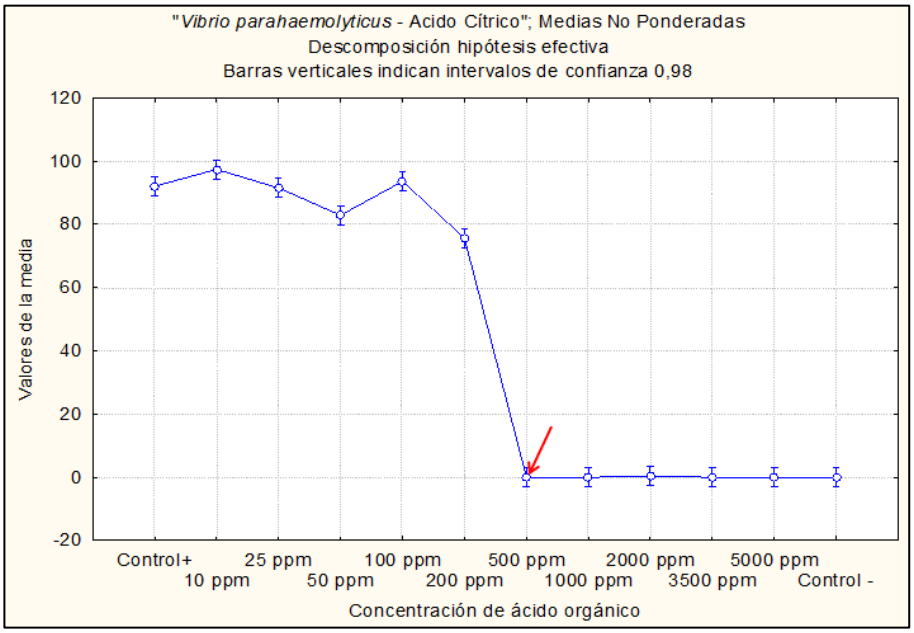


Gráfico 18. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con Ácido Cítrico.

El Gráfico 18 muestra la inhibición de crecimiento bacteriano de *V. parahaemolyticus* en presencia del Ácido Cítrico a partir de una concentración de 500 ppm. De igual manera existen diferencias significativas en las concentraciones a partir de 200 ppm, exceptuando las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ppm (Véase Anexo A, Tabla 19).

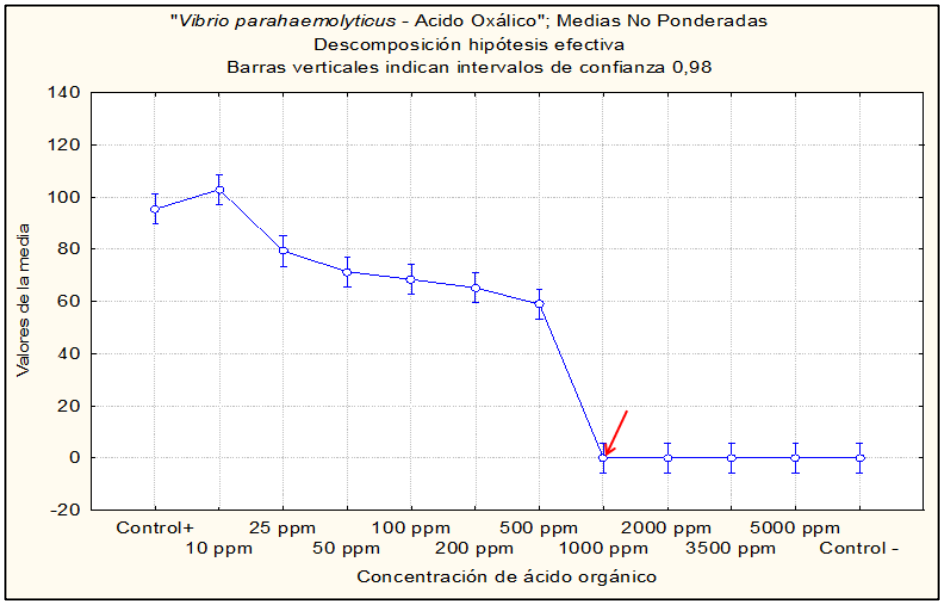


Gráfico 19. Comparación de medias de Inhibición de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con Ácido Oxálico.

El Gráfico 19 muestra la inhibición de crecimiento bacteriano a partir de una concentración de 1000 ppm en presencia del Ácido Oxálico para el caso de *V. parahaemolyticus*. Existen diferencias significativas a partir de la concentración de 50 ppm, exceptuando las concentraciones de 10 y 25 ppm (Véase Anexo A, Tabla 20).

En este estudio, no se cumplieron las condiciones de homogeneidad de varianzas cuando se efectuó el análisis de los resultados obtenidos con el ácido láctico al 85%, ácido fórmico, ácido ascórbico, EDTA para *V. parahaemolyticus*, por lo cual no se puede demostrar estadísticamente que estos ácidos presenten algún tipo de actividad antimicrobiana en las condiciones descritas en estas pruebas

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En los últimos 10 años diversos autores han reportado que distintos ácidos orgánicos de síntesis química inhiben el crecimiento de bacterias patógenas a distintas concentraciones (3, 21, 40, 81). Los resultados obtenidos en este trabajo, con diversos patógenos bacterianos para la industria Acuícola, corroboran la acción de distintos ácidos orgánicos en la inhibición de su crecimiento. Esta inhibición del crecimiento bacteriano por ácidos orgánicos es efectuada, a través de distintos mecanismos de acción, por ejemplo, mediante la eliminación de iones metálicos del medio y de cationes en la pared del microorganismo, acidificación del medio externo, entre otras (79, 80, 82).

El conjunto de resultados obtenidos a partir de las MICs, así como la comprobación del crecimiento bacteriano por medio de la siembra en cajas Petri, nos permiten inferir que todos los ácidos orgánicos empleados poseen un efecto bactericida (3, 21, 78), a distintas concentraciones, frente a los cuatro patógenos de la industria Acuícola utilizados.

También, podemos indicar que se determinó la concentración de los ácidos orgánicos en la cual la actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano se pone de manifiesto en condiciones de laboratorio.

Hasta el momento en que presentamos nuestros resultados, no se han reportado estudios relacionados con la inhibición del crecimiento de *Vibrio vulnificus* por acción de ácidos orgánicos. Por lo cual, los resultados obtenidos en el presente proyecto constituyen una primera validación del uso de ácidos orgánicos como inhibidores de este patógeno. Dentro de esta primera validación, podemos indicar que la mayor actividad inhibitoria obtenida para *V. vulnificus*, se evidencia con el ácido fórmico a una concentración de 200 ppm.

Referente al *Vibrio harveyi* evaluado con el ácido fórmico, se ha reportado que este ácido puede inhibir el crecimiento del patógeno a razón de 0.035% o 350 ppm (61). No obstante, los resultados obtenidos en el presente proyecto, por una parte complementaron dicha información mostrando que se realiza la inhibición del crecimiento bacteriano; mientras que, por otra parte, indican que se puede

inhibir el crecimiento bacteriano a partir de 200 ppm. Dicha variación que se obtiene en la concentración puede radicar en las características de síntesis del producto utilizado, tales como pureza, concentración, entre otros.

En el trabajo de los efectos de ácidos orgánicos sobre *V. harveyi* realizado por Mine & Boopathy en 2011, en el cual emplearon ácido acético, se reportó que existe inhibición de su crecimiento bacteriano a una concentración de 0.07%, equivalente a 700 ppm (61). Basados en estos resultados, el empleo de un compuesto con similar composición como es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) denotaría un potencial análogo de inhibición. Sin embargo, este proyecto mostró que la inhibición con EDTA para *V. harveyi* se puede visualizar a partir de 100ppm.

El análisis efectuado ante el *V. harveyi* nos permite inferir que el mayor efecto inhibitorio se visualiza con el EDTA a partir de una concentración de 100 ppm; mientras que la menor inhibición se evidencia para el ácido oxálico a una concentración de 1000 ppm.

Subsecuentemente, los resultados obtenidos para *V. vulnificus* revelaron que existe una mayor inhibición con el ácido fórmico a partir de una concentración de 200 ppm, mientras que, la menor inhibición se evidencia con el ácido ascórbico y ácido oxálico a partir de una concentración de 1000 ppm. Cabe

mencionar que no se pudo efectuar el análisis para el EDTA, debido a que no se cumplía con la homogeneidad de varianzas.

De igual manera, los resultados obtenidos para el *Vibrio parahaemolyticus,* frente al ácido cítrico, indican que la inhibición bacteriana se llevó a cabo a partir de 500 ppm. Sin embargo, Amani y Reham reportaron en el 2012 que la inhibición se presenta a partir de una concentración del 10% (100000 ppm) (83), suceso que se puede explicar, al igual que con el ácido fórmico frente a *V. harveyi,* posiblemente por variaciones en los procesos de síntesis química del ácido.

Por el contrario, los resultados para *Vibrio parahaemolyticus* denotan un mayor efecto inhibitorio con el uso de ácido cítrico a una concentración de 500 ppm; mientras que la menor inhibición se evidencia con el empleo de ácido oxálico a partir de una concentración de 1000 ppm. Es importante mencionar que para este patógeno, el análisis estadístico no se pudo efectuar para la mayoría de los ácidos (fórmico, ascórbico, láctico al 85% y EDTA), debido al incumplimiento de la homogeneidad de varianzas.

Adicionalmente, la información generada en el presente trabajo, en comparación con la información existente y preliminar de diversos países, permite citar de manera general que uno de los ácidos orgánicos más eficientes en procesos de inhibición bacteriana es el ácido fórmico (43, 48), teniendo así que, para *Pseudomona aeruginosa*, bajo condiciones de laboratorio, la inhibición se

observó a partir de 500 ppm, mientras que en estudios realizados anteriormente con el mismo ácido orgánico indica que la inhibición ocurre a partir de 1000 ppm, ambos realizados por el mismo método de concentración mínima inhibitoria (9).

De igual manera, en mención al empleo de EDTA como agente inhibidor del crecimiento bacteriano de distintos patógenos, podemos mencionar que frente a *P. aeruginosa*, dicho ácido presentó menor inhibición a una concentración de 2000 ppm; mientras que el mismo ácido, en distintos desafíos ante *V. harveyi* exhibió notoria capacidad inhibitoria (100 ppm), mucho mayor a la obtenida para *P. aeruginosa*.

Finalmente, los resultados de este estudio nos permiten concluir que bajo condiciones de laboratorio, los ácidos orgánicos empleados poseen actividad antibacteriana y que pueden ser aprovechados como agentes inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas en cultivos acuícolas. Así mismo, podemos mencionar que se encontró una mayor eficiencia inhibitoria en las pruebas realizadas con EDTA y Ácido Fórmico. El EDTA frente a *V. harveyi* inhibió a 100 ppm.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de emplear diferentes ácidos orgánicos de síntesis química, como una alternativa al uso de antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram (-) patógenas de la Industria Acuícola, debido a sus propiedades antimicrobianas.

2. De igual manera, los resultados obtenidos infieren la posibilidad de implementar diferentes concentraciones de diversos ácidos orgánicos en cultivos acuícolas, teniendo como base para su aplicabilidad, las concentraciones mínimas en las que se obtuvo un efecto en la inhibición del crecimiento de los patógenos bacterianos empleados.

3. Dentro de los distintos ácidos orgánicos empleados, los resultados permitieron conocer que los ácidos más efectivos para inhibir el crecimiento de patógenos fueron el ácido fórmico y el EDTA; siendo este último el que evidenció un efecto inhibitorio a una menor concentración (100 ppm), motivo por el cual, ambos ácidos, podrían ser considerados buenos agentes inhibidores ante patógenos de la industria Acuícola.

4. Los ácidos orgánicos con menor efecto inhibitorio fueron el Ácido Ascórbico y el Ácido Oxálico, puesto que, para todas las cepas bacterianas empleadas, presentaron inhibición a partir de 1000 ppm.

5. Todos los ácidos orgánicos empleados presentaron inhibición bacteriana para los cuatro grupos de bacterias trabajadas en el presente proyecto.

6. Para la *Pseudomona aeruginosa* el ácido fórmico evidencia ser el más efectivo en la inhibición de su crecimiento (500 ppm), mientras que el EDTA (menos efectivo), inhibe su crecimiento a partir de 2000 ppm.

7. Referente al *Vibrio vulnificus* el ácido fórmico muestra ser el más efectivo para inhibir su crecimiento (200 ppm), mientras que el ácido ascórbico presenta la menor inhibición a partir de 1000 ppm.

8. Para el *Vibrio harveyi* el EDTA resultó ser el más efectivo para inhibir su crecimiento (100 ppm), mientras que el ácido oxálico inhibe a partir de 1000 ppm.

9. Finalmente, para el *Vibrio parahaemolyticus* el ácido cítrico es más eficaz para inhibir su crecimiento (500 ppm), mientras que el ácido oxálico denota una menor inhibición iniciando en la concentración de 1000 ppm

RECOMENDACIONES

1. Para poder tener un mayor espectro de acción referente a la actividad inhibitoria de ácidos orgánicos se recomienda trabajar con otros grupos de ácidos orgánicos para determinar la mayor efectividad de éstos sobre las bacterias patógenas de la Acuicultura.

2. Como recomendación adicional, se sugiere efectuar estudios de sinergia entre los ácidos orgánicos, para comprobar la efectividad en conjunto sobre los patógenos de la acuicultura.

3. Referente a las bacterias patógenas empleadas, los resultados del presente estudio podrían servir como base para analizar el espectro de acción de diversos ácidos orgánicos ante distintos patógenos microbianos propios de otros cultivos acuícolas, por ejemplo peces, bivalvos u otros crustáceos de producción masiva.

4. Se propone establecer la cantidad específica de los ácidos orgánicos para su utilización en el campo, para la producción industrial acuícola y no causar la sobreutilización de los mismos.

5. Finalmente, se recomienda realizar un bioensayo empleando las concentraciones inhibitorias obtenidas en el presente estudio (metodología “in vitro”), para determinar las dosis que podrían ser usadas para inhibir el crecimiento de patógenos.

ANEXOS

Anexo A

TABLAS

Tabla 3. Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Ascórbico

Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Ascórbico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	1,000000
25	0,129810
50	0,000692
100	0,015520
200	0,898510
500	1,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 4. Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Fórmico

Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Fórmico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,051107
25	0,003627
50	0,688969
100	0,893365
200	0,137574
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 5. Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Láctico 85%

Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Láctico 85%	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000000
25	0,007441
50	0,000019
100	0,000000
200	0,000000
500	0,000059
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 6. Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Oxálico

Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Oxálico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000007
25	0,000083
50	0,000461
100	0,000102
200	0,000461
500	0,409554
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 7. Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – Ácido Etildiaminotetraacético.

Test de Scheffé *Pseudomona aeruginosa* – EDTA	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000477
25	0,000000
50	0,000000
100	0,000000
200	0,000000
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 8. Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Ascórbico

Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Ascórbico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000000
25	0,313234
50	0,999421
100	0,000079
200	0,000005
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 9. Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Cítrico

Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Cítrico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,013029
25	0,000422
50	0,000059
100	0,015683
200	0,000001
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 10. Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Fórmico

Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Fórmico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,084838
25	1,000000
50	0,969573
100	0,606124
200	0,000000
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 11. Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Láctico 85%

Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Láctico 85%	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000000
25	0,313376
50	0,998958
100	0,000142
200	0,000011
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 12. Test de Scheffé *Vibrio harveyi*- Ácido Oxálico

Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Oxálico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,999812
25	0,987262
50	0,449152
100	0,577733
200	0,693261
500	0,417002
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 13. Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – Ácido Etildiaminotetraacético

Test de Scheffé *Vibrio harveyi* – EDTA	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,310721
25	0,000000
50	0,000000
100	0,000000
200	0,000000
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 14. Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Ascórbico

Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Ascórbico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,025129
25	0,015240
50	0,000055
100	0,000599
200	0,112756
500	0,084165
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 15. Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Cítrico

Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Cítrico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000001
25	0,999992
50	0,000000
100	0,622100
200	0,000000
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 16. Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Fórmico

Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Fórmico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000003
25	1,000000
50	0,022526
100	0,002911
200	0,000000
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 17. Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Láctico 85%

Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Láctico 85%	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,000001
25	0,998791
50	0,999841
100	0,812555
200	0,998791
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 18. Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Oxálico

Test de Scheffé *Vibrio vulnificus* – Ácido Oxálico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,924328
25	0,026537
50	0,000937
100	0,000075
200	0,000010
500	0,000122
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 19. Test de Scheffé *Vibrio parahaemolyticus* – Ácido Cítrico

Test de Scheffé *Vibrio parahaemolyticus* – Ácido Cítrico	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,549709
25	1,000000
50	0,024503
100	0,999910
200	0,000015
500	0,000000
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Tabla 20. Test de Scheffé *Vibrio parahaemolyticus* – Ácido Oxálico

Test de Scheffé *Vibrio parahaemolyticus* – Ácido Oxálico.	
Concentración de ácido orgánico (ppm)	
Control +	
10	0,893091
25	0,063837
50	0,000991
100	0,000204
200	0,000039
500	0,000002
1000	0,000000
2000	0,000000
3500	0,000000
5000	0,000000
Control -	0,000000

Anexo B

GRÁFICOS

Grafico 20. Plan de Placas empleado para realizar las diferentes MICs

Plan de PLACA												
ppm		**10**	**25**	**50**	**100**	**200**	**500**	**1000**	**2000**	**3500**	**5000**	
A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B	*	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	*
C	*	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	*
D	*	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	Réplica 2	*
E	*	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	Réplica 3	*
F	*	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	Control de Acido Orgánico	*
G	*	Control negativo	Control negativo	Control negativo	*	*	*	*	Control positivo	Control positivo	Control positivo	*
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

ANEXO C

Figuras

Figura 1.- Método de Concentración Mínima Inhibitoria en microplaca para *Pseudomona aeruginosa* con EDTA

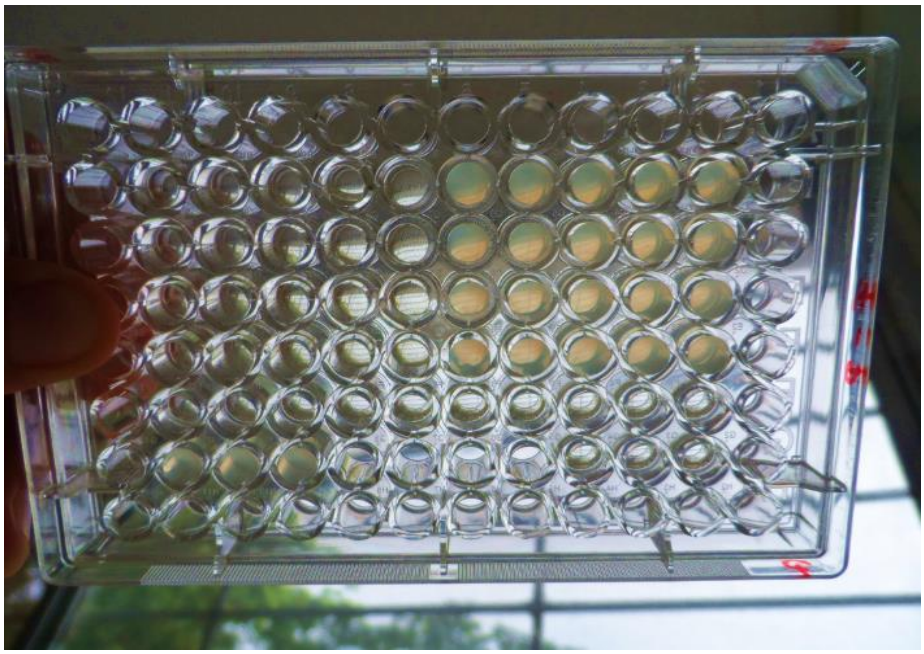


Figura 2.- Método de Concentración Mínima Inhibitoria en microplaca para *Pseudomona aeruginosa* con Ácido Fórmico.

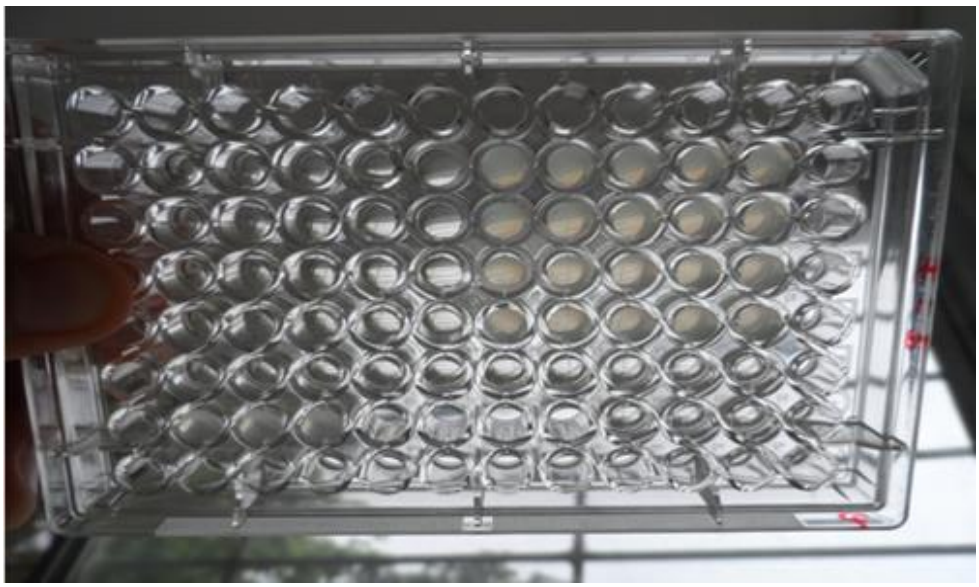


Figura 3.- Método de Concentración Mínima Inhibitoria en microplaca para *Vibrio harveyi* con EDTA.

Figura 4.- Método de Concentración Mínima Inhibitoria en microplaca para *Vibrio vulnificus* con Ácido Fórmico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ng, W. (2009). Organic Acids Potential Replacement for Antibiotic Treatments of Tilapia. *Global Aquaculture Advocate*, (October), 93-94.

2. Yankomut, A., Purivirojkul, W. Chuchrid, N., & Limsuwan, C. (2009). Effect of MERA Cid on Growth, Survival and Preventing Vibriosis in Rearing of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Was, 1-2

3. Susá Gómez J. M. (2011). *Aplicación de Sinérgica de Agentes Orgánicos en la Inhibición y Reducción de Carga Microbiana para Harinas de Pescado para Exportación*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Recuperado de http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/15954

4. FAO (2004). *Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (Penaeus vannamei) en América Latina*.

5. FAO. (2012). *El Estado Mundial de la Pesca y la Agricultura – 2012*.

6. Santiago H., M. L., Espinosa P., A., & Bermúdez A., M. D. C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *40*(3), 22-32.

7. Adams, D., & Boopathy, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, *68*(6), 1017-1021.

8. Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology, 14(3)*, 251-8

9. Shiva, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Universitat Autónoma de Barcelona.

10. Bécares Mantecón, E., Martín Villacorta, J., Hinojosa Valsero, M., Cardona Martínez, R. S., Romero, R., & Balcázar, J. L. (2009). BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN MEDIOS ACUÁTICOS, 23. Recuperado de:

http://www.mapfre.com/documentacion/publico/i18n/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1065555.

11. Sánchez, D., López, J., & Martínez, O. (2008). Quantification of organic acids in fermented shrimp waste by HPLC. *Food Technology. Biotechnology*, 46(4), 456-460.

12. Quinteros Ramos, M. D., & Zea Vidal, L. A. (2012). *Diseño de un Sistema de Depuración para Concha Prieta usando Ácido Láctico como Agente Antimicrobiano*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Recuperado de http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21141/1/D-92800.pdf

13. Lücksdatdt, C., Wylie, L., Remmer, R., De Kok, R., Roman Costa, H., Brebels, M., … Dam, H. van (2014). *Organic acids in animal nutrition*. Fefana Publication.

14. Crueger, W. & Crueger A. (1993). Biotecnología manual de Microbiología Industrial. (3rd ed). Acribia Editorial. Recuperado de http://www.casadellibro.com/librobiotecnologia-manual-de-microbiologia-industrial/9788420007434/71706

15. Fernández, G. (2014). *Química Orgánica*. Recuperado de: http://books.google.com.ec/books?id=uhXGAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

16. Morris, H. (1992). *Foundations of College Chemistry 7th* (7th, Seven). ISBN 0-534-12966-8

17. CLARVI. (2011). Ácido cítrico. CLARVI. Recuperado de: http://www.clarvi.com/pdf/fichas_tecnicas/acido_citrico.pdf

18. HERA. (2005). Citric Acid and Salts. Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products.

19. Bapat, S., Aichele, C. & High, K. (2014). Development of a sustainable process for the production of polymer grade lactic acid. *Sustainable Chemical Processes*, 2 (3). Recuperado de: http://doi.org/10.1186/2043-7129-2-3

20. Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic journal of Biotechnology, 7(2), 167-178. Recuperado de: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/3142/1/ej04016.pdf

21. Serna, L. & Rodríguez, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1) 54-65. Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72450109.

22. Gennero, D. (2009). Niveles de lactato en líquido cefalorraquídeo y su relación con meningitis bacteriana en pediatría. *Acta bioquím. clín. latinoam*, *43*(3), 321-326.

23. Coello, P. (2011). Efecto de tres tipos de Conservantes (Ácido Propiónico, Acido Fórmico y Propionato de Calcio) en la Vida de Anaquel de la Harina de Sangre. (Tesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

24. Anduaga, D., Bayona, L., Betancourt, P. & Solís, H. (2014). Manual de operaciones para la importación de ácido fórmico transportado por vía aérea. (Trabajo Final. Escuela Superior de Comercio y Administración Unidad Santo Tomás). Recuperado de: http://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/12945/1/CP2013%20A564d.pdf

25. Lupro-Grain® & Amasil® NA (2013) Conservación efectiva de piensos compuestos con los nuevos productos. The Chemical Company BASF. Recuperado de: http://www.basfanimalnutrition.de/downloads/an_safe_feeding_es.pdf

26. Serra, M., & Cafaro, T. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectiva en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 41* (4), 9. Recuperado de: http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v41n4/v41n4a10.pdf

27. Corredor, & Landines. (2009). *Efecto del ácido ascórbico sobre la respuesta de los peces ante condiciones de estrés.* Bogotá: Universidad nacional de Colombia, sede Bogotá. Recuperado de: http://www.bdigital.unal.edu.co/21516/1/17967-57889-1-PB.pdf

28. Ankara Ecz. (2009). An overview of ascorbic acid biochemistry. Grazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry. Recuperado de: http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/24/1716/18327.pdf

29. Du, J., Cullen, J. & Buettner, G. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1826(2), 443-457.

30. Oghome, P., K.O.Amanze, C.I.O.Kamalu, Nkwocha, A., & O.Opebiyi. (2012). Comparative analysis of oxalic acid produced from rice husk and paddy. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 8.

31. Distribuidora de químicos industriales (2006). *Ficha Ténica de Ácido oxálico.* Mellín.

32. Teerawut, S., & Pratumchart, B. (2014). Effect of EDTA on Physical and Sensory Properties of Pacific White Shrimp (Litopenaeusvannamei) during Ice Storage. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, *19*(1), 72-82

33. Fernández, M., Pérez, G., Villagómez, M., Villagómez, G., Báez, T., & Lara, G. (2012). Estudio “In vitro” del grado de erosión que provoca el EDTA sobre la dentina del conducto radicular. *Revista Odontológica Mexicana*, *16*(1-ESP).

34. Health, N. J. (Junio de 2010). *Ácido etilendiaminotetraacético*. Recuperado de http://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb.

35. Anangonó, C. (2014). Eficiencia del uso de ácidos orgánicos en camarón (Tesis de pregrado. Escuela Superior Politécnica del Litoral).

36. Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista chilena de Infectología*, 26 (2), 144-150.

37. Beuchat, L. & Golden, D. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technology, 43 (1), 134-42

38. Dixon, R. & Hamilton, P. 1981. Effect of feed ingredients on the antifungical activity of propionic acid Poult. Sci. 60: 2407-11.

39. Izat, A., Tidwell, R., Thomas, R., Reiber, M., Adams, M., Colberg, M., Waldroup, P. 1990. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. Poult. Sci. 69: 818-26

40. Bauernfeind, J. (1982). Ascorbic Acid Technolgy in Agricultural, Pharmaceutical, Food, and Industrial Applications. Advances in Chemistry. Vol. 200, 395-497 DOI: 10.1021/ba-1982-0200.ch020

41. Lückstädt, C. (2012). Acidification in monogastric fish: limits and potentials. *AQUA Culture Asia Pacific Magazine*. Recuperado de http://www.addcon.com/fileadmin/addcon/pdf/news/Acidification_in_fish_AQUA_Nov12_corrected.pdf

42. Lückstädt, C. (2008). New Additives in Aquaculture- the Beneficial Effects of Dietary Organic Acids in Fish Nutrition, with Special Focus on Potassium Di formate. *The Fish Site* Recuperado de: http://www.thefishsite.com/articles/475/new-additives-in-aquaculture-the-beneficial-effects-of-dietary-organic-acids-in-fish-nutrition-with-special-focus-on-potassium-diformate

43. Alternativas orgánicas en el control de enfermedades en acuicultura. (s.f.). En Panorama Acuícola Magazine. Recuperado de: http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2007/01/01/alternativas_organicas_en_el_control_de_enfermedades_en_acuicultura.html

44. Chatterjee, S., Haldar, S. (2012) Vibrio Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. DOI:10.4172/2155-9910.S1-002

45. Leyton, Y. & Riquelme, C. (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. Revista de biología marina y oceanografía, 43(3), 441-456 Recuperado en 12 de agosto de 2014, de http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000300004

46. Fajardo, J. (2013). Cultivo de Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* utilizando ácidos orgánicos y bacterias ácido lácticas en el alimento balanceado. (Tesis de grado, Universidad Técnica de Machala). Recuperado de: http://repositorio.utmachala.edu.ec/jspui/bitstream/11131/3530/1/TESIS%20JULIO%20FAJARDO.pdf

47. Rodríguez, J., Méndez, E., Rivas, A., & Cortés, J. (2014). Evaluación de la presencia de Vibrio parahaemolyticus en camarón blanco (Litopenaeus vannamei) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. Revista Bio Ciencias, 2(4), 282-292.

48. Gómez, B., Roque, A., & Guerra, A. L. (2001). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de

Antimicrobianos. Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. Mazatlán, Sinaloa México, 315-346.

49. Dávalos, S. G., Natividad, B. I., Vazquez, C., & Quiñónez, E. (2005). Patógeno oportunista Vibrio vulnificus. Revista Digital Universitaria, VI, 4, 1-6.

50. Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal REDALYC. 7*(1), 153-170.

51. Burgos, F. (2003). Estudio de la sensibilidad de la Ciprofloxacina frente a Pseudomonas aisladas de diversas muestras biológicas. Recuperado de: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/811/1/TESIS.pdf

52. Ruíz, L. (2007). Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos (Doctoral dissertation, Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España).

53. Pacheco, J., Tomé, E., Guerra, M., Raybaudi, R. (2011). Efecto antioxidante y antimicrobiano de sales de ácidos orgánicos y extractos naturales en filetes de bagre dorado (*Brachyplatystoma rousseauxii*) refrigerados. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2 (1): 016-040 ISSN: 2218-4384

54. World Health Organization. (2005). Risk Assessment of Vibrio vulnificus in Raw Oysters: Interpretative Summary and Technical Report (Vol. VIII). FAO/WHO

55. Lynn, S. (2008). The Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* from Oyster Harvest Sites in the Gulf of Mexico. *ProQuest*.

56. Jones, M., & Oliver, J. (2009). Vibrio vulnificus: disease and pathogenesis. Infection and immunity, 77(5), 1723-1733.

57. Ji, H., Chen, Y., Guo, Y., Liu, X., Wen, J., & Liu, H. (2011). Occurrence and characteristics of *Vibrio vulnificus* in retail marine shrimp in China. Food Control, 22(12), 1935-1940.

58. Austin, B., Zhang, X.-H. (2006). Under the Microscope *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates.(Vol. 43). *Journal compilation 2006 The Society for Applied Microbiology, Lettes in Applied Microbiology.*

59. Robertson, P., Calderon J., Carrera L., Stark J., Zherdmant M., Austin B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeusvannamei*larvae (Vol. 32) *Diseases of Aquatic Organisms*

60. Aguirre, G., López, E., Vázquez, M. (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeusvannamei*. (Vol 4) *Scientia Agropecuaria.*

61. Mine, S., & Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, Vibrio harveyi. *Currentmicrobiology*, *63*(1), 1-7. DOI: 10.1007/s00284-011-9932-2

62. Zamora, D., Quiróz, C., Quiñonez, E. (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. Revista Digital Universitaria (Vol 6). Recuperado de http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/art33.htm

63. Gil, A., Lanata, C., Miranda, H., Prada, A., Seas, C., Hall, E., Meza, R., Barreno, C., Maúrtua, D., Nair, B. (2007). Gravedad de la gastroenteritis causada por *Vibrio parahaeomolyticus* del grupo pandémico en el Perú. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*. Edición 24 (4):350

64. San Cristóbal, W., Olea, A., Cachicas, V., Fernández, J., Ibáñez, D., Hormazábal, J., y otros. (2008). Manual de Procedimientos: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Chile: Ministerio de Salud - Instituto de salud Pública Chile.

65. Monserrat, Ll. (2009). Manejo de las Infecciones por Organismos Multirresistentes Modulo Uno: Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

Recuperado de http://www.sati.org.ar/files/infectologia/2009-Infecciones-por-P-aeruginosa-en-UTI-%20Revision.pdf

66. Brock, Mandigan, Martinko, Parker. 2004. Biología de los Microorganismos 10ma Edición Prentice Hall Hispanoamérica S.A.

67. Abdullahi R., Lihan S., Carlos B. S., Bilung M. L., Mikal M. K. y Collick F. (2013). Detection of oprL gene and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture environment. *European Journal of Experimental Biology*, 148-152.

68. Ruiz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al Conocimiento de su Estructura y al de los Mecanismos que contribuyen a su Resistencia a los Antimicrobianos. Barcelona: Universidad de Barcelona.

69. Hai, N. V., Buller, N., & Fotedar, R. (2009). Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (Penaeus latisulcatus Kishinouye, 1896). Aquaculture Research, 40(5), 590-602.

70. Hernández, A. (1997) "Microbiología", Editorial Paraninfo, Madrid.

71. Los Microorganismos (1998). Cuarta Edición p. 576. Barcelona

72. Acevedo, F., Gentina, J, Illanes, A. (2002). Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaiso. PUCV.

73. González, Y. (2014). Efecto de la adición de ácidos orgánicos y probióticos sobre el crecimiento del camarón *(Litopenaeus vannamei)* (Tesis de grado. Universidad Técnica de Machala).

74. Pojota S. (2011). Evaluación de acidificante orgánico en la crianza de pollos Broiler en la provincia de Pichincha. (Tesis de pregrado. Universidad Estatal de Bolívar). páginas 29-32.

75. Delvin, T. (2006). *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas* (Cuarta ed.). Barcelona, España: Reverté

76. Jaramillo, A. (2009). Ácidos orgánicos (cítrico y fumárico) como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (Bacitracina de Zn) en dietas para pollos de engorde. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, *2*(1).

77. Mine, S., &Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, Vibrio harveyi. *Currentmicrobiology*, *63*(1), 1-7. DOI: 10.1007/s00284-011-9932-2

78. Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. Microbial Evolution and Co-Adaptation: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of

Joshua Lederberg: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. 4, Antibiotic Resistance: Origins and Countermeasures. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45710/

79. Paredes, M., & Espinosa, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, *28*(1), 61-70.

80. García, J. (2010). *Aplicación de ácidos orgánicos como conservantes en productos cárnicos*. (Chemital, Editor) Recuperado de Chemital: www.chemital.es

81. Ramírez, J., Rosas, P., Velásquez, M., Ulloa, J. y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Recuperado de http: //fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf, ISSN 2007-0713.

82. Pesados, M., & Rubio, A. I. (2011). Caracterización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular presentes en exudados radiculares de Zea mays: Aplicaciones para la remediación de suelos contaminados por metales pesados.

83. Amani, S., Reham, A. (2012) Evaluation of Some Acids as Potential De contaminants of Vibrio parahaemolyticus in Fresh Shrimp. DOI 10.5829/idosi.wjdfs.2012.7.1.62151

84. Lückstädt, C. (2008). Effects of dietary acidifiers in aquaculture. ADDCON. Recuperado de: http://www.aquafeed.com/documents/1216999805_1.pdf

85. Cuéllar, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A., & Suárez, O. (2010). Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco Penaeus vannamei. OIRSA-OSPESCA, Panamá. Recuperado de: http://www.rr-americas.oie.int/actualizaciones%20enero_11/Manual%20de%20Buenas%20Prácticas%20en%20Camarones%20OIRSA-OSPESCA%20-%202010.pdf.

86. Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. Veterinary microbiology, 114(3), 173-186.

87. Leyva, G; Sáenz, L; Guevara, S. (2010). Protocolo de prevención y contingencias para el cultivo de camarón en baja California. Recuperado de: http://www.cesaibc.org/sitio/archivos/Protocolodecontingenciacamaron_2003 13153207.pdf.

88. Estívariz López de Guereñu, I. (2013). Efecto de la radiación visible sobre la supervivencia de Vibrio harveyi en el medio marino.

89. Varela, G; Grotiuz, G. Fisiología y metabolismo bacteriano. Recuperado de: http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf

90. Supe, A., & Fabián, W. (2012). Uso de Acidificantes en la Producción de Pollos de Broilers.

91. Torres, E., & Estrada, L. Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapeuticos en laboratorios Pronabell ltda. Recuperado de: http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis232.pdf

92. Anthony, F., Acar, J., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., & White, D. G. (2001). Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Revuescientifique et technique (*International Office of Epizootics*)*, *20*(3), 829-839. Recuperado de http://www.oie.int/doc/ged/D2007.PDF