



## **Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

Diseño de un protocolo de evaluación de probióticos para camarón  
*Penaeus vannamei* basado en criterios de calidad.

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero en Acuicultura**

Presentado por:

María Emilia Mora Alvarado

Johnny Vicente Nuñez Mendoza

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020



## **College of Maritime Engineering and Sea Science**

Design of a protocol for the probiotic evaluation of *Penaeus vannamei* shrimp based on quality criteria.

### **CAPSTONE COURSE**

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for  
the degree of:

### **Aquaculture Engineer**

By:

María Emilia Mora Alvarado  
Johnny Vicente Nuñez Mendoza

GUAYAQUIL - ECUADOR

Year: 2020

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a mi familia por brindarme los momentos más felices de mi vida, en especial a mis padres, por creer en mis capacidades y mostrarme el camino hacia la superación. A mis amigos de ESPOL y CENAIM por permitirme aprender de la vida a su lado, y a mis maestros, ya que sus conocimientos y dedicación fueron pilares fundamentales en mi formación profesional.

Johnny Nuñez

## **DEDICATORIA**

Este proyecto va dedicado para mis padres, Carlos y Glenda, por quienes ha valido todo el esfuerzo dedicado en estos años de carrera y por ser el pilar fundamental en mi vida. A mi sobrina, Elena, quien me motiva a ser mejor cada día. A Tommy, por su compañía incondicional y sus palabras de aliento en los momentos indicados. A mis grandes amigos, con quienes he compartido momentos gratos que han hecho de esta etapa universitaria, una aventura maravillosa. Y, por último, a Dios, por ser mi guía en este camino de la vida.

Emilia Mora

## **AGRADECIMIENTOS**

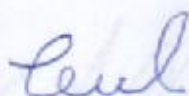
Nuestro más sincero agradecimiento a Bonny Bayot, *Ph.D*, su guía y confianza fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Al departamento de Salud animal y Bioprospección de CENAIM, con quienes formamos una bonita amistad. A la Blga. Mrna. Martha Borbor, y a la Blga. Mrna. Cecilia Tomalá, debido a que sus opiniones fueron muy importantes para el desarrollo de este proyecto. A los productores de camarón, técnicos de laboratorios de análisis, y a las autoridades de la acuicultura ecuatoriana, cuya aportación en el trabajo permitió determinar las necesidades del país con respecto a probióticos en acuicultura.

A nuestra familia, hermanos y padres, por depositar su confianza en nosotros y ser nuestro soporte principal.

Y, por último, a la ESPOL, por abrirnos las puertas e infundir en nosotros la excelencia académica, por lo que siempre se ha caracterizado.

## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *María Emilia Mora Alvarado* y *Johnny Vicente Nuñez Mendoza*, damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



María Emilia Mora  
Alvarado

M.Sc. José Márquez Montiel

PROFESOR DE LA MATERIA



Johnny Vicente Nuñez  
Mendoza

Bonny Narcisa Bayot Arce

PROFESOR TUTOR

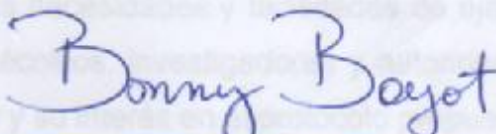
## RESUMEN

### EVALUADORES

*Panacaeus vannamei* es una de las especies más importantes para la acuicultura mundial. Sin embargo, la camaricultura se ha visto afectada por brotes de enfermedades producto de su intensificación, mismas que han provocado pérdidas monetarias dentro del sector camarero. Ante esta problemática, los probióticos surgen como una alternativa natural para el control de enfermedades, no obstante, su uso y aplicación han sido probados de forma empírica. Por lo que, en el presente documento, se propone diseñar un protocolo de evaluación de probióticos para cubrir la necesidad del sector camarero de contar con una guía para validar probióticos. Para ello, se siguió una serie de pasos que involucraron revisión bibliográfica de los criterios de calidad y modos de acción de probióticos, con la cual se filtraron las pruebas más adecuadas de acuerdo con las necesidades y limitaciones de ejecución. Posteriormente, se realizaron encuestas a técnicos de piscinas de camaricultura para validar la necesidad del sector y la viabilidad de la propuesta.



**M.Sc. Adrián José Márquez Montiel**



**Bonny Narcisa Bayot Arroyo, Ph.D.**

**PROFESOR DE LA MATERIA**

**PROFESOR TUTOR**

En este documento se obtuvo un protocolo que contiene los siguientes aspectos: revisión de las características y selección del probiótico, evaluación de características generales y riesgos, evaluación por modos de acción y validación en campo.

El presente documento tiene potencial aplicación como guía fundamental en la búsqueda y selección de los probióticos a utilizarse en piscinas de cultivo acuícolas según las características propias de cada granja.

**Palabras claves:** Probióticos, protocolo, evaluación, *Panacaeus vannamei*.

## RESUMEN

*Penaeus vannamei* es una de las especies más importantes para la acuicultura mundial. Sin embargo, la camaronicultura se ha visto afectada por brotes de enfermedades producto de su intensificación, mismas que han provocado pérdidas monetarias dentro del sector camaronero. Ante esta problemática, los probióticos surgen como una alternativa natural para el control de enfermedades, no obstante, su uso y aplicación han sido probados de forma empírica. Por lo que, en el presente documento, se propone diseñar un protocolo de evaluación de probióticos para suplir la necesidad del sector camaronero de contar con una guía para validar probióticos. Para ello, se siguió una serie de pasos que involucraron revisión bibliográfica de los criterios de calidad y modos de acción de probióticos, con la cual se filtraron las pruebas más adecuadas de acuerdo con las necesidades y facilidades de ejecución local. Además, se realizaron encuestas a técnicos, investigadores y autoridades de gobierno, para conocer la realidad del sector y su interés en el protocolo propuesto, en donde se obtuvo un total del 100% de técnicos encuestados, que estarían interesados en adquirirlo. Finalmente, reuniendo todas las características mencionadas, se obtuvo un protocolo que contiene los siguientes aspectos: revisión de las características y selección del probiótico, evaluación de características generales y riesgos, evaluación por modos de acción y validación en campo.

El presente documento tiene potencial aplicación como guía fundamental en la búsqueda y selección de los probióticos a utilizarse en piscinas de cultivo acuícola según las características propias de cada granja.

**Palabras claves:** Probióticos, protocolo, evaluación, *Penaeus vannamei*.



## **ABSTRACT**

*Penaeus vannamei* is one of the most important species for global aquaculture. However, shrimp farming has been affected by disease outbreaks due to its intensification, which have caused monetary losses within the shrimp industries. Given this problem, probiotics arise as a natural alternative for disease control, nevertheless, their use and application have been empirically tested leading to poor results and low replication. Therefore, in this document, it is proposed to design a protocol for the evaluation of probiotics to meet the needs of the shrimp sector to have a guide to validate probiotics. For this, a series of steps were followed that involved bibliographic review of the quality criteria and mechanisms of action of probiotics, with which the most appropriate tests were filtered according to the needs and facilities of local execution. In addition, surveys were conducted to technicians, researchers and government authorities, to know the reality of the sector and their interest in the proposed protocol, in wich a total of 100% of technicians would be interested in acquiring it. Finally, gathering all the mentioned characteristics, a protocol was obtained that contains the following aspects: review of the characteristics and selection of the probiotic, evaluation of general characteristics and risks, evaluation by modes of action and validation in field.

*This document has potential application as a fundamental guide in the search and selection of probiotics to be used in aquaculture according to the characteristics of each farm.*

**Keywords:** *Probiotics, protocol, evaluation, Penaeus vannamei.*

## ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	7
RESUMEN .....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	I
ÍNDICE GENERAL .....	II
ABREVIATURAS.....	VI
SIMBOLOGÍA.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
CAPÍTULO 1 .....	10
1.    Introducción .....	10
1.1    Descripción del problema .....	11
1.2    Justificación del problema .....	12
1.3    Objetivos .....	12
1.3.1    Objetivo General .....	12
1.3.2    Objetivos Específicos.....	12
1.4    Marco teórico.....	13
1.4.1    Definición de probióticos. ....	13
1.4.2    Modo de acción de los probióticos. ....	13
1.4.3    Uso de probióticos en acuicultura. ....	15
1.4.4    Características básicas de los probióticos en acuicultura.....	16
CAPÍTULO 2 .....	18
2.    Metodología.....	18
2.1    Identificación de criterios de calidad de probióticos eficientes en acuicultura.	

2.1.1	Características básicas de un probiótico. ....	19
2.1.2	Riesgos asociados por el uso de probióticos.....	20
2.1.3	Mecanismos de los modos de acción de los probióticos .....	21
2.1.4	Validación en campo.....	22
2.2	Información local sobre probióticos.....	23
2.2.1	Características de los principales probióticos comercializados en Ecuador para la salud del camarón. ....	23
2.2.2	Protocolos de manejo local de los probióticos comerciales. ....	23
2.2.3	Entrevistas a representantes de la industria acuícola.....	24
2.2.4	Capacidad local de análisis.....	24
2.3	Protocolo de evaluación de probióticos para camarón <i>Penaeus vannamei</i> . ....	24
CAPÍTULO 3 .....		27
3.	Resultados Y ANÁLISIS .....	27
3.1	Identificación de criterios de calidad de probióticos eficientes en acuicultura. ....	27
3.1.1	Características básicas de un probiótico .....	27
3.1.2	Riesgos asociados por el uso de probióticos.....	28
3.1.3	Mecanismos de los modos de acción de los probióticos .....	29
3.1.4	Validación en campo.....	33
3.2	Información local sobre probióticos.....	34
3.2.1	Características de los principales probióticos comercializados en Ecuador para la salud del camarón. ....	34
3.2.2	Protocolos de manejo local de los probióticos comerciales. ....	38
3.2.3	Entrevistas a representantes de la industria acuícola.....	41
3.2.4	Capacidad local de análisis.....	42
3.3	Protocolo de evaluación de probióticos para camarón <i>Penaeus vannamei</i> . ....	45

3.3.1	Pruebas para evaluar características generales.....	54
3.3.2	Pruebas para evaluar riesgos.....	55
3.3.3	Pruebas para evaluar modos de acción. ....	57
3.3.4	Evaluación en campo.....	63
3.4	Análisis de costos.....	67
CAPÍTULO 4 .....		70
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	70
4.1	Conclusiones.....	70
4.2	Recomendaciones.....	71
BIBLIOGRAFÍA .....		75
APÉNDICES.....		83

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
AHL	N-acylhomoserine lactona
AHPND	Necrosis hepatopancreática aguda
API	Índice analítico de perfil
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
DOPA	Dihidroxifenilalanina
FCA	Factor de conversión alimenticio
GXP	Glutación peroxidasa
INP	Instituto Nacional de Pesca
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LYS	Lisozima
MH	Müller Hinton
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
PCA	Agar de recuento de bacterias
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PO	Fenol oxidasa
proPO	Pro-fenoloxidasa
QS	Quorum sensing
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
THC	Cuantificación total de hemocitos
TSA	Agar de Soya Tríptico
TSV	Síndrome del Virus de Taura
UFC	Unidades formadoras de colonias
WSSV	Virus del síndrome de la mancha blanca

## SIMBOLOGÍA

µg	Microgramo
µL	Microlitro
g	Gramos
kg	Kilogramos
L	Litro
m	Metro
M	Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitros
mm	Milímetro
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
T	Tonelada
V	Voltio
v	Volumen
w	Peso

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mecanismo general de acción de los probiótico.....	13
Figura 1.2 Modo de acción de probióticos en cultivo de camarón.....	16
Figura 2.1 Esquema mostrando la metodología empleada para el diseño de los protocolos de evaluación de probióticos para camarón <i>P. vannamei</i> , basados en criterios de calidad.....	18
Figura 2.2 Riesgos asociados con el uso de probióticos.....	20
Figura 3.1 Sistema de jaulas artesanales donde se evaluó probióticos a nivel de camaronera. ....	33
Figura 3.2 Sistema para evaluar probióticos en postlarvas según la metodología descrita por Sotomayor et al. 2019. ....	34
Figura 3.3 Protocolo general de evaluación de probióticos basado en criterios de calidad.....	50
Figura 4.1 Protocolo 2 sugerido para la validación de probióticos. ....	73
Figura 4.2 Protocolo 3 sugerido que involucran pruebas de validación en campo. ...	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Interpretación de los puntajes asignados a la evaluación de criterios de calidad en función del costo y tiempo. ....	26
Tabla 3.1 Descripción técnica de los probióticos con registros sanitarios expedidos por el Instituto Nacional de Pesca (INP), vigentes al 2019 y comercializados para la salud del camarón. Las características de los probióticos fueron obtenidas de las etiquetas de los productos y/o las páginas Web de las compañías comercializadoras. ....	35
Tabla 3.2 Resultado de las encuestas a productores. ....	39
Tabla 3.3 Listado de análisis para la industria realizados por cuatro de los más grandes laboratorios acuícolas del país. ....	44
Tabla 3.4 Matriz de selección de criterios de calidad y metodologías de evaluación de probióticos eficientes para cultivos de camarón <i>P. vannamei</i> . ....	46
Tabla 3.5 Análisis de costos aproximado de la validación de las pruebas del protocolo. ....	67
Tabla 3.6 Análisis de costos aproximado de pruebas <i>in vitro</i> . ....	68
Tabla 3.7 Costos aproximados de implementación de sistema de validación en campo para camaronerías. ....	68
Tabla 3.8 Costos aproximados de implementación del sistema de validación en campo para laboratorios de larvas. ....	69



# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es uno de los sectores más importantes de la acuicultura mundial [1], con una producción que para finales del 2020 superó los 5 millones de toneladas métricas [2]. La especie más exitosa es *Penaeus vannamei*, cuyo cultivo representa el 76.2% de la producción mundial de camarones cultivados [2]. Sin embargo, el desarrollo de la camaronicultura, en especial la que se realiza a gran escala, ha favorecido las condiciones de estrés que favorecen la aparición de enfermedades [3]. Las enfermedades constituyen una de las limitantes más importantes para la producción acuícola [4], llegando a generar pérdidas millonarias [5]. Tradicionalmente, los antibióticos han sido utilizados como una de las herramientas para prevenir o controlar enfermedades [4][6]. Sin embargo, su uso ha sido controversial, principalmente por el riesgo de desarrollo y propagación de resistencia entre patógenos bacterianos [7][6]. Dentro de este contexto, los probióticos constituyen una de las alternativas naturales más prometedoras para el control de enfermedades [8][3]. La industria del camarón ecuatoriano, al igual que el resto de la acuicultura global, considera a los probióticos como una herramienta importante para el control de enfermedades y mejora de la producción [9]. No obstante, su aplicación ha sido de forma empírica, y poco basada en criterios técnicos que abalen su aplicación [10]. Además, los probióticos han generado controversia debido a que algunos productos ofrecen baja o nula eficiencia para combatir los problemas por los cuales han sido aplicados [10]. En algunos casos la baja eficiencia se atribuye al uso de bacterias alóctonas del huésped o de su medio circundante [11]. En una encuesta realizada por los autores de este trabajo, se evidenció la necesidad del sector camaronero de contar con protocolos que los guíe en las diferentes metodologías para evaluar la efectividad de los probióticos que utilizan, y con ello mejorar su producción. El objetivo del presente trabajo fue diseñar un protocolo integral de evaluación de probióticos para el cultivo de camarón *P. vannamei* basado en criterios de calidad, para que sirva como guía práctica para los camaronicultores. El protocolo está enfocado en los probióticos que exhiben la capacidad de mejorar la salud del camarón por medio del mantenimiento del equilibrio microbiano interno. Por tanto, no incluye los probióticos con funciones de biorremediación.

## 1.1 Descripción del problema

Con el incremento de la intensificación y comercialización de la producción en acuicultura, los organismos acuáticos se encuentran expuestos a situaciones de estrés, debido a condiciones ambientales negativas, mala calidad de agua, e inadecuadas prácticas de manejo, haciéndolos más susceptible a brotes de enfermedades virales y bacterianas, reflejándose en grandes pérdidas económicas [12][13].

Las enfermedades bacterianas han sido consideradas un cuello de botella en la producción intensiva de la acuicultura. Estas enfermedades se han dado comúnmente por bacterias Gram-negativas, como *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, y en especial el género *Vibrio* [3]. Tradicionalmente, se ha utilizado químicos, como los antibióticos, como estrategia de manejo de la salud de los animales de cultivo [14]. Sin embargo, los residuos de estos químicos permanecen en el ambiente durante grandes períodos de tiempo, por lo que su uso con fines profilácticos y terapéuticos han resultado en el incremento de resistencia a antibióticos en patógenos humanos o de animales [15], riesgo de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos [16], alteración de floras bacterianas nativas [6], y riesgo de rechazo de lotes de camarón, en caso de la detección de trazas de antibióticos por parte de los países importadores [17]. Además, en algunos casos los antibióticos autorizados para su uso en acuicultura han llegado a ser ineficientes para combatir patógenos circulantes [18].

Tomando en cuenta la necesidad de la camaronicultura de contar con métodos efectivos y naturales para contrarrestar los problemas sanitarios que afronta el sector, los probióticos surgen como una alternativa sostenible para la producción de un camarón más orgánico, por su variedad de mecanismos de acción [19]. Sin embargo, pese a los múltiples beneficios que ofrecen los probióticos, su uso empírico ha provocado controversias sobre su efectividad. Esto puede ser explicado en parte por el desconocimiento de los productores sobre los criterios de calidad que definen a un probiótico efectivo, y de las metodologías para evaluar tales efectividades. Por tanto, es importante que el sector camaronero conozca cuales son los análisis reproducibles y a pequeña escala que se pueden realizar para evaluar la efectividad de un probiótico, debido a que el uso de probióticos eficientes incrementa las probabilidades de una mejora en la producción [20].

## **1.2 Justificación del problema**

La producción de camarón es una de las actividades productivas más importantes para el Ecuador, constituyendo el primer rubro económico no petrolero, con ganancias de \$3,235 millones en el 2018 [21]. Sin embargo, la historia ha demostrado que la camaronicultura ecuatoriana es vulnerable al embate de enfermedades. Entre 1993 y 1994, el Síndrome del Virus de Taura (TSV) disminuyó la producción de camarón ecuatoriano entre un 15 y 30% [22]. Mientras que, en el 2000, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) quebró al sector camaronero, al reducir en un 80% la producción, requiriendo alrededor de 6 años para que la industria se recupere [23].

Actualmente, el crecimiento vertiginoso de la producción de camarón está amenazado por la aparición de enfermedades emergentes, en especial por aquellas provocadas por bacterias del género *Vibrio*. La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), provocada por *Vibrios*, portadores de los genes PirVP que expresan las toxinas PirA y PirB [24], es al momento una de las enfermedades de camarón más emergentes. En los últimos años AHPND ha provocado pérdidas cercanas a \$1 billón [5]. Por lo tanto, es importante contar con métodos efectivos para contrarrestar posibles pérdidas económicas, en un sector que en Ecuador genera aproximadamente 180,000 plazas de empleo directos e indirectos [25].

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Diseñar un protocolo de evaluación de probióticos para camarón *Penaeus vannamei* basado en criterios calidad.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar los criterios de calidad de probióticos eficientes para cultivos de camarón
- Elaborar un protocolo de evaluación de probióticos basados en criterios de calidad.

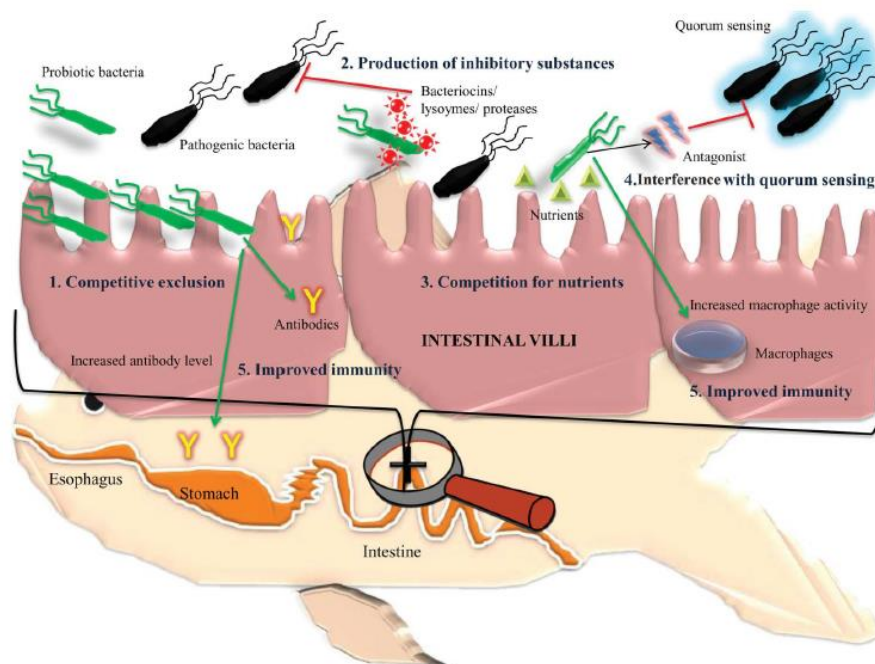
## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Definición de probióticos.

El término “probiótico” proviene de la palabra “*pro*” y “*bios*” que significa “vida” [26]. La Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura (FAO), definen a los probióticos como microorganismos vivos que, administrados en condiciones adecuadas, confieren beneficios de salud al hospedero [27]. Se han otorgado varias definiciones para este término, sin embargo, en todos es usado para referirse a bacterias que promueven el balance de microorganismos de la flora intestinal.

### 1.4.2 Modo de acción de los probióticos.

Los efectos benéficos de los probióticos pueden ser medidos por uno o varios modos de acción (Figura 1.1). Principalmente los probióticos actúan produciendo un efecto antagónico contra otras bacterias, a través de algunos modos de acción: exclusión competitiva por sitios de adhesión, antagonismo directo por producción de sustancias inhibitorias, competencia por nutrientes, interrupción del QS y mejora de la respuesta inmune [20].



**Figura 1.1** Mecanismo general de acción de los probióticos [28]

### **Exclusión competitiva por sitios de adhesión y colonización.**

La mayoría de las bacterias patógenas necesitan adherirse a las paredes de la mucosa gastrointestinal del hospedero durante las primeras etapas de infección. Algunas bacterias probióticas son capaces de colonizar el intestino adhiriéndose temporalmente a la mucosa intestinal, de esta manera previenen la fijación de patógenos como bacterias coliformes y clostridias [29][30]. La exclusión competitiva es un fenómeno por el cual una microflora establecida previene o reduce la colonización de una bacteria competidora ubicada en el mismo lugar en el intestino [31]. Por lo tanto, la competencia de los probióticos por espacio (sitios de adhesión) en el intestino o en otros tejidos del tracto digestivo es un mecanismo antagonista para la colonización de bacterias patógenas [13].

### **Competencia por nutrientes.**

La sobrevivencia de una comunidad bacteriana depende de su habilidad para competir por los nutrientes del medio y por la energía disponible con otros microorganismos presentes en el mismo ambiente [13]. Los probióticos efectivos son capaces de superar a los patógenos utilizando los nutrientes disponibles en el medio. En consecuencia, este mecanismo restringe la presencia de los patógenos en el tracto intestinal al no existir nutrientes en el medio que puedan consumir para sobrevivir [32].

### **Interrupción del *quorum sensing*.**

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo que utilizan las bacterias para regular genes de expresión a través de la producción y liberación de pequeñas moléculas señales llamadas autoinductores [33]. La *N*-acylhomoserine lactona (AHL) es una de estas moléculas, y es liberada por bacterias Gram-negativas [34], que habilita la producción de mecanismos de patogenicidad, tales como movimiento en enjambre y formación de biopelículas [35]. Algunas otras bacterias probióticas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacillus cereus* son degradadoras de señales moleculares de bacterias patógenas a través de secreciones enzimáticas o producción de autoinductores antagonistas [36]. Un estudio realizado por Medellín-Pena comprobó que la bacteria *Lactobacillus acidophilus* secreta una molécula que inhibe el QS o interactúa con la transcripción bacteriana del gen 0157, un gen de virulencia de la *Escherichia coli* [37]. Este mecanismo también ha sido observado en bacterias del género *Bacillus* por medio

de la producción de enzimas denominadas lactonasa [38]. En acuicultura, la interrupción del QS de bacterias patógenas es una estrategia reciente para combatir enfermedades infecciosas [39].

### **Mejora de la respuesta inmune.**

Algunos estudios han reportado que los probióticos estimulan el sistema inmune celular, por medio de los mecanismos de inmunidad de encapsulación, formación nodular y fagocitosis, así como el sistema inmune humoral por la producción de aglutinantes, proteínas anticoagulantes, enzimas fenoloxidasas, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, entre otros. Estas últimas son capaces de detener el crecimiento de otros organismos [40] [41].

Un estudio realizado por Balcázar, demostró que al administrar diferentes cepas bacterianas de *Bacillus* y *Vibrios* sp. ocurría una mejora en el crecimiento y sobrevivencia de juveniles de *P. vannamei* y efectos en contra del patógeno *Vibrio harveyi* y WSSV a través del incremento de la actividad fagocítica y antibacteriana [42]. Además, por medio de ensayos de interferencia de ARN se ha confirmado que el uso de probióticos provoca un incremento en la respuesta inmune de camarones en contra de enfermedades virales [43].

### **1.4.3 Uso de probióticos en acuicultura.**

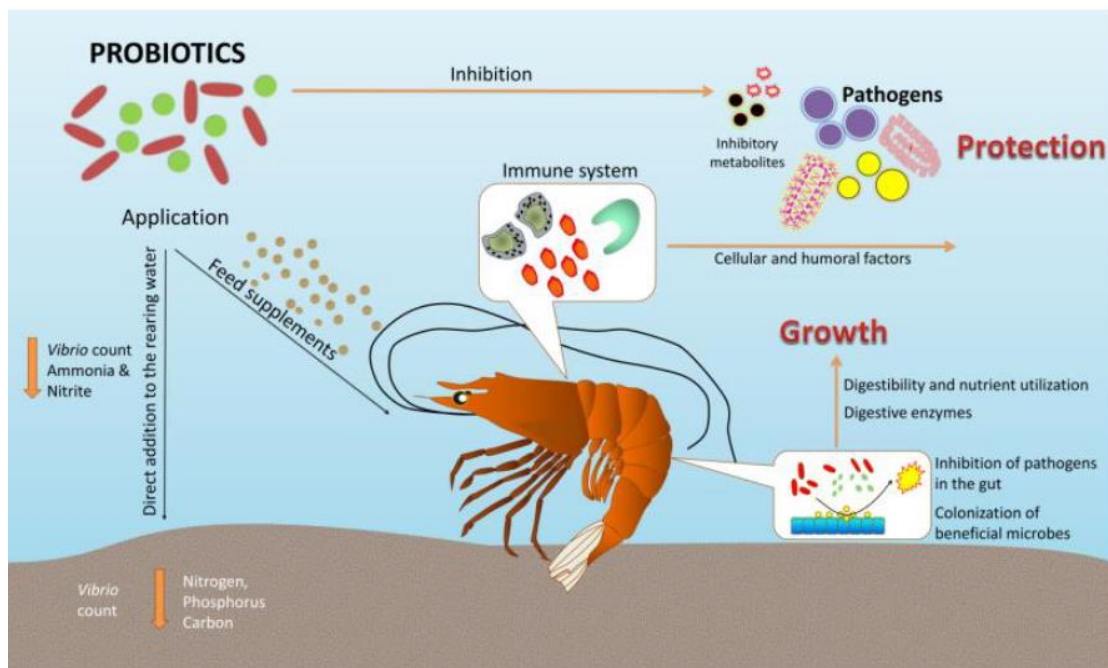
Los probióticos han sido utilizados desde 1980 hasta la actualidad [44]. Usualmente, son obtenidos de animales terrestres, sin embargo, hoy en día muchos de ellos son aislados de los mismos organismos acuáticos, ya sea desde la mucosa o el tracto gastrointestinal [45].

Los probióticos proveen muchos beneficios para la actividad acuícola, como el mejoramiento de la nutrición de los organismos hospederos, reducción de la incidencia de enfermedades, altas tasas de supervivencia, y mejora de la respuesta inmune (Figura 1.2) [13][46].

Usualmente los probióticos son utilizados directamente en el agua o añadidos en el alimento para tratar enfermedades, como las causadas por el género *Vibrio*. Los probióticos más usados en acuicultura son bacterias fotosintéticas, bacterias antagonistas (*Pseudoalteromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Alteromonas* spp.,



*Phaeobacter* spp. y *Bacillus* spp.) y bacterias que mejoran la digestión (ácido lácticas y levaduras) [42].



**Figura 1.2** Modo de acción de probióticos en cultivo de camarón [47]

#### 1.4.4 Características básicas de los probióticos en acuicultura.

Generalmente, la selección de probióticos por parte de los productores se efectúa de manera empírica, y no basada en la evidencia científica, lo que provoca que se seleccionen los microorganismos inadecuados. Aunque los criterios de selección de probióticos se encuentran definidos, sin embargo, estos protocolos deben ser adaptados de acuerdo con la especie y su ambiente.

Para que un probiótico sea exitoso en el cultivo, necesita seguir una serie de propiedades que se nombran a continuación:

1. Antagonismo a patógenos. Deben ser capaces de estimular el sistema inmune del hospedero y producir sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, entre otros [48][13][49][41][50].
2. Debe conferir beneficios al hospedero. Promover su crecimiento o protegerlo de patógenos [48][50].
3. Deben ser capaces de sobrevivir o colonizar el intestino del organismo acuático por adhesión. Así mismo, la presencia de la bacteria probiótica debe ser

dominante en el medio donde se encuentre el organismo acuícola, para asegurar su buen crecimiento y competencia por nutrientes con las bacterias patógenas [13].

4. Los microorganismos probióticos no deben tener efectos tóxicos o patogénicos en el hospedero [48].
5. El origen del probiótico, de preferencia, debe ser aislado de la especie hospedera en la cual van a ser utilizados, debido a que se ha demostrado que este tipo de probióticos tienen mejores oportunidades de competir con las bacterias patógenas u oportunistas residentes y establecerse numerosamente en el hospedero [51].

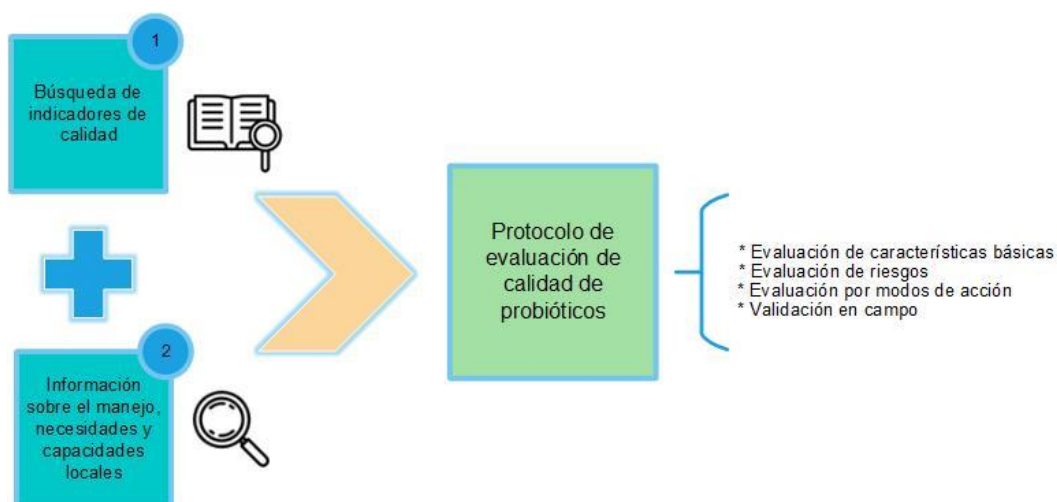
Aunque las pruebas *in vitro* son importantes para evaluar los diferentes modos de acción de los probióticos, es transcendental que sean acompañadas con pruebas *in vivo*, debido a que existen bacterias que muestran excelentes características en laboratorio, pero no necesariamente en el campo [12].



# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

Los protocolos para la evaluación de los probióticos se realizaron según la metodología de *Design thinking* [52], para balancear los requerimientos técnicos, que en forma global son necesarios para la evaluación integral de un probiótico, con las necesidades y limitaciones de la industria camaronera nacional. El diseño consistió en un proceso de tres etapas (Figura 2.1). En la primera etapa se investigó en la literatura científica cuales eran los criterios de calidad de los probióticos eficientes en acuicultura. Posteriormente, en la segunda etapa, se colectó la información sobre los probióticos comercializados en Ecuador, manejo, necesidades y capacidades locales de evaluación de criterios de calidad de los probióticos. Finalmente, en la tercera etapa, las informaciones colectadas en las dos primeras fueron utilizadas para elaborar el protocolo *per se* de evaluación de calidad de los probióticos para camarón *P. vannamei*. Este protocolo estuvo a su vez compuesto de cuatro grupos de criterios de calidad: evaluación de las características básicas de los probióticos, evaluación de los riesgos asociados al uso de los probióticos, evaluación de los modos de acción y validación en campo. Los protocolos elaborados en el presente trabajo resumen los procedimientos básicos para evaluar la efectividad de los probióticos, constituyendo una guía práctica para los productores de camarón.



**Figura 2.1** Esquema mostrando la metodología empleada para el diseño de los protocolos de evaluación de probióticos para camarón *P. vannamei*, basados en criterios de calidad.

## **2.1 Identificación de criterios de calidad de probióticos eficientes en acuicultura.**

Se realizó una búsqueda bibliográfica en la literatura científica sobre criterios de calidad de probióticos eficientes en acuicultura, lo cual incluyó los siguientes cuatro aspectos: a) características básicas de un probiótico, b) riesgos asociados por el uso de los probióticos, c) mecanismos de los modos de acción benéficos que ejercen los probióticos efectivos sobre el huésped, y d) validación en campo.

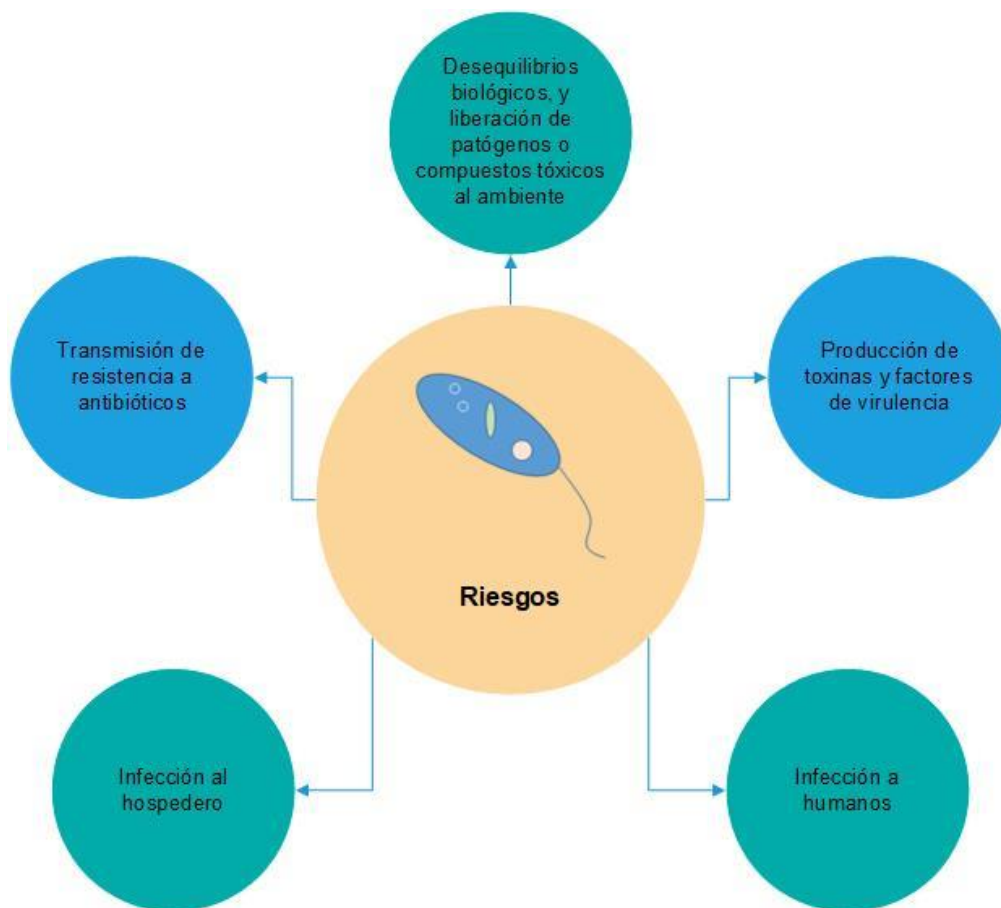
### **2.1.1 Características básicas de un probiótico.**

De acuerdo con la literatura científica, se encontró que los probióticos deben seguir las siguientes características:

- Resistencia al pH del tracto gastrointestinal del organismo hospedero [36].
- Origen biológico y composición (cuantitativa y cualitativa) declarados en el producto comercial o en la ficha técnica [53].
- Condiciones de uso y propiedades del probiótico declarados en el producto comercial o en la ficha técnica [53].
- Ausencia de toxicidad para el hospedero [36].
- Capacidad de reducir microorganismos patógenos [36].
- Capacidad del organismo hospedero de aceptar el probiótico por medio de la ingesta y capacidad del probiótico de colonizar al organismo hospedero [32].
- Capacidad del probiótico de alcanzar los órganos donde actúa el probiótico [32].
- Ausencia de genes de resistencia a antibióticos o genes de virulencia [13].
- Capacidad para sobrevivir a los procesos de transportación y comercialización [54].

### 2.1.2 Riesgos asociados por el uso de probióticos.

Se elaboró un protocolo que evalúa los riesgos asociados al uso de probióticos que puedan estar ocasionando problemas en la producción, y que a su vez transmitan sus riesgos a la cadena de consumo humana [53] [55] [57]. Estos riesgos fueron: producción de toxinas o riesgos de infección al hospedero o a humanos, transferencia horizontal de genes de virulencia o de resistencia a antibióticos a otras bacterias, y desequilibrios biológicos al ambiente por la liberación de patógenos o compuestos tóxicos al ambiente (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Riesgos asociados con el uso de probióticos.

### 2.1.3 Mecanismos de los modos de acción de los probióticos

1. Los probióticos tienen un efecto antagónico contra bacterias patógenas, que se efectúa a través de la producción de sustancias inhibitorias, como bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, proteasas, ácidos orgánicos, aminoácidos, lípidos, u otros [13]. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que pueden tener efectos bactericidas o bacteriostáticos frente a cepas patógenas [58]. Además, estas sustancias son capaces de inhibir los factores de virulencia interfiriendo en el QS de las bacterias [59]. Otras moléculas que intervienen en la interrupción del QS son las enzimas lactonasas, que inactivan señales moleculares del QS. Específicamente inhiben la producción de moléculas AHLs por medio de la apertura de su anillo de lactona [38]. Por ejemplo, las furanonas son lactonas que regulan los genes de expresión en los sistemas de producción de AHL o en sistemas multicanales de los *Vibrios* por medio de la interacción de reguladores de transcripción [40][65].
2. Otro mecanismo de acción de los probióticos es la competencia por los sitios de adhesión, para evitar la colonización de patógenos en el intestino o en otras superficies. Para esto, es necesario que la bacteria se adhiera al organismo hospedero para poder establecerse y colonizar. Gracias al espacio limitado disponible en el epitelio, existe una competencia por los sitios de adhesión, en donde el patógeno no puede establecerse si se este se encuentra colonizado por organismos probióticos. Esta adhesión puede ser específica, por medio de receptores moleculares en las células epiteliales, o no específica, basada en factores fisicoquímicos [13].
3. Los probióticos tienen la capacidad de mejorar el apetito del hospedero y la digestión de los alimentos, y con ello promover el crecimiento del organismo acuático por medio de la producción de enzimas extracelulares, como proteasas y lipasas. Estas enzimas son capaces de digerir los enlaces peptídicos en las proteínas y de esta manera descomponen las proteínas en monómeros y aminoácidos libres que benefician al estado nutricional del animal [61].

4. Los probióticos son capaces de mejorar la respuesta inmune de los crustáceos por medio de dos maneras: (1) Mejorando la actividad de los macrófagos, incrementando la capacidad de fagocitar microorganismos o partículas de carbono; (2) Incrementando anticuerpos en las mucosas de la pared intestinal. La defensa frente a patógenos en crustáceos es basada en mecanismos del sistema inmune innato [62]. El sistema pro-fenoloxidasa (proPO) es uno de los componentes del sistema inmune en camarones, en donde se da la activación de la enzima fenoloxidasa da como resultado una sustancia denominada melanina. La enzima fenoloxidasa juega un rol importante en el control de bacterias de la hemolinfa y control de patógenos. De esta manera, la actividad enzimática y la expresión de lisozima, una enzima que actúa en defensa contra bacterias patógenas, puede ser estimulada por la adición de probióticos [47].

#### **2.1.4 Validación en campo**

Aunque un probiótico haya tenido excelentes resultados *in vitro* o *in vivo*, es importante que el producto sea validado bajo las condiciones de cultivo en la cual va a actuar (prueba en campo) [63] [64], para lo que se realiza un seguimiento al crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticio (FCA), entre otras variables de producción [12]. La validación incluye la identificación de la frecuencia y dosificación adecuadas, para evitar eficiencias reducidas o una sobredosis [12]. La frecuencia y dosificación de los probióticos dependen del consorcio de organismos probióticos, la ontogenia y dieta del hospedero, la concentración del probiótico, y el medio en el cual se lo esté aplicando [46]. Los probióticos en los sistemas de producción acuícolas pueden suministrarse a través de: el alimento artificial, el agua de cultivo o bioencapsulado en organismos vivos. Generalmente los consorcios de organismos probióticos son más eficientes cuando son aplicados de forma recurrente, o cuando pueden colonizar y proliferar el tracto digestivo del hospedero [64] [65].

## **2.2 Información local sobre probióticos.**

Se colectó información local sobre: a) características de los principales probióticos comercializados en Ecuador para la salud de camarón, b) protocolos de manejo local de los probióticos comerciales (criterios de selección y uso), y conocimiento que los productores poseen sobre los criterios de calidad y los riesgos asociados al uso de probióticos, c) entrevistas a técnicos locales, investigadores, autoridades de la Cámara Nacional de Acuicultura y Subsecretaría de Acuicultura y d) información de los tipos de pruebas de evaluación de calidad que realizan los laboratorios que prestan servicios de análisis a la industria camaronera.

### **2.2.1 Características de los principales probióticos comercializados en Ecuador para la salud del camarón.**

Se colectó el listado actualizado a 2019 del Universo de los probióticos expedidos por el Instituto Nacional de Pesca (INP) con registros sanitarios comercializados para la salud del camarón y que estaban registrados bajo la razón social de una empresa. Posteriormente, se investigó las características de estos probióticos, consultando las etiquetas de los productos y/o las páginas Web de las compañías comercializadoras de los productos. La información resultante fue resumida en una tabla de descripción técnica, conteniendo los detalles de: especies, concentración, modo de acción, y dosificación declaradas de los probióticos comercializados en Ecuador para la salud del camarón.

### **2.2.2 Protocolos de manejo local de los probióticos comerciales.**

Se realizó una encuesta a diez productores de camarón para evaluar los criterios locales de selección, protocolos de aplicación, y conocimiento sobre los criterios de calidad y riesgos asociados a los probióticos comerciales. La encuesta incluyó a productores de laboratorios de maduración, larvicultura y engorde de camarón, que emplean sistemas de producción semi-extensivos o super intensivos.

### **2.2.3 Entrevistas a representantes de la industria acuícola.**

Se realizaron entrevistas a representantes de sectores que cumplen un rol importante en la industria acuícola (Academia/Investigación, Sector Privado y Gobierno), y cuyas decisiones son importantes para el desarrollo de la camaronicultura ecuatoriana. Los entrevistados fueron: cuatro técnicos locales de laboratorios de análisis que, entre su cartera de servicios para la industria, efectúan análisis de calidad de probióticos, cuatro investigadores de la Academia que han realizado estudios sobre probióticos, una autoridad de la Cámara Nacional de Acuicultura (Directora Ejecutiva) y una autoridad de la Subsecretaría de Acuicultura (Subsecretario de Acuicultura). La modalidad de obtención de la información fue a través de entrevistas y no con un formato de encuestas, para extraer ideas adicionales que podrían generar valor a la propuesta final. En la sección resultados se lista los principales comentarios obtenidos con esta parte del estudio.

### **2.2.4 Capacidad local de análisis.**

Se colectó información de cuatro de los laboratorios más grandes del país que realizan servicios de análisis a la industria acuícola, y que entre su cartera de análisis ejecutan pruebas que sirven para evaluar la efectividad de probióticos. Con la información obtenida se determinó los tipos de análisis de evaluación de calidad de los probióticos que son viables de ejecutar a nivel del país. Esta información fue resumida en una tabla presentada en la sección de resultados.

## **2.3 Protocolo de evaluación de probióticos para camarón *Penaeus vannamei*.**

Una vez obtenida la información de indicadores de calidad de probióticos eficientes (primera etapa) y colectada la información local (segunda etapa) se procedió con la tercera etapa consistente en el desarrollo del protocolo de evaluación de probióticos para camarón. Las metodologías de evaluación de los criterios de calidad de los probióticos fueron calificadas cuantitativamente en función de los siguientes criterios de calificación:

- Costo: Valor monetario que implica ejecutar la prueba.
- Tiempo: Periodo en el cual se obtendrían resultados de la prueba.
- Calidad de resultados: Grado de sensibilidad que ofrece la metodología para evaluar el criterio de calidad, según lo descrito en la literatura.
- Facilidad de ejecución en el país: Viabilidad de evaluar los criterios de calidad en base a la realidad del país. Considera tanto las pruebas que son realizadas por los laboratorios de análisis, como los que puedan ser implementadas por los laboratorios de larvas y camaronerías.

Estos criterios de calificación fueron ponderados de la siguiente forma: Costo (20%), Tiempo (10%), Calidad de resultados (40%) y Facilidades de aplicación (30%). El criterio de calidad de resultados recibió la ponderación más alta debido a que se desea evaluar la calidad. Mientras que, las facilidades de ejecución en el país recibieron la segunda ponderación más alta, dado que el protocolo fue diseñado para productores del país. Estos dos criterios sumaron 70%, y de esta forma se balanceó los requerimientos técnicos, que en forma global son necesarios para la evaluación integral de un probiótico, con las necesidades y limitaciones de la industria camaronera nacional. El criterio de costo de la evaluación recibió una mayor ponderación (20%) que el tiempo de obtención de los resultados, dado que, en las entrevistas, los productores manifestaron que no estaban dispuestos a pagar costos altos por la evaluación de los probióticos.

A su vez, los criterios de calidad fueron agrupadas en los cuatro grupos mencionados previamente (evaluación de las características básicas de los probióticos, evaluación de los riesgos asociados al uso de los probióticos, evaluación de los modos de acción y validación en campo), y cada una de las metodologías de evaluación fueron valoradas, para cada uno de los criterios de calificación, con los puntajes de 1,3 o 5. Siendo 1 la calificación de menor valor y 5 la de mayor valor. Se otorgó los puntajes 1,3 y 5 para los criterios de costos y tiempo de acuerdo con lo descrito en la tabla 2.1. Mientras que, los criterios de calidad de resultados y facilidad de ejecución fueron ponderados de acuerdo con el criterio de los autores. Para el caso particular del criterio de facilidades de ejecución, las pruebas que no son realizadas por ningún laboratorio local de análisis recibieron una puntuación de 0.



**Tabla 2.1** Interpretación de los puntajes asignados a la evaluación de criterios de calidad en función del costo y tiempo.

Puntaje	Costo de la evaluación del criterio de calidad (\$)	Tiempo en obtener los resultados de la evaluación del criterio de calidad (días)
1	<200	>10
3	50-200	3-10
5	0-50	1-3

El criterio de calidad con los más altos puntajes en todos los cuatro criterios de evaluación tuvo un valor total máximo sin ponderar de 20 puntos, que equivalió al total ponderado de 5 puntos. Los criterios de calidad que tuvieron una calificación del total ponderado superior a 3.5 (70%) fueron los seleccionados para elaborar el protocolo de evaluación. En el caso de criterios de calidad con más de una metodología de evaluación que recibieron calificaciones del total ponderado superiores a 3.5, se seleccionó la metodología con mayor puntaje para elaborar el protocolo de evaluación. Para cada uno de los criterios de evaluación seleccionados se elaboró un protocolo compuesto de los pasos principales de ejecución y su respectiva descripción. Las pruebas de validación en campo fueron descritas con un alto nivel de detalle para que los productores puedan replicarlos en el campo, y los costos fueron detalladamente valorados, considerando el total de una muestra (un probiótico a ser evaluado), y una prueba *in vivo* de desafío de camarones administrados con el probiótico y desafiados con un patógeno, con una duración total de 7 días.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Identificación de criterios de calidad de probióticos eficientes en acuicultura.

A continuación, se muestra los resultados de la investigación en la literatura científica sobre los criterios de calidad de probióticos eficientes en acuicultura.

#### 3.1.1 Características básicas de un probiótico

##### 3.1.1.1 Cuantificación e identificación bacteriana.

Para conocer las características de patogenicidad, requerimientos de cultivo y aptitud de los posibles probióticos, se debe obtener información acerca de la identidad del organismo [12]. Las principales pruebas de identificación bacteriana están basadas en métodos fenotípicos y moleculares.

Las pruebas fenotípicas incluyen los sistemas manuales o galerías multipuebas, tales como la prueba de identificación bioquímica a nivel de especie API® (bioMérieux), que dan a conocer el género y especie del organismo utilizando un kit de microtubos compuestos de sustratos deshidratados [66]. Estos microtubos son inoculados con una suspensión bacteriana en agua salina que rehidrata los medios. Durante la incubación, se produce un cambio de coloración, con lo que se consigue identificar el organismo por medio de un catálogo dado por el fabricante. Dentro de las pruebas fenotípicas se encuentra las pruebas bioquímicas rápidas, lentas y de resistencia a determinadas sustancias, así como la observación de las características macroscópicas y observación de crecimiento en medios de cultivos. Por ejemplo, se utiliza el agar selectivo TCBS para el crecimiento y cuantificación de *Vibrio* sp., y agar MRS para el crecimiento y cuantificación de bacterias del género *Lactobacillus* sp. A partir de las siembras, se identifica morfológicamente el género de los organismos presentes en los agares y se contabiliza las colonias.

Con los métodos moleculares se realiza la identificación bacteriana a nivel de especie por medio de un análisis de secuencias de ADN de genes específicos. Para ello, se realiza un análisis en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), generalmente para la

amplificación del gen 16S ARNr. Posteriormente, se realiza la secuenciación del producto amplificado para la obtención de las secuencias de ADN del gen estudiado. Finalmente, se realiza un análisis bioinformático, utilizando algoritmos de comparación de secuencias de ADN, tales como el software BLAST, disponibles en la base de datos pública del National Center for Biotechnology Information (NCBI) [67].

### **3.1.2 Riesgos asociados por el uso de probióticos**

#### **3.1.2.1 Evaluación de toxicidad.**

La evaluación de toxicidad o patogenicidad de probióticos en los huéspedes usualmente es evaluada a través de pruebas *in vivo*, en donde los probióticos son añadidos en dependencia a la vía de aplicación del producto [46][12]. Los experimentos suelen llevarse a cabo en pequeñas unidades experimentales, donde al final de la prueba se contabiliza la tasa de supervivencia [68]. Las evaluaciones de toxicidad son generalmente acompañadas de análisis en fresco e histología de los animales supervivientes [69][70]. Además, las pruebas *in vivo* han sido utilizadas para evaluar las propiedades de los probióticos de producir enzimas [71], colonizar [72], e inmunoestimular al hospedero [73].

Para el caso particular de AHPND, la expresión de los genes (ARNm) que codifican para las toxinas PirA y PirB, que puede ser semi-cuantificada con análisis de PCR a tiempo real [74].

Los géneros y especies de probióticos utilizados en animales generalmente son considerados seguros para los humanos [55]. Sin embargo, existe el riesgo de que ocurra una infección, o una intoxicación por la producción de toxinas [53]. En este contexto, los microorganismos de grupos taxonómicos que representan un riesgo para la salud humana, han sido descartados como potenciales probióticos [55].

Existen estudios donde se ha demostrado que bacterias tienen efectos en el crecimiento de microalgas deseables para la acuicultura [75]. Sin embargo, también hay cepas probióticas que solo han tenido efecto sobre especies de algas indeseables [76] [77]. Dado a los múltiples beneficios que tienen las microalgas en la producción, en especial para los estadios iniciales del camarón, es importante que potenciales probióticos no ocasionen efectos sobre las microalgas benéficas para la producción.

### **3.1.2.2 Detección de genes de virulencia.**

Un potencial probiótico preferentemente no debe contener genes de virulencia, sin embargo, bacterias patógenas para una especie necesariamente no lo son para otra [12]. La detección de genes codificantes a factores de virulencia ha sido evaluada en probióticos a partir de PCR, en donde se detectó la presencia de sustancias de agregación, gelatinasa, proteína enterocócica, hialuronidasa, precursores de citolisina, y modificadores postraduccionales [78].

### **3.1.2.3 Susceptibilidad a antibióticos**

Es preferible que los probióticos no contengan genes de virulencia o resistencia a antibióticos, de esta manera no son capaces de transmitir estos genes a bacterias patógenas [12].

La susceptibilidad a antibióticos puede ser realizada por medio de un antibiograma en placas de agar Mueller Hinton (MH), en donde se coloca discos de sensibilidad a antibióticos y se inocula 100 µl de la bacteria probiótica con carga bacteriana de  $10^6$ . Los resultados son observados mediante un halo de inhibición y, dependiendo del tamaño se clasifica a la bacteria como resistente, intermedia o sensible [79].

La detección de genes de resistencia también puede observarse por medio de la amplificación del gen de resistencia a antibióticos por PCR [78]. Se sintetizan primers que se anillan en los extremos de estos genes y a partir de esos primers, se realiza una amplificación por PCR para la detección del gen de interés en la cepa probiótica [80].

## **3.1.3 Mecanismos de los modos de acción de los probióticos**

### **3.1.3.1 Pruebas de antagonismo a patógenos.**

Los microorganismos son capaces de producir metabolitos primarios y secundarios que tienen un efecto bactericida o bacteriostático en otros organismos. Para medir la actividad antagónica de los probióticos se utiliza la técnica por difusión en agar MH descrita por Wang, en donde se coloca discos impregnados con el probiótico. Después de 24 horas de incubación se miden los diámetros de inhibición [81].

Los probióticos también han sido evaluados contra patógenos representativos a través de desafíos a pequeña escala. En los desafíos, inicialmente se suministró los probióticos a los organismos de cultivo, luego los patógenos, y finalmente se evaluó la supervivencia

de los camarones [72]. Sin embargo, las mortalidades en estas pruebas pueden ser ocasionadas por bacterias oportunistas, además de que existe la limitante de que no se pueden probar los probióticos contra todos los patógenos posibles. Por tanto, este tipo de pruebas es recomendable para probióticos con un efecto antagónico sobre patógenos específicos.

### **3.1.3.2 Disrupción del QS**

Pese a que la producción de antimicrobianos por parte de organismos probióticos constituye una de las herramientas más importantes para combatir patógenos, existe el riesgo inherente que bacterias nocivas para la producción desarrollen resistencia a los productos extracelulares de las bacterias probióticas (bactericidas o bacteriostáticos). En este contexto, la interrupción de la comunicación bacteriana o *quorum quenching*, es una alternativa interesante para provocar la disrupción de la expresión de factores de virulencia asociados a patogenicidad, sin modificar las comunidades bacterianas [34]. Algunos probióticos han mostrado la capacidad de inhibir o degradar acil-homoserina lactonas o AHL (autoinductores de bacterias gram-negativas) de patógenos de crustáceos [82] [83]. La degradación de AHL por parte de bacterias probióticas ha sido evaluada a través del uso de la cepa CV026 de *Chromobacterium violaceum* como reportero de AHL (produciendo pigmentación violeta al estar en presencia del autoinductor). Al sembrar las bacterias probióticas, la coloración violeta del agar desaparece, por lo que ocurre una degradación del AHL [82], [83]. Adicionalmente la disrupción del QS también ha sido valorada a través de la secuenciación del ADNr 16S [83].

### **3.1.3.3 Producción de compuestos benéficos.**

Algunos probióticos suplementados a la dieta de camarones han demostrado tener un efecto positivo sobre la actividad enzimática de los crustáceos [90] [92] [86]. El aporte nutricional de los probióticos desde el punto de vista de la actividad enzimática, no solo incluye la producción de enzimas digestivas por parte de los probióticos, sino también la producción de cofactores, y la estimulación a la síntesis de enzimas por parte del hospedero [87]. La producción de enzimas de manera general puede ser evaluada a través de la digestión enzimática de camarones desafiados con probióticos [71], [86],

para luego evaluar la actividad de enzimas como la amilasa, proteasa, celulasa, lipasa, entre otras. La actividad de la proteasa ha sido valuada por el método de digestión de caseína reaccionando con Folin's [71], [88], la actividad de la amilasa utilizando en método de almidón soluble [71], [86], [88], la actividad de la celulasa por medio del número de moléculas de glucosas liberadas [88], la actividad de la lipasa utilizando p-nitrofenil palmitato [86], y la actividad total de proteínas usando albúmina de suero bovino [71], [85].

La producción de enzimas digestivas por parte de probióticos también ha sido evaluada *in-vitro* usando test API ZYM [78], sin embargo, este método no permite conocer el efecto de probióticos en la producción de cofactores enzimáticos y en la síntesis de enzimas por parte del hospedero.

#### **3.1.3.4 Modulación del sistema inmune.**

El sistema inmune de los crustáceos básicamente se encuentra conformado dos fases, la primera basada en efectos humorales y la segunda en efectos celulares, mismas que trabajan en conjunto para combatir a los patógenos [89]. Entre los parámetros humorales se puede destacar la concentración de proteínas plasmáticas y la capacidad antibacteriana del plasma [73]. Mientras que, la concentración de hemocitos, actividad fenoloxidasa, y la concentración de anión superóxido, son los factores celulares más relacionados con el estado de salud de los camarones [73].

Pruebas de hemogramas, anión superóxido, actividad fenoloxidasa (PO), actividad antimicrobiana en plasma y proteína plasmática, índice inmunitario, y la prueba *in vitro* de interacción probiótico plasma, han sido utilizadas para evaluar el efecto inmunoestimulante de probióticos en *P. vannamei* [90]. El hemograma básicamente se realiza a través del conteo total y diferencial de hemocitos en la hemolinfa de camarones por medio de una cámara de Neubauer en un microscopio óptico invertido [90]. La concentración de anión superóxido se ha cuantificado por medio de la reducción del Nitro blue tetrazolium (NBT) por el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [91]. La actividad fenoloxidasa puede ser medida por la formación de dihidroxifenilalanina (DOPA), resultante de la oxidación de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), de acuerdo con lo presentado en [91], [92]. La cuantificación antibacteriana del plasma se realiza a través del método turbidímetro, basado en la evaluación de crecimiento bacteriano en la presencia de

plasma de camarones y la evaluación de la concentración de proteína plasmática por el método de Lowry [93]. Todos los análisis mencionados anteriormente pueden ser evaluados por medio del cálculo del índice inmunitario, donde los resultados de cada prueba inmunitaria son transformados a un índice global para ser utilizados en la prueba [90]. Sin embargo, las pruebas ya mencionadas requieren la hemolinfa de camarones desafiados con probióticos, por lo que aquellos análisis enzimáticos resultan inviables si se los quiere realizar con larvas o postlarvas (dificultad de extracción de hemolinfa al ser muy pequeños). Frente a aquella problemática, la actividad enzimática en larvas puede ser evaluada por medio de análisis de PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR). Por RT-qPCR se han cuantificado genes de PO, lisozima (LYS), y glutatión peroxidasa (GXP), en ARN de larvas de camarón previamente sometidas a un desafío con las cepas probióticas [94]. El método de cuantificación por RT-qPCR también ha sido utilizado para evaluar la expresión de genes inmunitarios en camarones juveniles [71], [95].

### ***3.1.3.5 Capacidad de adhesión y colonización.***

La capacidad que tienen las bacterias probióticas a adherirse y colonizar el tracto gastrointestinal del organismo hospedero, permite que los probióticos compitan con los patógenos e impidan su colonización en el animal [46].

Cuando la bacteria se adhiere correctamente al tracto gastrointestinal del hospedero, forma biopelículas que pueden ser observadas por medio una metodología de tinción con cristal violeta. En este caso, se utiliza una microplaca ELISA de 96 pocillos en donde se inocula la bacteria probiótica a diferentes concentraciones. La capacidad de formación de biopelículas es medida por un espectrofómetro [96].

Para evaluar la eficiente colonización del probiótico en el organismo hospedero, se realiza una prueba de desafío en donde se inocula el probiótico. La concentración de bacterias en los animales es determinada por medio de una siembra en diferentes agares de la muestra de los organismos macerados y diluidos. El porcentaje de colonización es establecido por medio de la cuantificación de las UFC/g basado en la morfología de las colonias [97].



### 3.1.4 Validación en campo

Aunque un probiótico haya tenido excelentes resultados *in vitro* o *in vivo* a nivel de laboratorio, es importante que el producto tenga una validación rigurosa bajo las condiciones de cultivo en la cual va a actuar (prueba en campo) [63], [64]. Probar un probiótico bajo condiciones de cultivo implica realizar un seguimiento del crecimiento, supervivencia, factor de conversión alimenticio (FCA), y otros factores de cultivo relacionados a la producción del hospedero [12]. En postlarvas, evaluaciones *in vivo* de probióticos han permitido validar sus efectos en la producción [98], [66], [72], encontrándose que probióticos con excelente perfil en pruebas *in vitro* tuvieron efectos nulos a adversos en el cultivo de camarón [98], [99]. Aplicación de probióticos en cultivo de camarones juveniles y adultos a nivel de campo, también han sido útiles para su validación [72], [98], [100]. En los sistemas de producción, la evaluación de un probiótico que provoque efectos adversos en el cultivo de camarón puede conllevar pérdidas económicas importantes para los productores. Además, en la mayoría de los casos solo se destina un tanque o piscina para la evaluación, por lo que los resultados no presentan validez estadística. Para paliar aquella problemática, existen alternativas como la que se encuentra descrita en Montgomery [101], donde se evaluaron probióticos en jaulas artesanales ubicadas en el interior de una piscina de producción (Figura 3.1), o para el caso de los laboratorios de larvas en donde los probióticos pueden ser probados en recipientes de 500 mL (Figura 3.2), tal como se describe en [18].



**Figura 3.1** Sistema de jaulas artesanales donde se evaluó probióticos a nivel de camaronera [101].





**Figura 3.2** Sistema para evaluar probióticos en postlarvas según la metodología descrita por Sotomayor et al. 2019 [18].

### 3.2 Información local sobre probióticos

#### 3.2.1 Características de los principales probióticos comercializados en Ecuador para la salud del camarón.

Del total de 1263 productos comerciales utilizados en acuicultura que cuentan con registros sanitarios expedidos por el INP y actualizados a 2019, 16 de ellos son probióticos registrados bajo la razón social de una empresa y destinados a la salud de los camarones (Tabla 3.1). Aproximadamente el 69% de los probióticos contenían al menos una cepa de *Bacillus*, mientras que 12 y 19% de los probióticos declararon contener *Vibrios* y *Lactobacillus*, respectivamente. Bacterias como *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Thiobacillus*, *Streptococcus*, y *Paracoccus*, estaban declaradas en apenas el 6% de los probióticos. El 12% de los probióticos no declararon las especies de bacterias contenidas en su producto. Con respecto a los modos de acción declarados, el 25, 37, 6, 50 y 25% de los productos ofrecían propiedades bactericidas o bacteriostáticas, exclusión competitiva por sitios de adhesión, inhibición de la comunicación bacteriana, inmunoestimulación, y mejora en la nutrición, respectivamente.

**Tabla 3.1** Descripción técnica de los probióticos con registros sanitarios expedidos por el Instituto Nacional de Pesca (INP), vigentes al 2019 y comercializados para la salud del camarón. Las características de los probióticos fueron obtenidas de las etiquetas de los productos y/o las páginas Web de las compañías comercializadoras.

Producto	Especies de bacterias declaradas	Concentración bacteriana declarada	Modo de acción declarado	Dosificación
1	<i>Bacillus</i>	$>1 \times 10^{11}$	Inhibición de patógenos como <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1 a 10 ppm en agua y 4 a 10 ppm en alimento para larvas
2	<i>Bacillus</i>	$>5 \times 10^{10}$	Controlador para vibrios patógenos	0.1 a 4 g/kg alimento
3	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. thermofilum</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>L. plantarum</i>	$1 \times 10^9$	Mejora en la salud del hospedero y exclusión competitiva de patógenos.	5 g/kg de alimento balanceado o tonelada de agua
4	No especifica	No especifica	Coloniza el intestino, excluye patógenos por competencia, produce enzimas digestivas, secreta sustancias antibacterianas y estimula sistema inmune	No especifica
5	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformes</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> .	$1 \times 10^{12}$	Mejora flora intestinal del hospedero, competencia con patógenos, inmunoestimulante	100-200 g/ha o 1-3g/kg de balanceado

Producto	Especies de bacterias declaradas	Concentración bacteriana declarada	Modo de acción declarado	Dosificación
6	<i>B. lincheniformes</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. pumilus</i> .	$5 \times 10^{12}$	Exclusión competitiva de <i>Vibrios</i>	250 g/200 L o 2g/kg de alimento
7	<i>B. amyloliquefaciens</i>	$1 \times 10^9$	Inmunoestimulante y mejora la digestibilidad	1000-2000 g/T
8	<i>Pediococcus acidolactici</i>	$2 \times 10^{11}$	Coloniza el tracto digestivo, aumenta tasa de supervivencia	4-5 g/kg alimento
9	<i>B. subtilis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Thiobacillus denitrificans</i> , <i>Paracoccus pantotrophus</i>	$1 \times 10^9$	Mejora crecimiento, inmunoestimulante, exclusión competitiva de patógenos	0.5-2kg/ha
10	<i>Lactobacillus</i> , <i>B. cereus</i>	$1 \times 10^6$	Reduce mortalidad, promueve asimilación de proteínas, inmunoestimulante	3 L/saco balanceado o 1/1000 L
11	<i>Vibrio hepatarius</i>	$1 \times 10^8$	Mejora crecimiento y respuesta inmune	1 m/kg alimento
12	<i>Bacillus</i>	$1 \times 10^6$	Mejora crecimiento y respuesta inmune	1 m/kg alimento
13	<i>Vibrio diabolicus</i>	$1 \times 10^8$	Mejora crecimiento y respuesta inmune	10 m/tonelada

Producto	Especies de bacterias declaradas	Concentración bacteriana declarada	Modo de acción declarado	Dosificación
14	No especifica	$5 \times 10^{10}$	Colonización del tracto digestivo, inhibe patógenos, produce enzimas, inmunoestimulación	No especifica
15	<i>B. coagulans</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. licheniformis</i>	$2 \times 10^9$	Colonización del tracto digestivo, exclusión de vibrios patógenos	1 kilo/20 L de agua
16	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>L. brevis</i>	$1 \times 10^9$	Competencia por recursos, producción de sustancias inhibitorias, inhibición del quorum sensing	1 kg/1000 kg alimento

### **3.2.2 Protocolos de manejo local de los probióticos comerciales.**

La encuesta estuvo conformada por 15 preguntas (Tabla 3.2). De los 10 técnicos encuestados, el 60% estaba a cargo de laboratorios de larvas y/o maduración, mientras que el 40% restante trabajaban en camaroneras. El 91% de los productores mencionaron que hacían uso de probióticos, mientras que el restante 9% comentó que no los usaba debido a que los consideran caros o pocos funcionales. En mayor proporción, utilizan probióticos con el fin de combatir patógenos (89%). Las principales especies utilizadas son *Bacillus* (89%) y bacterias ácido-lácticas (78%). Los productores prefieren utilizar probióticos que contienen multicepas de bacterias (89%). En otro punto, el 67% manifestó que no siguen los protocolos de las fichas técnicas de los productos, dado que consideran que en muchos probióticos la información de las etiquetas no es la correcta, o que los vendedores les atribuyen propiedades que no poseen. Así mismo algunos mencionaron que los productos no suelen ajustarse a las necesidades de sus sistemas de producción. La mayoría de los productores encuestados utilizan probióticos aislados del hospedero (78%) y/o del medio circundante al hospedero (67%). Los probióticos son usados principalmente como profilácticos (89%), contra varias enfermedades bacterianas (entre 44 y 56%), aunque también son usados contra enfermedades virales (entre 22 y 33% de los encuestados). La mayoría de los probióticos son aplicados al agua (89%) o incorporados al alimento (78%). Los probióticos son administrados principalmente con una periodicidad menor a 2 semanas (78%) y son activados mayoritariamente con melaza líquida. Todos los encuestados coincidieron en que el criterio de selección de los probióticos está basado por los resultados en campo (100%). El 78% de los encuestados mencionaron que realizaban pruebas para evaluar probióticos, las que en su mayoría eran validaciones realizadas en pocas unidades de producción. En menor medida algunos productores han realizado pruebas de antagonismo contra patógenos en agar, caracterización e identificación de probióticos, y conteo de UFC en distintos agares. Por último, el 100% de los encuestados manifestó interés en un protocolo de evaluación de probióticos de calidad.

Aunque en la encuesta, los productores manifestaron que prefieren probióticos con bacterias que han sido aisladas del hospedero o de su medio circundante, muchos desconocen el origen biológico de los productos que adquieren.

**Tabla 3.2** Resultado de las encuestas a productores.

Pregunta		Respuesta (%)
¿Utiliza probióticos en su cultivo?	Si	91
	No	9
¿Para qué utiliza los probióticos?	Inmunoestimulante	33
	Mejora de digestibilidad	44
	Combatir patógenos	89
¿Qué tipo de cepas probióticas utiliza?	<i>Bacillus</i>	89
	Bacterias ácido-lácticas	78
	<i>Aeromonas</i>	0
	<i>Vibrios</i>	11
	<i>Enterococcus</i>	44
	<i>Pseudoenteromonas</i>	0
¿Cuántas cepas tienen los probióticos que utiliza?	Una cepa	11
	Multicepas	89
¿Sigue los protocolos de la ficha técnica de los productos?	Si	33
	No	67
¿Qué tipo de probiótico prefiere utilizar?	Aislado del hospedero ( <i>Penaeus vannamei</i> )	78
	Aislado del medio circundante al hospedero	67
	Aislado de otras especies acuáticas	33
	Aislado de especies terrestres	11
	Aislado de medios terrestres	11
	Indiferente	11
Uso de los probióticos	Profiláctico	89
	Curativo	44
¿Contra qué enfermedad utiliza principalmente los probióticos?	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND/EMS)	56
	Síndrome de bolitas	56
	Síndrome de Zoea	44
	Vibriosis sistémica	78
	Necrosis del hepatopáncreas bacteriano (NHP)	33
	Enfermedad de la Mancha Blanca (WSSV)	22
	Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV)	33
¿Cómo aplica los probióticos?	Agua	89
	Balanceado enriquecido con probióticos	78
	Balanceado con inclusión de probióticos por microencapsulación (fábrica)	0
	Suelo	22

Pregunta		Respuesta (%)
	Bioencapsulación	11
	Suspensión bacteriana	11
¿Con que frecuencia en promedio aplica los probióticos?	Cada semana o menos	78
	Cada dos semanas	11
	Cada mes	11
¿Cómo activan los probióticos?	Solo con agua	33
	Melaza líquida	66
	Melaza granulada	11
	Azúcar morena	11
	Polvillo de arroz	11
	Oligosacárido comercial	1
	Almidón de arroz	11
¿Cuál es su criterio de selección de probióticos?	Aplicación directa	11
	Precio	22
	Recomendación	22
	Facilidades de preparación	22
¿Realiza algún tipo de prueba para evaluar la efectividad del probiótico?	Resultados en campo	100
	Si	78
¿Estaría interesado en un protocolo de validación de probióticos?	No	22
	Si	100
¿Cuánto dinero como máximo estaría dispuesto a pagar por un análisis de laboratorio para determinar la efectividad de un probiótico?	No	0
	\$0-50	22
	\$50-100	33
	\$100-200	22
	\$200-500	11
>\$500	11	

### **3.2.3 Entrevistas a representantes de la industria acuícola.**

A continuación, se lista los comentarios más relevantes obtenidos las entrevistas realizadas a técnicos locales que efectúan análisis de calidad de probióticos, investigadores que han realizado estudios sobre probióticos, y autoridades cuyas decisiones son importantes para el desarrollo de la camaronicultura ecuatoriana.

- Los probióticos son una de las alternativas más interesantes para paliar los problemas de la acuicultura desde el punto de vista del concepto holobionte, y por su variedad de mecanismos de acción.
- Los probióticos son excelente productos, sin embargo, para potenciar sus beneficios es necesario combinarlos con sustancias inmunoestimulantes o con prebióticos. Adicionalmente, es importante que probióticos con la capacidad de colonizar al huésped sean complementados con probióticos que tengan un efecto antagónico sobre organismos patógenos en el medio.
- La composición bacteriana varía de acuerdo con la edad de los camarones y el sistema de cultivo en el cual se encuentren. La flora bacteriana de larvas no es muy estable, y se encuentra influenciada por las bacterias presentes en el alimento y el agua. Por tanto, probióticos con la función de colonización del hospedero serán mucho más eficientes en larvas si se los compara con camarones juveniles o adultos.
- Los probióticos deben administrarse de manera previa a la siembra de los organismos de cultivo, para de esa manera establecer una microbiota benéfica, la cual pueda competir antes de que los patógenos hayan prosperado.
- Los probióticos que serán utilizados en acuicultura deben de adaptarse muy bien a las condiciones de cultivo, debido a que competirán con organismos patógenos muy bien acondicionados. Por lo que es importante que los probióticos comerciales contengan organismos que hayan sido aislados del hospedero, o por lo menos de su medio circundante.
- Hay que hacer pruebas en laboratorio y en campo para validar probióticos. La validación en laboratorio es importante porque hay productos comerciales que no contienen la composición declarada. En tanto que, la validación en campo es importante debido a que el funcionamiento de los probióticos en laboratorio no garantiza su funcionamiento en los sistemas de producción.



- Para validar probióticos, por lo menos se deberían hacer pruebas de sensibilidad en placas de agar (pruebas de antagonismo), conteo e identificación bacteriana, y pruebas en campo, con suficiente número de réplicas para que los resultados sean significativos.
- Las evaluaciones *in vitro* de probióticos comerciales han mostrado que en algunos casos no contienen las bacterias declaradas, y en mayor proporción, no exhiben las propiedades especificadas en las fichas técnicas. Alrededor del 90% de los productos evaluados no funcionan.
- Si el probiótico requiere condiciones muy específicas para poder tener un efecto en la producción, no vale la pena utilizarlo, especialmente por las condiciones de cultivo de Ecuador.

#### **3.2.4 Capacidad local de análisis**

Los análisis para la evaluación de los criterios de calidad de probióticos realizados por los cuatro laboratorios encuestados que prestan servicios a la industria camaronera se encuentran listados en la tabla 3.3. La tabla detalla los resultados de 22 análisis agrupados por criterios de calidad. La validación en campo se encuentra listada en la tabla, a pesar de que se pueden realizar en todos los laboratorios de larvas y camarónicas. La evaluación de toxicidad en humanos no ha sido listada en la tabla debido a que solo requiere una búsqueda en bases de datos.

Solamente una de las pruebas de evaluación es realizada por los cuatro laboratorios (Siembra en agar para la cuantificación bacteriana). En tanto que, en dos de los laboratorios se realiza: las pruebas de identificación bacteriana de morfología de colonias y pruebas bioquímicas, pruebas *in vivo* de administración de probióticos a camarones para evaluar su toxicidad, antibiogramas para evaluar la susceptibilidad a antibióticos, prueba de antagonismo por difusión en agar, prueba de desafío con camarones administrados con probióticos para evaluar el antagonismo a patógenos, y prueba *in vivo* con posterior identificación y cuantificación bacteriana para evaluar la capacidad de colonización de los probióticos. Solamente uno de los cuatro laboratorios (Laboratorio 1) realiza el 68% de los análisis (15/22), pero manifestó que está implementando algunos de los análisis faltantes y que estaría en capacidad de estandarizar los restantes, para completar el 100% de las metodologías de evaluaciones. Además, este laboratorio

realiza análisis indirecto de disrupción de *quorum sensing*, a través de pruebas *in vitro* de cuantificación de factores de virulencia (ejemplo, análisis de formación de biofilm, producción de exopolisacáridos, entre otros).

**Tabla 3.3** Listado de análisis para la industria realizados por cuatro de los más grandes laboratorios acuícolas del país.

Criterio de calidad	Tipo de evaluación	Metodología de evaluación	Laboratorio			
			1	2	3	4
Características básicas de los probióticos	Cuantificación	Siembra en agar	X	X	X	X
	Identificación bacteriana	Morfología de colonias	X		X	
		Pruebas bioquímicas	X		X	
		Secuenciación	X			
Riesgos asociados al uso de probióticos	Toxicidad en hospedero	Prueba <i>in vivo</i> de administración de probióticos	X		X	
		PCR para detección de toxinas causantes de AHPND	X			
	Toxicidad en el medio	Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad para microalgas	X			
	Factores de virulencia	Semi-cuantificación de expresión de genes de virulencia por PCR a tiempo real				
		Susceptibilidad a antibióticos	Antibiograma	X		X
	PCR para detección de genes de resistencia a antibióticos					
Modo de acción de los probióticos	Antagonismo a patógenos	Pruebas <i>in vitro</i> de difusión en agar	X		X	
		Prueba de desafío con camarones administrados con probiótico	X		X	
	Disrupción del quorum sensing	Degradación de N-acylhomoserine lactona AHL en placas de agar				
		Secuenciación				
	Producción de compuestos benéficos	Evaluación enzimática				
		Pruebas rápidas para la detección de enzimas bacterianas				
	Modulación del sistema inmune	Ensayos inmunitarios	X			
		Semi-cuantificación de expresión de genes de la respuesta inmune con análisis de PCR en tiempo real				
	Capacidad de adhesión	Prueba <i>in vitro</i> de formación de biopelículas	X			
Capacidad de colonización	Prueba <i>in vivo</i> , con identificación y cuantificación bacteriana	X		X		
Validación en campo	Evaluación bajo condiciones de cultivo	Prueba en pequeñas unidades experimentales	X			

### **3.3 Protocolo de evaluación de probióticos para camarón *Penaeus vannamei*.**

Las pruebas para validar probióticos descritas en la sección 3.3 son listadas y valoradas en la tabla 3.4 considerando la información obtenida en la literatura y la información colectada localmente (características de los probióticos comercializados en Ecuador, protocolos de manejo local, opinión de expertos y autoridades de acuicultura, y la capacidad de análisis de los laboratorios de acuicultura). Diez de los 23 criterios de calidad tuvieron una calificación del total ponderado superior a 3.5 (Tabla 3.4), siendo estos los criterios seleccionados para validar probióticos comerciales (Tabla 3.4). Estos criterios con mayor calificación fueron: cuantificación bacteriana por siembra en agar y morfología de colonias, toxicidad de los probióticos en humanos en base a la revisión de base de datos, toxicidad de los probióticos en hospedero por prueba *in vivo* de administración de probióticos, prueba de antibiogramas para evaluar la susceptibilidad del probiótico a los antibióticos, pruebas de antagonismo por la metodologías *in vitro* de difusión en agar y prueba de desafío de camarones administrados con probióticos, ensayos inmunitarios para la evaluación del sistema inmune, prueba *in vivo* con camarones para evaluar la capacidad de colonización con posterior identificación y cuantificación bacteriana, y evaluación bajo condiciones de cultivo a través de pruebas en pequeñas unidades experimentales. Usando estos diez criterios de calidad se construyó el protocolo general de evaluación de probióticos (Figura 3.3), mientras que, los criterios de calidad que tuvieron una calificación del total ponderado inferior a 3.5 no fueron incluidas en los protocolos. Finalmente, se explica las metodologías de evaluación seleccionadas mediante diagramas de flujo (Figuras 3.4 a 3.15).

**Tabla 3.4** Matriz de selección de criterios de calidad y metodologías de evaluación de probióticos eficientes para cultivos de camarón *P. vannamei* valorados según cuatro criterios de calificación ponderados [costo: 20%, tiempo: 10%, calidad de resultados (10%) y facilidades de ejecución (30%)]. Las metodologías de evaluación fueron calificadas con los puntajes 1,3 o 5. Siendo 1 y 5 las calificaciones de menor y mayor valor, respectivamente. Para el criterio de facilidades de ejecución, las metodologías que no son realizadas por ningún laboratorio de análisis consultado en este trabajo recibieron una puntuación de 0.

Criterio de calidad	Tipo de evaluación	Metodología de evaluación	Criterios de calificación (Ponderación)				Total sin ponderar (Valor máximo = 20)	Total ponderado (Valor máximo = 5)
			Costo (20%)	Tiempo (10%)	Calidad de resultados (40%)	Facilidades de ejecución (30%)		
Características básicas de los probióticos	Cuantificación	Siembra en agar	5	5	5	5	20	5.0
	Identificación bacteriana	Morfología de colonias	5	5	3	5	18	4.2
		Pruebas bioquímicas	3	5	3	3	14	3.2
		Secuenciación	3	1	5	1	10	3.0
Riesgos asociados al uso de probióticos	Toxicidad en humanos	Revisión de bases de datos	5	5	3	5	18	4.2
	Toxicidad en hospedero	Prueba <i>in vivo</i> de administración de probióticos	1	3	5	5	14	4.0
		PCR para detección de toxinas causantes de AHPND	3	3	3	0	9	2.1
	Toxicidad en el medio	Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad para microalgas	5	3	3	3	14	3.4
	Factores de virulencia	Semi-cuantificación de expresión de genes de virulencia por análisis de PCR a tiempo real	3	3	5	0	11	2.9
	Susceptibilidad a antibióticos	Antibiograma	5	5	5	5	20	5.0
PCR para detección de genes de resistencia a antibióticos		3	3	5	0	11	2.9	

Criterio de calidad	Tipo de evaluación	Metodología de evaluación	Criterios de calificación (Ponderación)				Total sin ponderar (Valor máximo = 20)	Total ponderado (Valor máximo = 5)
			Costo (20%)	Tiempo (10%)	Calidad de resultados (40%)	Facilidades de ejecución (30%)		
Modo de acción de los probióticos	Antagonismo a patógenos	Pruebas <i>in vitro</i> de difusión en agar	5	5	5	5	20	5.0
		Prueba de desafío de camarones administrados con probióticos	1	3	3	3	10	4.4
	Disrupción del <i>quorum sensing</i> (QS)	Degradación de N-acylhomoserine lactona AHL en placas de agar	5	5	3	0	13	2.7
		Secuenciación	3	1	5	0	9	2.7
	Producción de compuestos benéficos	Evaluación enzimática	5	1	3	0	9	2.3
		Pruebas rápidas para la detección de enzimas bacterianas	3	5	3	0	11	2.3
	Modulación del sistema inmune	Ensayos inmunitarios	5	3	5	1	14	3.6
		Semi-cuantificación de expresión de genes de la respuesta inmune por análisis de PCR en tiempo real	3	3	5	0	11	2.9
	Capacidad de adhesión	Prueba <i>in vitro</i> de formación de biopelículas	3	5	3	1	12	2.6
	Capacidad de colonización	Prueba <i>in vivo</i> , con identificación y cuantificación bacteriana	1	1	5	5	12	3.8
Validación en campo	Evaluación bajo condiciones de cultivo	Prueba en pequeñas unidades experimentales	5	3	3	5	16	4.0
		Prueba en unidades de producción	5	3	1	5	14	3.2

El protocolo general de evaluación de probióticos estuvo conformado por seis partes (Figura 3.3):

1) Revisión de las características del producto que se va a evaluar: Antes de iniciar las pruebas de los probióticos, es importante que los productores conozcan las propiedades de los productos a través de las fichas técnicas e información que puedan recabar de las empresas que los suministran. A partir de aquella información, los probióticos van a poder ser evaluados y juzgados de forma adecuada, siempre y cuando se respeten las consideraciones del fabricante. En esta sección los productores deberán revisar las propiedades, origen, composición cuantitativa y cualitativa, condiciones e instrucciones de uso, estado del producto (líquido, polvo, etc), condiciones de almacenamiento y transporte, fecha de fabricación y de expiración.

2) Selección del probiótico en base a su origen: Los productores deberán elegir preferentemente a probióticos aislados del hospedero dado a que tienen mayor posibilidad de tener éxito al momento de colonizar y tener éxito bajo las condiciones de cultivo de la camaronicultura. Sin embargo, si los productores desean evaluar probióticos obtenidos de diferentes fuentes a las de los hospederos (alóctonos), queda a su criterio.

3) Evaluación de características generales: Contiene las pruebas que deberán realizarse a todos los probióticos para evaluar su calidad sin importar su mecanismo de acción. En cada recuadro de los mecanismos de validación se encuentra la metodología para corroborar el criterio.

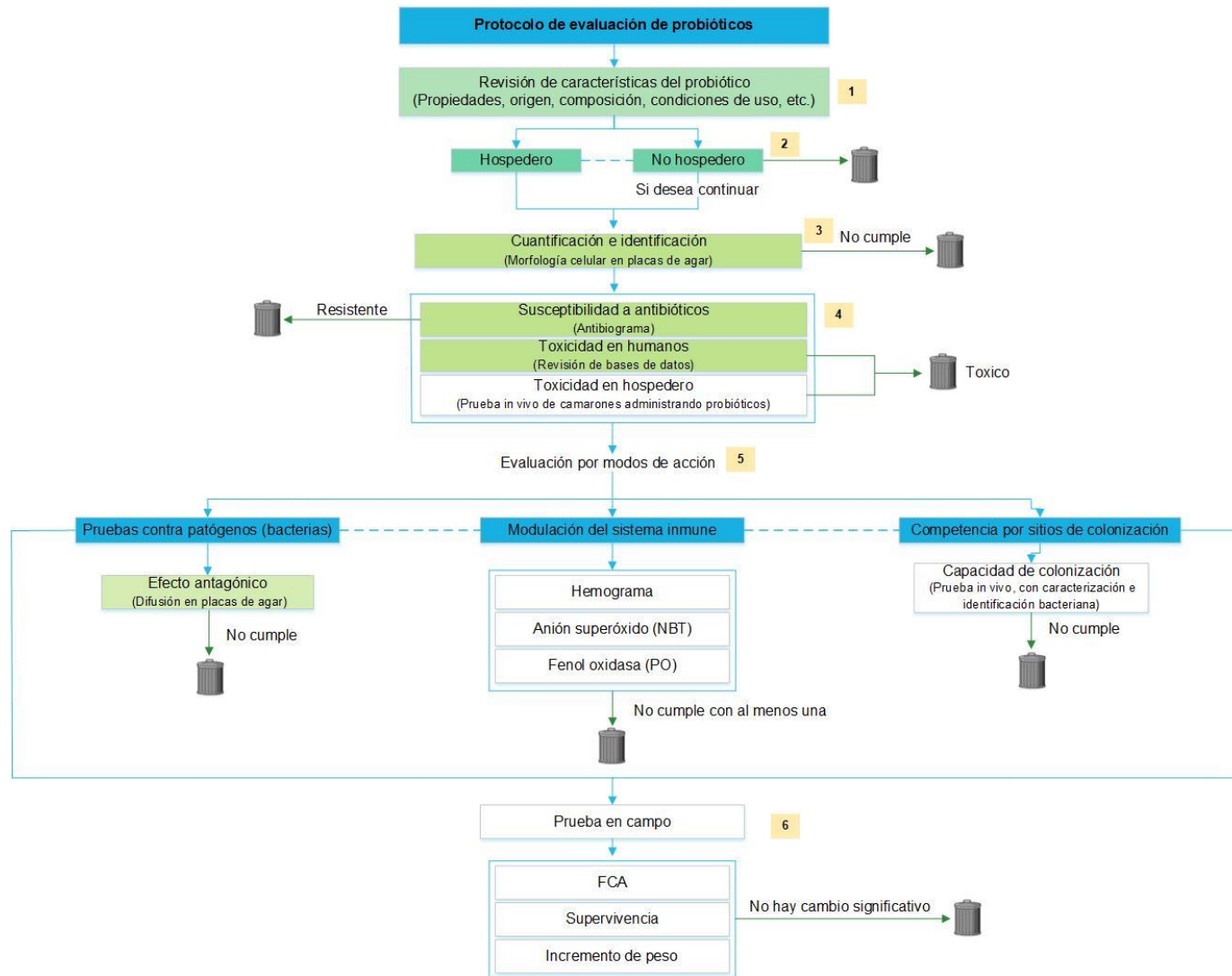
4) Evaluación de riesgos: Conformada por pruebas cuyo objetivo es asegurar la seguridad hacia el hospedero y a los humanos. Al igual que en las pruebas de evaluación de características generales, en cada recuadro de los mecanismos de validación se encuentra la metodología para corroborar el criterio.

5) Evaluación por modos de acción: Conformada por pruebas para evaluar la capacidad de los probióticos para fortalecer el sistema inmune del huésped, capacidad para combatir bacterias, y capacidad de competir por sitios de adhesión. Las pruebas solo deberán realizarse si el probiótico menciona que posee aquel mecanismo de acción. Al igual que en las pruebas de evaluación de características generales, en cada recuadro de los mecanismos de validación se encuentra la metodología para corroborar el criterio.

6) Evaluación en campo: Dado a que lo que funciona a nivel *in vitro* no necesariamente funciona a nivel de los sistemas de producción, luego de ser validados los puntos anteriores, el protocolo de evaluación de probióticos de calidad culminará con la evaluación de los probióticos en condiciones de cultivo de los sistemas de producción, bajo un diseño de pequeñas unidades experimentales.

Si el probiótico evaluado ha cumplido y funciona con cada una de las características especificadas en el diagrama, el probiótico comercial puede ser considerado de buena calidad.





**Figura 3.3** Protocolo general de evaluación de probióticos basado en criterios de calidad.

De manera general el protocolo contiene las siguientes consideraciones:

- Los probióticos se rechazan si los resultados no cumplen con los criterios de calidad (señalado con la figura de un cesto de desechos y una flecha verde).
- Las pruebas que se encuentran en casillas blancas requieren que se realicen pruebas *in vivo* con camarones a los que se les ha administrado el probiótico.
- Los camarones desafiados en la validación en campo pueden ser utilizados para la evaluación de los criterios de calidad de modulación del sistema inmune (ensayos inmunitarios), capacidad de colonización y toxicidad en el hospedero.
- Las líneas celestes discontinuas significan que el probiótico puede ser evaluado con más de un criterio de calidad.
- Se sugiere que, en todas las pruebas se utilice al menos 3 réplicas. Mientras que, para la validación en campo se sugiere utilizar al menos 4 réplicas.
- Las pruebas *in vivo* de administración de probióticos (toxicidad en hospedero), modulación del sistema inmune (ensayos inmunitarios), capacidad de colonización, y pruebas en campo, requerirán la incorporación de controles negativos (tratamientos sin probiótico) para poder comparar el efecto significativo de la administración del probiótico a ser evaluado.
- Las pruebas de modulación del sistema inmune (ensayos inmunitarios), capacidad de colonización, y pruebas en campo, requieren que los resultados sean analizados estadísticamente para determinar si hay un efecto significativo por el uso del probiótico. En el caso que solo existan dos tratamientos: con probiótico y sin probiótico (control), se sugiere que el mencionado análisis estadístico sea realizado mediante una prueba t de Student para la comparación de dos muestras independientes, con un nivel de significancia del 10% ( $\alpha = 0.1$ ), o uno menor, y una hipótesis de dos colas <https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/default2.aspx> (Figuras 3.4 y 3.5).

En las siguientes secciones se explica las metodologías de validación de los criterios de calidad seleccionados.

### T-Test Calculator for 2 Independent Means

Note: You can find further information about this calculator, [here](#).

Enter the values for your two treatment conditions into the text boxes below, either one score per line or as a comma delimited list. Select your significance level and whether your hypothesis is one or two-tailed. Then give your data a final check, and press the "Calculate T and P Values" button.

Treatment 1 (A)

78.9  
88.2  
67.9  
76.2

Treatment 2 (A)

45.6  
52.3  
61.2  
55.4

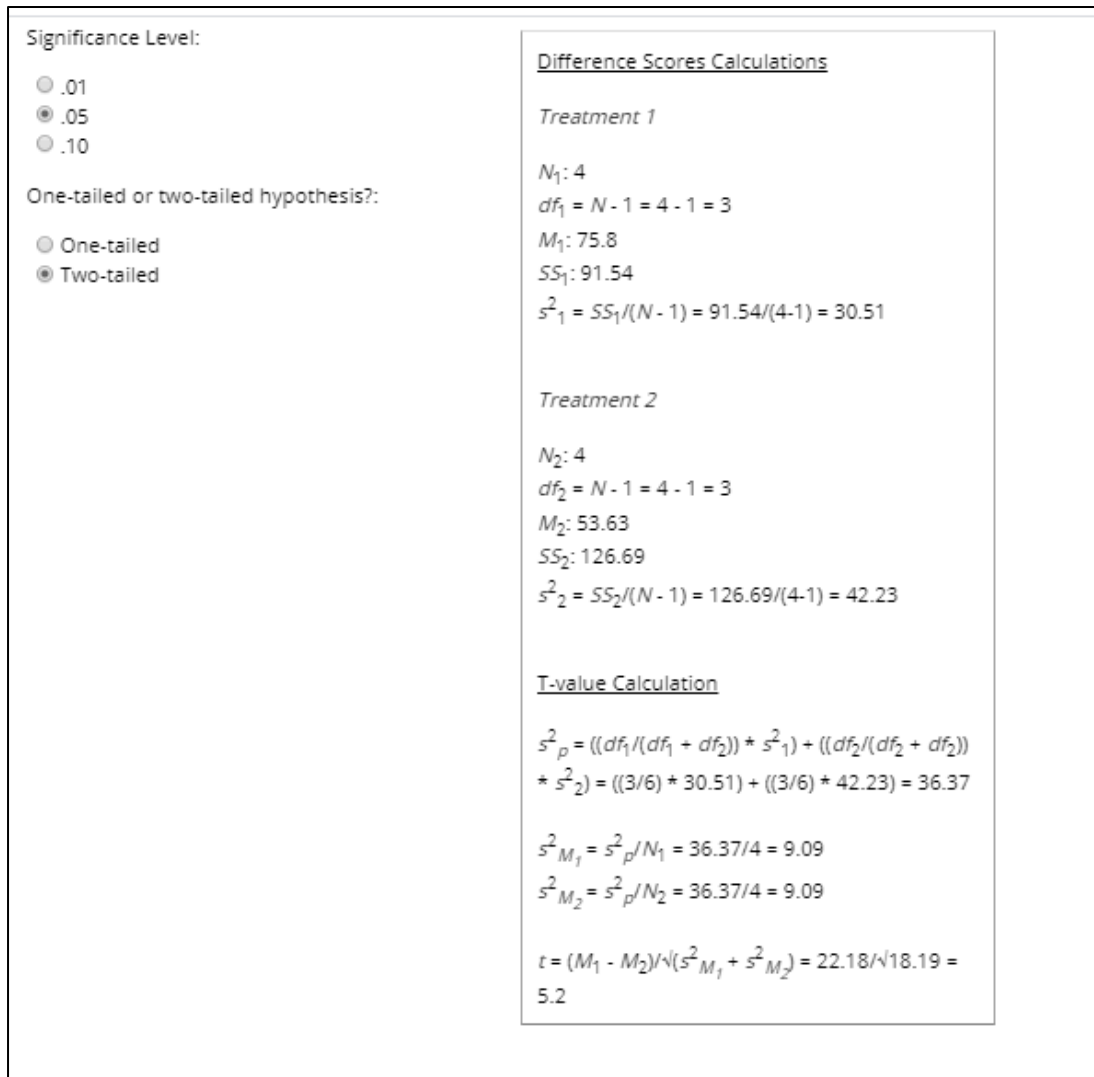
Significance Level:

.01  
 .05  
 .10

One-tailed or two-tailed hypothesis?:

One-tailed  
 Two-tailed

**Figura 3.4** Ejemplo hipotético mostrando el ingreso online de los resultados de supervivencia de camarón *P. vannamei*, luego de una validación en campo usando 8 unidades experimentales pequeñas. Se incluyó dos tratamientos: Treatment 1 (resultados del tratamiento con probióticos, usando 4 réplicas) y Treatment 2 (resultados del tratamiento sin probióticos, usando 4 réplicas). En el ejemplo, la calculadora online realizó una prueba t de Student para la comparación de dos muestras independientes, con un nivel de significancia del 10% ( $\alpha = 0.1$ ) y una hipótesis de dos colas. Link: <https://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/default2.aspx>.



**Figura 3.5** Resultados del ejemplo hipotético mostrado en la Figura 3.4, donde el resultado “The t-value is 5.19995. The p-value is .002015. The result is significant at  $p < .05$ .” debe ser interpretado como que hubo un efecto significativo por la aplicación del probiótico.

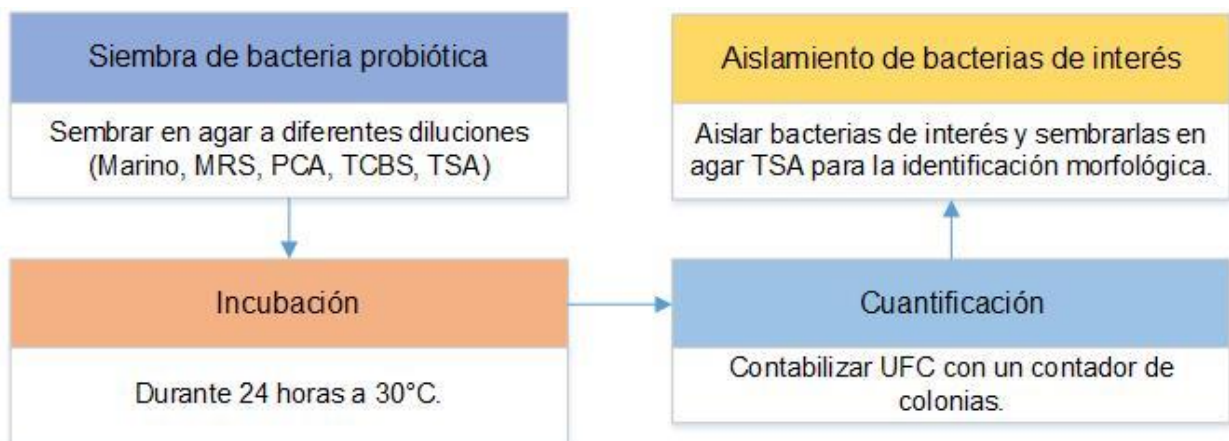
### 3.3.1 Pruebas para evaluar características generales.

#### 3.3.1.1 Cuantificación e identificación.

La identificación morfológica de las bacterias se deberá realizar de acuerdo con lo descrito en el Manual de microbiología de Norrell & Messley [102]. La identificación morfológica se basará en la forma, color, márgenes y elevación de las colonias bacterianas. Posteriormente se realizará la cuantificación de cada grupo en referencia a la metodología utilizada en CENAIM [103]. Para más información sobre los métodos de evaluación, revisar los documentos anteriormente mencionados.

Si en el promedio de las réplicas, el probiótico no cumple con la cuantificación cuantitativa y cualitativa, deberá ser descartado.

En la figura 3.6 se muestra un diagrama detallando el procedimiento para la prueba mencionada.

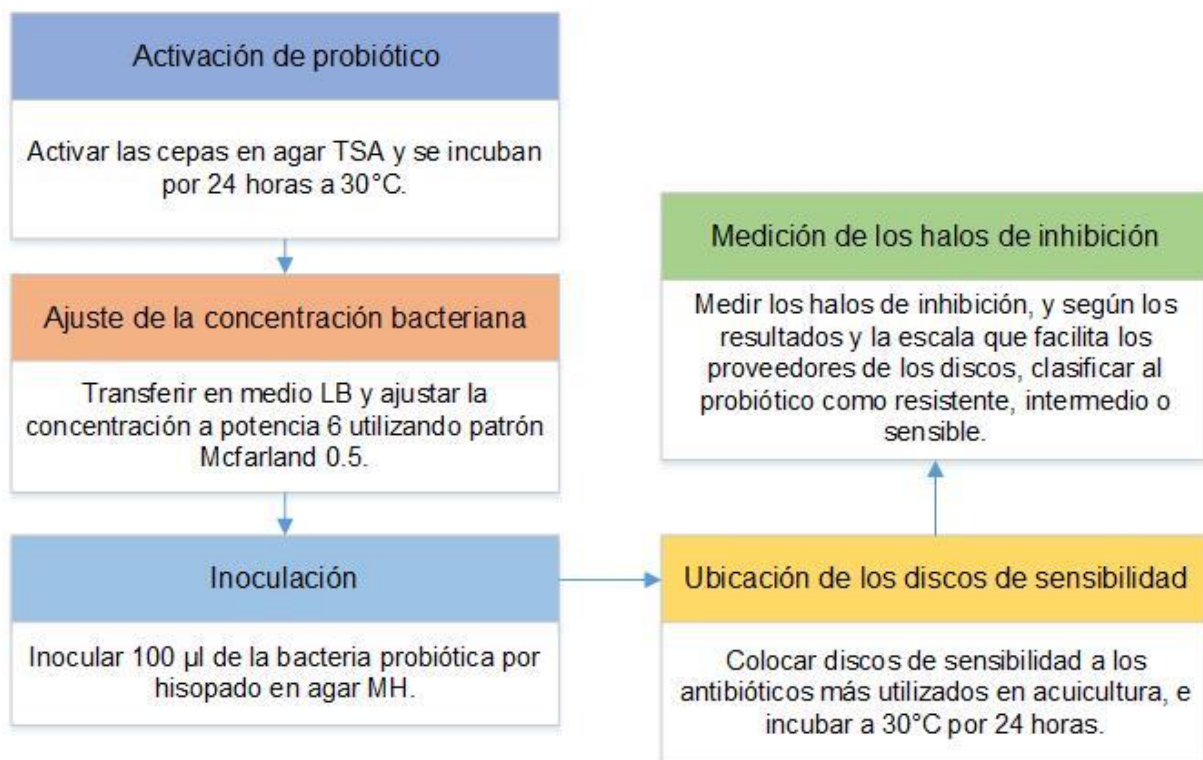


**Figura 3.6** Esquema de pruebas de cuantificación e identificación bacteriana.

### 3.3.2 Pruebas para evaluar riesgos.

#### 3.3.2.1 Susceptibilidad a antibióticos.

Se sugiere que la evaluación de susceptibilidad a antibióticos se realice por lo menos con los antibióticos autorizados en acuicultura (oxitetraciclina y florfenicol) [18]. Para el ensayo se propone la metodología descrita por CENAIM [103] detallada en la figura 3.7. Si el promedio de los halos de inhibición es clasificado como resistente para alguno de los antibióticos evaluados, el probiótico puede ser descartado.



**Figura 3.7** Esquema de pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

### **3.3.2.2 Toxicidad en humanos.**

Para evitar un probable riesgo a la salud de los humanos, los probióticos comerciales pueden ser descartados en caso de contar con especies bacterianas listadas como riesgosas para los humanos. A continuación, se encuentran enlaces de la Organización Mundial de la Salud donde se podrá investigar el mencionado riesgo.

- Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales - <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Acha-Zoonosis-Spa.pdf> (Sección 1).
- Fichas informativas sobre agentes microbiológicos - [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_11.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_11.pdf) (Sección 11.1).

### **3.3.2.3 Toxicidad en hospedero.**

El efecto de toxicidad en el hospedero puede ser evaluado a partir de la supervivencia de los camarones a los cuales se les ha administrado el probiótico comercial, por medio de las pruebas en campo. Ver sección 3.3.4.

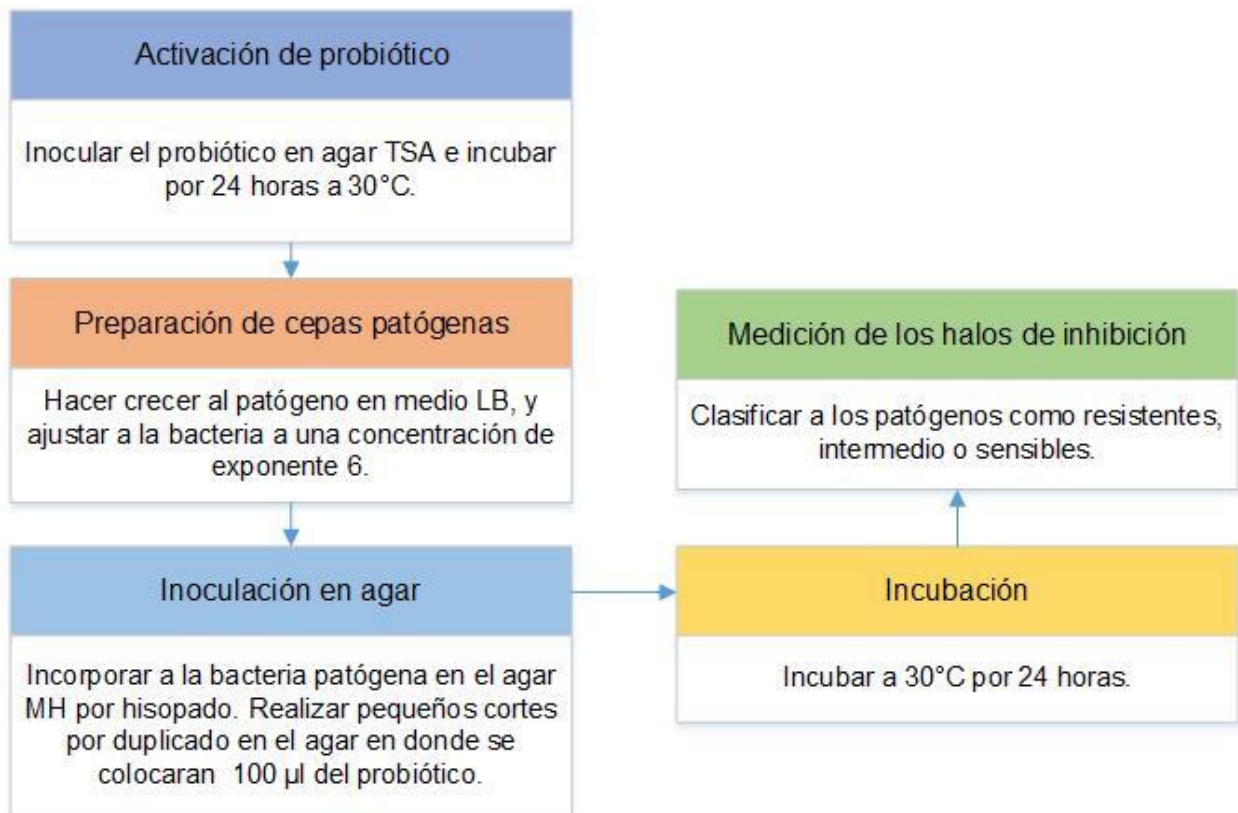
### 3.3.3 Pruebas para evaluar modos de acción.

#### 3.3.3.1 Pruebas contra patógenos.

Para evaluar el efecto bactericida o bacteriostático del probiótico frente a las bacterias patógenas en acuicultura, se utilizará la metodología de difusión en agar [104] (figura 3.8).

Los resultados de la prueba son observados mediante halos de inhibición medidos en mm, los mismos que se categorizaron en sensible (halo  $\geq 8$  mm), resistente ( $\leq 5$  mm), e intermedio (halo entre 5 y  $\leq 8$  mm) [103].

En caso de que el promedio de los halos de inhibición se encuentre en la categoría de resistente, el probiótico puede ser descartado. Se recomienda que la prueba sea realizada con los *Vibrios* patógenos que estén afectando al sistema de cultivo.



**Figura 3.8** Esquema de prueba de antagonismo.

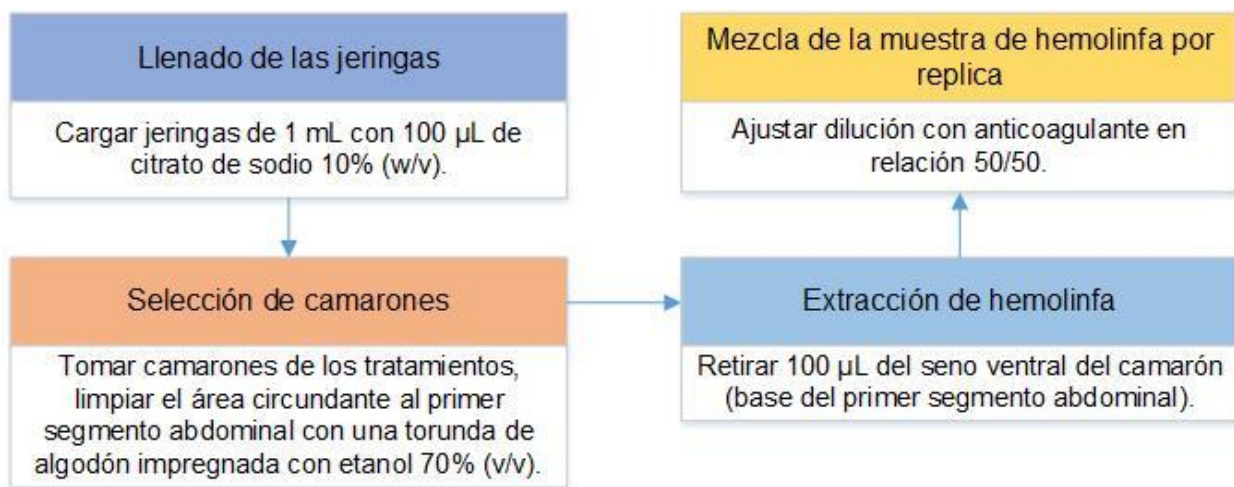


### 3.3.3.2 Modulación del sistema inmune.

Previo a realizar las pruebas inmunitarias se deberá extraer la hemolinfa de los camarones desafiados en las pruebas de validación en campo (figura 3.5). Tanto del control como del tratamiento con probiótico, se seleccionarán al menos 5 camarones con tres réplicas.

Dada la variabilidad de la proporción de los hemocitos durante los estadios de muda del camarón, se sugiere que los camarones que sean utilizados para los mencionados ensayos tengan la parte superior del primer segmento abdominal dura (intermuda). En vista que la obtención de hemolinfa es complicada en larvas de camarón, las pruebas inmunitarias mostradas en el protocolo quedan reservadas para camarones adultos o juveniles. Preferentemente, si se van a llevar a cabo estas pruebas es mejor utilizar camarones con un peso igual o superior a los 7 g, dado a que se les podrá extraer con facilidad 100  $\mu$ L de hemolinfa. En la figura 3.9 se especifica el procedimiento para la extracción de hemolinfa.

Para más información sobre el protocolo de extracción de hemolinfa, revisar la metodología descrita en Domínguez-Borbor [105]. En caso de que no exista un incremento significativo en alguna de las pruebas inmunológicas, el producto puede ser descartado.



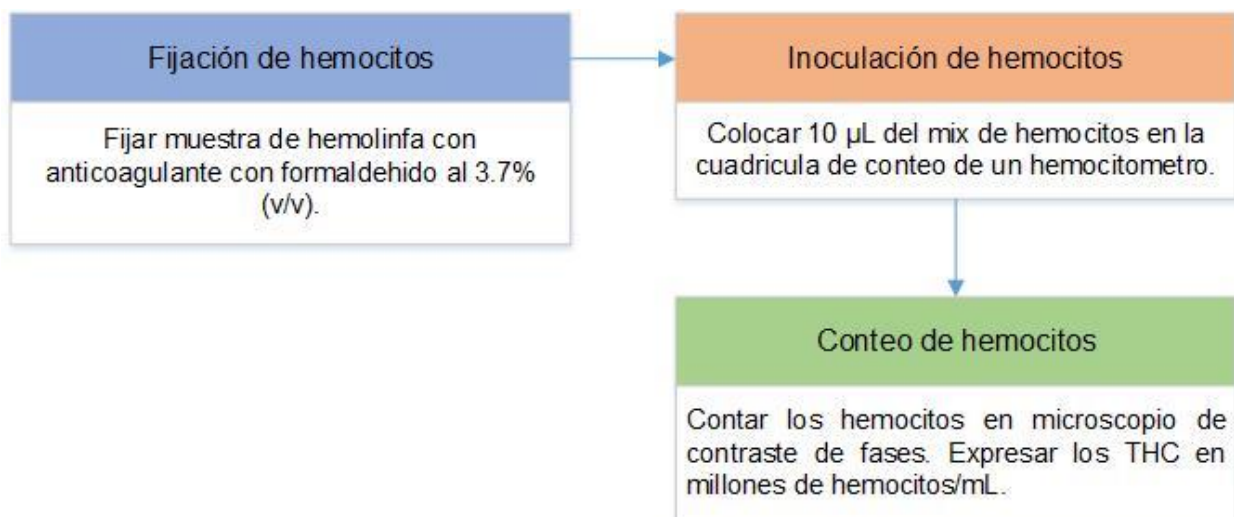
**Figura 3.9** Esquema de extracción de hemolinfa.

En el caso particular de las pruebas de anión superóxido y actividad fenoloxidasa, se recomienda que las muestras sean procesadas apenas se realiza la extracción de hemolinfa, para evitar que las muestras se dañen y se tengan resultados erróneos.

Las metodologías para las pruebas se describen a continuación:

### a. Hemograma

La cuantificación total de hemocitos (THC) y diferencial (granulosos, semigranulosos e hialinos) se realizará a través de conteos en hemocitómetro de acuerdo con lo descrito en Domínguez-Borbor [105] (Figura 3.10). THC más alto en comparación al control, y una mayor proporción de hemocitos granulosos, se consideran indicativos de una mayor capacidad de eliminar patógenos [90].



**Figura 3.10** Esquema de conteo total de hemocitos.

## b. Producción de anión superóxido

La concentración de anión superóxido se deberá realizar de acuerdo con la técnica de reducción del NBT (figura 3.11) según lo descrito en Muñoz [91].

De acuerdo con Gullian [90], tasas de anión superóxido inferiores a 1 se consideran como falta de actividad, de 1 a 1.5 como actividad baja, mientras valores superiores a 1.5 como buena actividad.

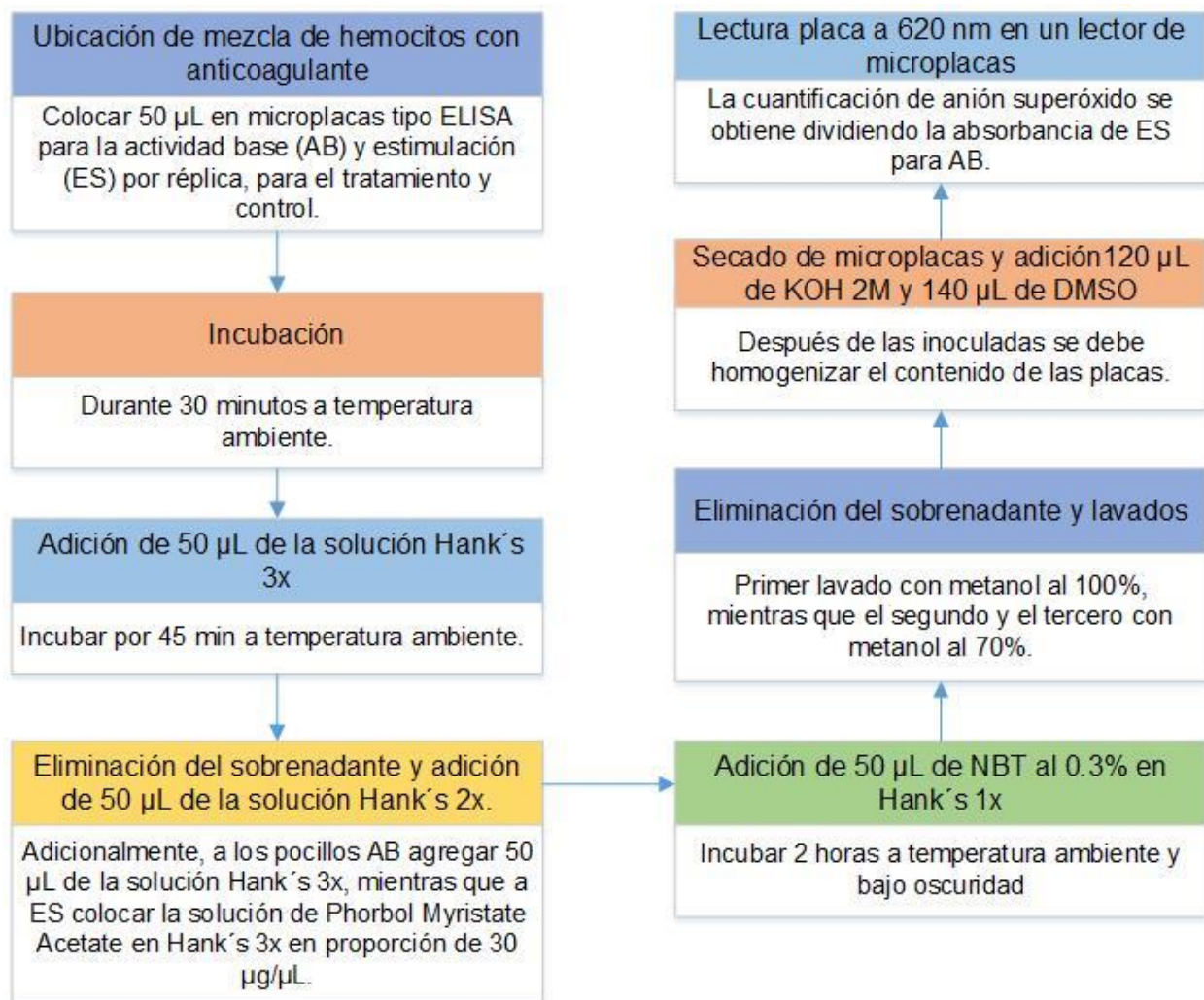
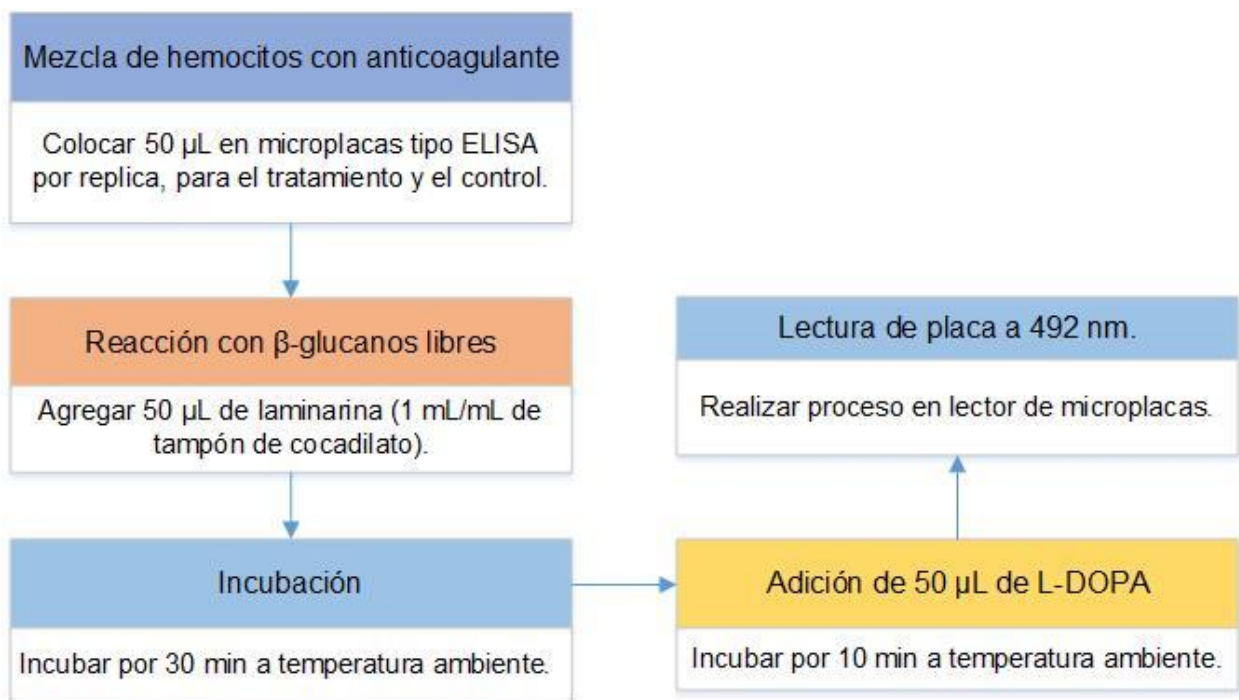


Figura 3.11 Diagrama de prueba de anión superóxido (NBT)

### c. Cuantificación de actividad fenoloxidasa

La cuantificación del PO se deberá realizar a través de la formación de DOPA resultante de la oxidación del L-DOPA, según lo descrito en Hernández [106] (figura 3.12).

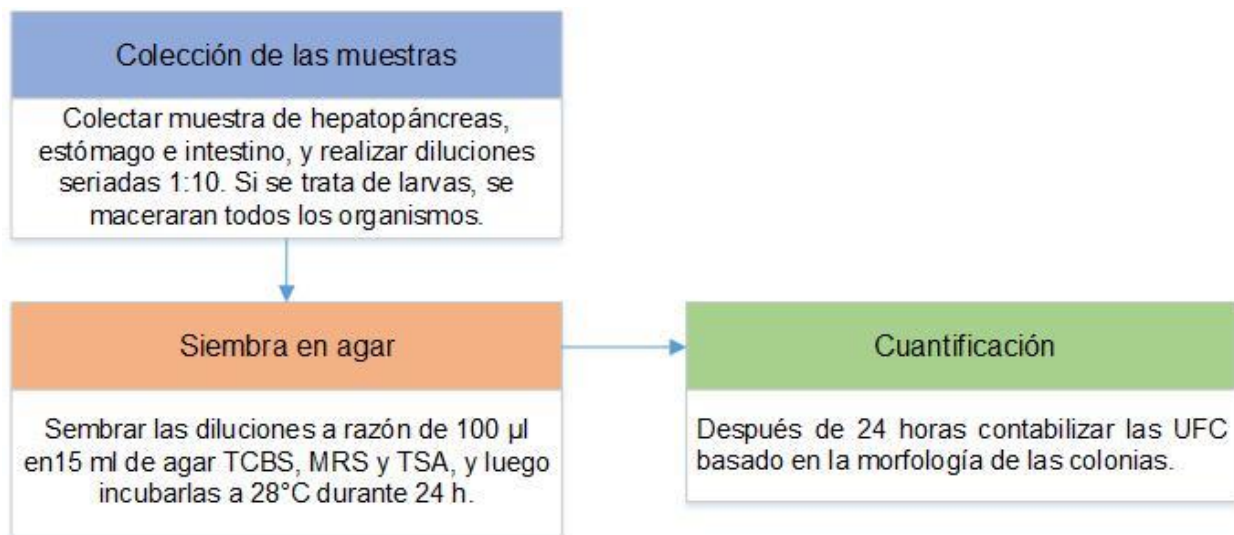
De acuerdo con Gullian [90], en ensayos de actividad fenoloxidasa con valores inferiores a 0.2 se consideran bajos, de 0.2 a 0.35 como normales, mientras que valores superiores a 0.35 son altos.



**Figura 3.12** Esquema de prueba de actividad fenoloxidasa.

### 3.3.3.3 Competencia por sitios de colonización.

Para determinar la capacidad de colonización del probiótico, se utilizará a los camarones desafiados en las pruebas de validación en campo (sección 3.1.3), para posteriormente evaluar el porcentaje de colonización del probiótico en función de la metodología de identificación y cuantificación bacteriana [107] (Figura 3.13).



**Figura 3.13** Diagrama de prueba de colonización.

Tanto del control como del tratamiento con probiótico, se seleccionarán los animales de tres réplicas para el análisis. En el caso de camarones adultos y juveniles, como mínimo se seleccionarán a tres camarones por réplica para realizar los pools de los órganos para el análisis.

En caso de que no existan diferencias significativas con respecto al control, se sugiere descartar el probiótico.

### 3.3.4 Evaluación en campo.

Para realizar la validación de los probióticos bajo las condiciones de cultivo de los laboratorios de larvas y camarónicas, se propone que los organismos sean desafiados en sistemas a baja escala.

Al final del experimento, se evalúa la eficacia de los probióticos sobre la supervivencia, factor de conversión alimenticio (FCA), e incremento de peso. Para determinar los factores mencionados se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número inicial de animales}}{\text{Número final de animales}} \times 100$$

$$\text{FCA} = \frac{\text{Alimento suministrado (g)}}{\text{Peso ganado (g)}}$$

$$\text{Incremento de peso} = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}$$

Dado a que la prueba se ajusta a las condiciones de cultivo del sistema de producción, el protocolo de alimentación, el tipo de agua para los recambios, y tiempos de recambio de agua, se ajustarán a los protocolos establecidos por el encargado de la producción. Mientras que el modo y cantidad de aplicación de los probióticos dependerán de las indicaciones del producto comercial.

La prueba a su vez servirá para evaluar algún efecto tóxico del producto por medio de la supervivencia, y en caso de que el probiótico tenga la capacidad de mejorar la digestión, evaluar de forma indirecta la producción de compuestos benéficos por medio del FCA y el incremento de peso.

En caso de que el probiótico contemple en su ficha técnica alguno de los factores mencionados en esta prueba, y que, a su vez, el factor no se haya incrementado de forma significativa durante la validación en campo, el probiótico debe ser descartado.

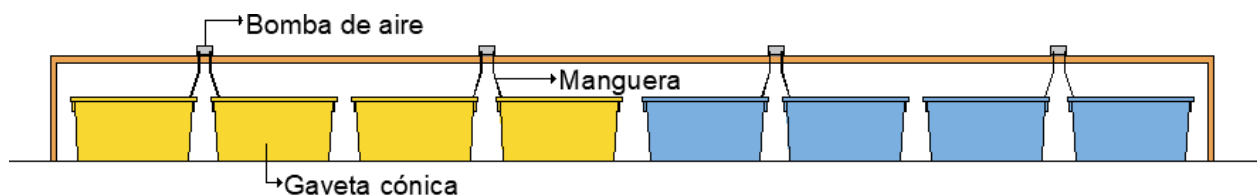


### 3.3.4.1 Diseño del desafío para camaronas.

El ensayo se deberá realizar bajo un esquema similar al mencionado en Doron & Snyderman [108]. Se propone que la validación se realice en gavetas cónicas de 50 L, las cuales deberán llenarse con agua al 80% de su capacidad. El sistema cuenta con 8 unidades experimentales (4 del grupo tratamiento y 4 del grupo control). Los camarones se sembrarán a una densidad de 12 organismos por cada unidad experimental. Cada gaveta deberá contar con aireación constante, suministrada por un aireador de dos salidas de 127 V. Cada bomba de aire suministrará aireación a dos gavetas. Adicionalmente, para evitar que los camarones durante el desafío escapen, cada replica deberá tener una tapa, la cual puede ser elaborada con malla de comederos y tiras de madera como soporte (Figura 3.14)

El desafío tendrá una duración de 10 días, con previa aclimatación de 7 días. En caso de que se vaya a realizar una evaluación enzimática, y que menos de tres camarones se encuentren en intermuda al décimo día (por réplica), el ensayo puede extenderse hasta cumplir con aquella condición.

El diseño del desafío también puede ser utilizado para valorar probióticos en reproductores.



**Figura 3.14** Vista frontal del diseño del desafío en camarones.

#### **3.3.4.2 Diseño del desafío en laboratorio de larvas.**

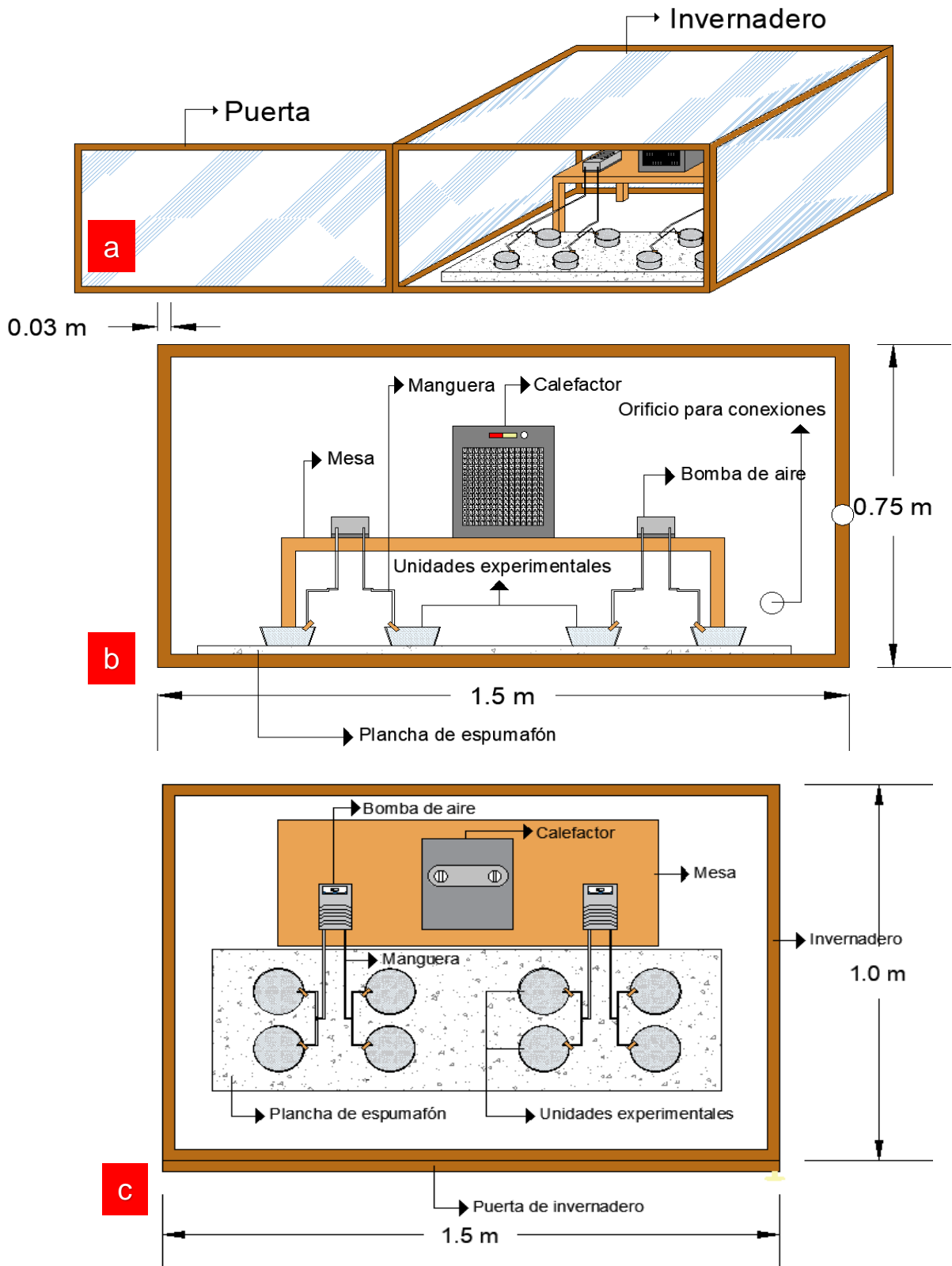
La prueba se deberá realizar bajo un esquema similar al mencionado en Sotomayor [18], pero en un invernadero artesanal a baja escala para mantener la temperatura (figura 3.10). El invernadero deberá tener la base hueca, con el fin de poder colocarlo con facilidad encima del sistema de validación, una vez que el mismo ya se encuentre montado. Adicionalmente se propone que las paredes sean de plástico de invernadero con un orificio que permita el paso de los cables de los equipos, y que la estructura tenga como sostén tiras de madera. Se plantean medidas de 1.5 m de ancho, 1.0 m de largo, y 0.75 m de alto.

Para la validación de probiótico se propone que los organismos sean desafiados por periodos 96 horas, con una aclimatación previa de 6 horas.

El sistema cuenta con 8 vasos (réplicas) de 500 mL para 4 tratamientos y 4 grupos controles, mismos que estarán fijos en una plancha de espumafón con orificios del tamaño de los recipientes. Cada réplica contará con 30 larvas en un volumen de 300 mL. Las unidades experimentales recibirán aireación constante a través de 2 bombas de aire de 2 salidas de 127 V. Cada salida de las bombas de aire deberá tener una unión T, para suministrar de aireación a 2 unidades experimentales (figura 3.15)

La temperatura del agua se mantendrá constante por medio de un calefactor de 1500 W (con ayuda del invernadero), cuya potencia deberá ser ajustada de acuerdo con la temperatura en que trabaje el laboratorio. Como recomendación, los equipos eléctricos deberán ubicarse por encima de las unidades experimentales, de manera similar a lo mostrado en la figura 3.15.





**Figura 3.15** Diseño de sistema de desafío en laboratorios de larvas. a.-Esquema de invernadero a baja escala, b.-Vista frontal sin plástico de invernadero, c.-Vista en planta del diseño sin plástico de invernadero.

### 3.4 Análisis de costos.

La validación de un probiótico a través de todas las pruebas del protocolo tendría un coste aproximado de \$696.50 para las camarónicas, y de \$485.27 para los laboratorios de larvas (tabla 3.5). La estructura de costos para ambos sistemas de producción, se encuentra dividido en pruebas *in vitro* y validación en campo.

**Tabla 3.5** Análisis de costos aproximado de la validación de las pruebas del protocolo.

Pruebas	Costos (\$)	
	Camaroneras	Laboratorio de larvas
<i>In vitro</i>	504.00	339.00
Validación en campo	192.50	146.27
Total (\$)	696.50	485.27

Para los costos de las pruebas *in vitro* (Tabla 3.6) se tomó en consideración los precios de las pruebas realizadas por el Laboratorio 1 (sección 3.2.4) debido a que sus laboratorios ofrecen en su totalidad los servicios requeridos para validar probióticos. Para más información sobre los servicios ofrecidos por el Laboratorio 1, contactarse con los autores.

En total, las validaciones *in vitro* tendrían un costo de \$504.00 para camarónicas, y \$339.00 para los laboratorios de larvas. Para todas las pruebas se consideró el número de muestras sugeridas en la sección 3.3, sin embargo, es importante aclarar que el análisis de costos de cuantificación e identificación bacteriana se realizó en base al uso de un solo tipo de agar. En caso de que el probiótico requiera para la identificación más de un tipo de agar, los costos subirían. Los precios del análisis de una muestra para cuantificación e identificación bacteriana varían desde los \$20 hasta los \$37, en dependencia al tipo de agar que se requiera usar, sin embargo, los costos unitarios disminuyen a medida que se incrementan las muestras.

**Tabla 3.6** Análisis de costos aproximado de pruebas *in vitro*.

Prueba <i>in vitro</i>	Costo (\$)	
	Camaroneras	Laboratorios de larvas
Cuantificación e identificación bacteriana	66.00	66.00
Antibiograma (2 antibióticos)	72.00	72.00
Hemograma	33.00	0.00
Anión superóxido	87.00	0.00
Fenoloxidasa	45.00	0.00
Efecto antagónico de probiótico (difusión en agar)	81.00	81.00
Colonización (Cuantificación e identificación bacteriana)	120.00	120.00
<b>Total (\$)</b>	<b>504.00</b>	<b>339.00</b>

Los costos de la implementación del sistema de validación en campo fueron de \$192.50 para las camaroneras (Tabla 3.7) y \$146.27 para los laboratorios de larvas (Tabla 3.8). Sin embargo, si se toma en consideración que todas las camaroneras tienen gavetas cónicas, los costos de la implementación podrían reducirse a \$64.50. Los costos de la implementación en campo no incluyen la mano de obra para la construcción, compra de los animales o insumos requeridos para su producción.

**Tabla 3.7** Costos aproximados de implementación de sistema de validación en campo para camaroneras.

Materiales y equipos	Unidades necesarias	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
Gavetas cónicas	8	16.00	128.00
Bombas de aire de 2 salida de 120 V	4	10.00	40.00
Piedras difusoras	8	1.00	8.00
Manguera para acuario (m)	4	1.50	6.00
Malla de comedero (m2)	3	2.00	6.00
Tira de madera con 3 cm de grosor (m)	9	0.50	4.50
<b>Total (\$)</b>			<b>192.50</b>

**Tabla 3.8** Costos aproximados de implementación del sistema de validación en campo para laboratorios de larvas.

<b>Materiales y equipos</b>	<b>Unidades necesarias</b>	<b>Costo unitario (\$)</b>	<b>Costo total (\$)</b>
Calefactor de 1500 W	1	28.00	28.00
Bombas de aire de 2 salidas de 127 V	2	10.00	20.00
Vasos cervecedores de 500 ml	8	0.15	1.20
Uniones T para manguera de acuario	4	2.00	8.00
Pinzas de ropa	8	0.04	0.32
Plancha de espumafón de 1.25 m de largo y 0.4 m de ancho	1	13.00	13.00
Mesa de madera de 1 m de largo y 0.3 m de alto	1	30.00	30.00
Regleta	1	5.00	5.00
Termómetro de mercurio	1	16.00	16.00
Manguera de acuario (m)	2.5	1.50	3.75
Tira de madera con 3 cm de grosor (m)	18	0.50	9.00
Plástico de invernadero (m2)	4	3.00	12.00
<b>Total (\$)</b>			<b>146.27</b>

Cabe recalcar que la validación tendría costos diferentes de acuerdo con el producto, debido a que no todos los probióticos contienen todos los mecanismos de acción específicos, y por el hecho de que si un producto no cumple con alguna propiedad es descartado, lo que conlleva a que no se le realicen las pruebas restantes.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Se logró diseñar un protocolo para la validación de probióticos basado en criterios de calidad, el cual suplirá la necesidad del sector camaronero de contar con una guía para evaluar por ellos mismos la efectividad de los probióticos que utilizan. Para elaborar el protocolo, como primer paso se investigó los criterios que deben cumplir los probióticos de calidad, y al complementar la información de la literatura científica con las necesidades y capacidades locales, se seleccionaron las pruebas más adecuadas para validar los productos de acuerdo con las necesidades de la camaronicultura ecuatoriana. El protocolo se constituyó de 6 partes, la primera, en la que se debe revisar las características del producto para que las valoraciones se realicen de forma adecuada, la segunda, en la que se enfatiza que se deben seleccionar probióticos con bacterias autóctonas al hospedero, la tercera, en la que se evalúan las características generales de los probióticos, la cuarta, en donde se evalúan los posibles riesgos, la quinta, en donde evalúan los mecanismos de acción específicos, y la sexta en donde se evalúa la calidad bajo las condiciones de cultivo propias del sistema de producción.

El costo aproximado para la validación de un probiótico, con todos los mecanismos de acción descritos en el protocolo fue de \$696.50 y \$485.27 para las camaroneras y laboratorios de larvas, respectivamente. Aunque solo el 22% de los encuestados estaría interesado en invertir más de \$200 en la valoración de calidad de un probiótico, la implementación del protocolo resulta necesaria si se quiere encontrar un producto que realmente mejore la producción, y que no amenace la estabilidad del sistema, y la salud de los camarones y humanos. La producción de camarón ecuatoriano ha ido en incremento año tras año, y cada vez se buscan más nuevas tecnologías o productos que permitan mantener buenas condiciones de cultivo, por lo que, a opinión de los autores el protocolo irá ganando relevancia con los años.

El criterio de selección de facilidades de ejecución jugó un rol significativo al momento de descartar pruebas que no son realizadas como servicios de análisis en el país, por lo que importantes mecanismos de acción como la producción de compuestos benéficos para la digestión, y la disrupción de *quorum sensing*, no fueron consideradas para el

protocolo. Sin embargo, su efecto en el protocolo puede ser evaluado indirectamente en las validaciones en campo mediante el incremento de peso y disminución del FCA, para las pruebas de producción de compuestos benéficos, y en el caso de la disrupción del QS por medio del incremento de la supervivencia. A futuro, si se llegan a ofertar servicios relacionados al análisis de las pruebas anteriormente mencionadas, sería de gran utilidad poder evaluarlas, dado a que son mecanismos de acción fundamentales en los probióticos.

Aunque la efectividad de los probióticos ha sido cuestionada, esencialmente por un uso empírico, y por productos con baja o nula eficiencia (en cierta medida por el uso de bacterias alóctonas), el protocolo constituye una importante herramienta para validar productos que bien usados y seleccionados tienen gran potencial para el control de enfermedades en el sector camaronero. Sin embargo, es importante recalcar que, aunque los probióticos son excelentes productos, por sí solos no son la solución definitiva. En este contexto, la combinación de probióticos con prebióticos, con disruptores del QS, o con sustancias inmunoestimulantes, podría potenciar los beneficios para la producción.

## **4.2 Recomendaciones**

Los probióticos constituyen una de las soluciones más prometedoras para el control de enfermedades en acuicultura, sin embargo, se requiere de evidencia científica para la selección de los probióticos adecuados en un sistema de cultivo, a través de pruebas en laboratorio, o evaluaciones en campo que verifiquen los mecanismos de acción para los cuales son utilizados.

En el presente trabajo se presentó la solución más viable a este problema, por lo que es importante que, si se desea validar un probiótico comercial, se sigan los procesos presentados en este estudio.

A continuación, se incluyen una serie de recomendaciones adicionales:

- En caso de que a futuro se quiera mejorar el protocolo, se sugiere que se realicen encuestas o entrevistas a los vendedores de probióticos para obtener información acerca de cómo evalúan a los productos que venden, así mismo se puede incrementar el número de productores encuestados para consolidar los datos

sobre sus necesidades, y valorar si se pueden adicionar o modificar las pruebas de evaluación de calidad.

- Si un probiótico requiere condiciones muy específicas para poder tener un efecto en la producción y estas no se ajustan a las condiciones de cultivo, no vale la pena evaluarlo y utilizarlo.
- De manera adicional a la validación en campo en pequeñas unidades experimentales, los productores pueden llevar a cabo una evaluación de los productos por medio de un diseño en bloques completamente aleatorizado. Para ello, los sistemas de producción deberán tener dimensiones muy similares, animales de una edad, y protocolos de manejo iguales. Para que la evaluación tenga mayor significancia, se recomienda realizar la experimentación con al menos 4 réplicas con tratamiento. En caso de que el productor no cuente con suficientes unidades de producción, podría optar por realizar las pruebas en conjunto con camaroneras o laboratorios vecinos (según sea el caso), sin embargo, se requerirá estandarizar los aspectos ya mencionados para la prueba.
- En caso de que el protocolo propuesto no se encuentre dentro del presupuesto estipulado para la validación de probióticos, se anexan dos protocolos que involucran pruebas de campo y laboratorio. La figura 4.1 se basa en pruebas que son aplicadas en el campo (FCA, supervivencia y crecimiento) y pruebas de laboratorio generales y específicas, como la prueba de colonización. El protocolo fue desarrollado en base a pruebas que son realizadas por algunos de los productores encuestados, y pruebas que investigadores y técnicos siguieron como fundamentales al momento de evaluar probióticos. El protocolo descrito en la figura 4.2 se basa únicamente en pruebas en campo, por lo que sus resultados no serán de la misma validez que el protocolo descrito en este estudio y el de la figura 4.1. Sin embargo, al estar planteada la validación bajo un sistema con

réplicas, los resultados serían más significativos, en comparación a una evaluación en solo una unidad de producción.

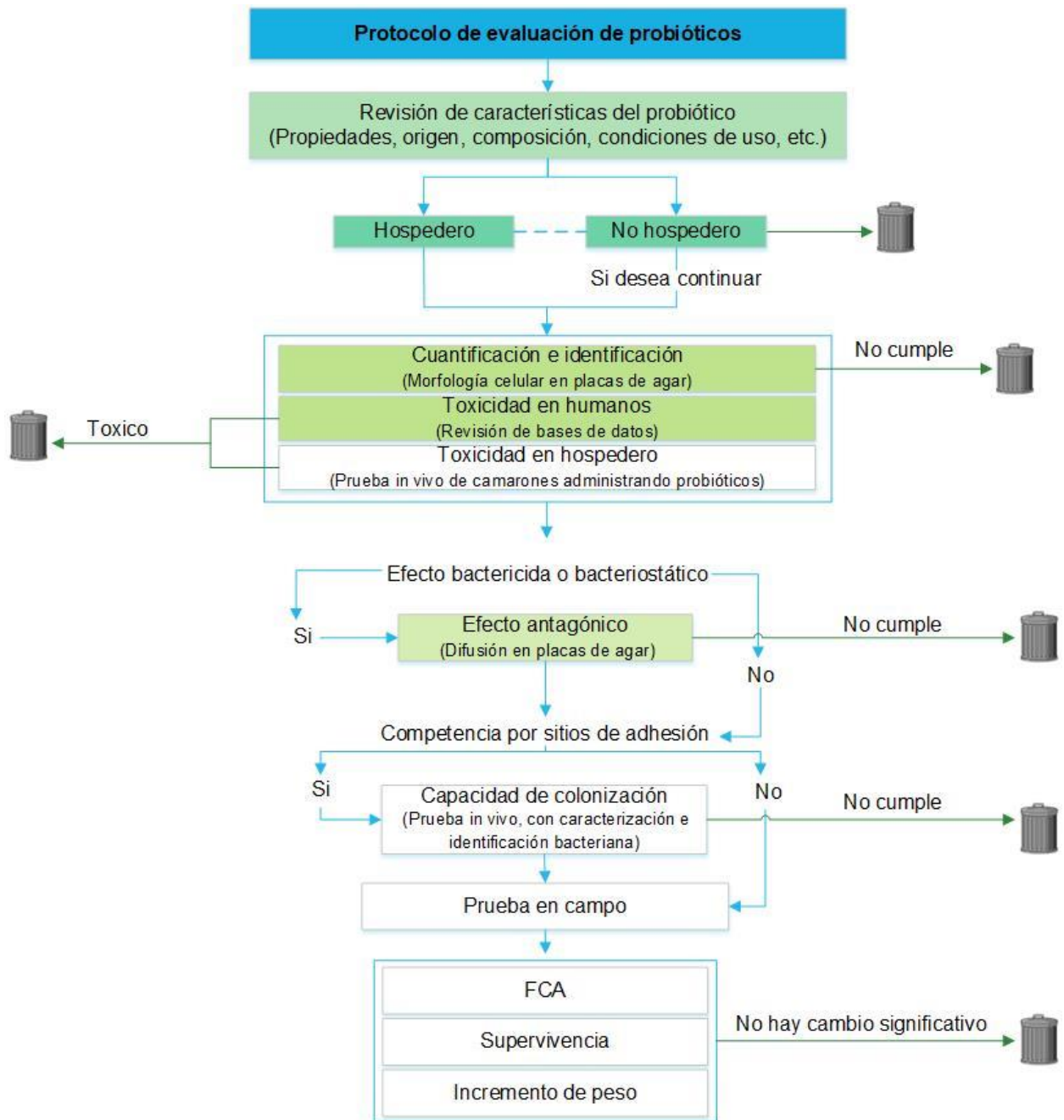
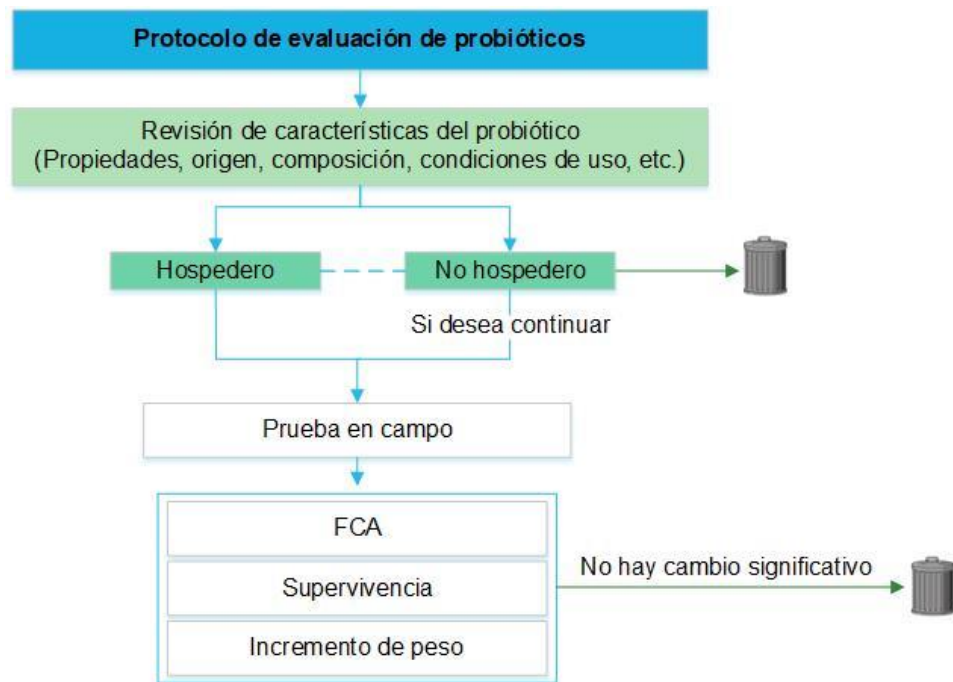


Figura 4.1 Protocolo 2 sugerido para la validación de probióticos.





**Figura 4.2** Protocolo 3 sugerido que involucran pruebas de validación en campo.

El presente trabajo estuvo enmarcado en el proyecto “Biotecnología azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando Vibrios patógenos”, auspiciado por el Programa INEDITA de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] FAO, "The State of World Fisheries and Aquaculture," 2018.
- [2] J. L. Anderson, D. Valderrama, and D. Jory, "Shrimp Aquaculture Production by World Region : 2000-2017 ( FAO Data )," *Glob. Aquac. Alliance*, p. 54, 2017.
- [3] A. Chauhan and R. Singh, "Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach," *Symbiosis*, vol. 77, no. 2, pp. 99–113, 2019.
- [4] M. K. Sahu, N. S. Swarnakumar, K. Sivakumar, T. Thangaradjou, and L. Kannan, "Probiotics in aquaculture: Importance and future perspectives," *Indian J. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 299–308, 2008.
- [5] M. J. Zorriehzahra and R. Banaederakhshan, "Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry," *Adv. Anim. Vet. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 64–72, 2015.
- [6] F. C. Cabello, "Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment," *Environ. Microbiol.*, vol. 8, no. 7, pp. 1137–1144, 2006.
- [7] K. Thornber, D. Verner-Jeffreys, S. Hinchliffe, M. M. Rahman, D. Bass, and C. R. Tyler, "Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry," *Rev. Aquac.*, pp. 1–21, 2019.
- [8] S. H. Hoseinifar, Y. Z. Sun, A. Wang, and Z. Zhou, "Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. OCT, 2018.
- [9] R. Cedeño, "Probióticos y su aplicación en el cultivo de camarón en la zona norte de la provincia de Manabí." San Pedro de Manglaralto, 2007.
- [10] S. Raja, E. Nandhini, K. Sahana, and B. Dhanakkodi, "Beneficial and destructive effects of probiotics in aquaculture systems-A review," *Int. J. Fish. Aquat. Stud. IJFAS*, vol. 2, no. 3, pp. 153–159, 2015.
- [11] F. do N. Vieira *et al.*, "In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture," *Pesqui. Agropecu. Bras.*, vol. 48, no. 8, pp. 998–1004, 2013.
- [12] S. Fernandes and S. Kerkar, *Bacterial probiotics over antibiotics*. Elsevier Inc., 2019.
- [13] L. Verschuere, G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete, "Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 4, pp. 655–671, 2000.
- [14] A. Newaj-Fyzul and B. Austin, "Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases," *J. Fish Dis.*, vol. 38, no. 11, pp. 937–955, 2015.
- [15] N. Aich, N. Ahmed, and A. Paul, "Issues of Antibiotic Resistance in Aquaculture Industry and Its Way Forward," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 08, pp. 26–41, 2018.
- [16] L. Santos and F. Ramos, "Antimicrobial resistance in aquaculture: Current

- knowledge and alternatives to tackle the problem,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 52, no. 2, pp. 135–143, 2018.
- [17] H. Chen *et al.*, “Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 343, pp. 140–148, 2018.
- [18] M. A. Sotomayor, J. K. Reyes, L. Restrepo, C. Domínguez-Borbor, M. Maldonado, and B. Bayot, “Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries,” *PLoS One*, vol. 14, no. 1, pp. 1–19, 2019.
- [19] M. A. O. Dawood, S. Koshio, M. M. Abdel-Daim, and H. Van Doan, “Probiotic application for sustainable aquaculture,” *Rev. Aquac.*, pp. 1–18, 2018.
- [20] L. V. Díaz and M. A. Martínez-Silva, “Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña,” *Bol. Investig. Mar. y Costeras*, vol. 38, no. 2, pp. 165–187, 2009.
- [21] Banco Central del Ecuador, “Boletín Anuario 41,” 2019.
- [22] D. V. Lightner, “Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas,” *OIE Rev. Sci. Tech.*, vol. 15, no. 2, pp. 579–601, 1996.
- [23] C. Uzcategui, J. Solano, and P. Figueroa, “Perspective on the Long Term Sustainability of Natural Resources in the: Case of Ecuadorian Shrimp Industry,” *Rev. Univ. Y Soc.*, vol. 8, no. 3, SI, pp. 163–168, 2016.
- [24] L. Tran *et al.*, “Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 105, no. 1, pp. 45–55, 2013.
- [25] L. B. Argandona, “Sector Camaronero: Evolución y proyección a corto plazo,” Guayaquil, 2016.
- [26] P. Markowiak and K. Ślizewska, “Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health,” *Nutrients*, vol. 9, no. 9, 2017.
- [27] FAO/WHO, “Probiotics in food,” *Chem. Funct. Prop. Food Components, Third Ed.*, pp. 413–426, 2006.
- [28] M. J. Zorriehzahra *et al.*, “Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review,” *Vet. Q.*, vol. 36, no. 4, pp. 228–241, 2016.
- [29] N. G. Vine, W. D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter, and T. Hecht, “Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus,” *J. Fish Dis.*, vol. 27, no. 6, pp. 319–326, 2004.
- [30] Y. K. Lee, C. Y. Lim, W. L. Teng, A. C. Ouwehand, E. M. Tuomola, and S. Salminen, “Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 9, pp. 3692–3697, 2000.
- [31] P. Pandiyan *et al.*, “Probiotics in aquaculture,” *Drug Invent. Today*, vol. 5, no. 1, pp. 55–59, 2013.

- [32] N. V. Hai, "The use of probiotics in aquaculture," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 119, no. 4, pp. 917–935, 2015.
- [33] W. Chu, S. Zhou, W. Zhu, and X. Zhuang, "Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection," *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–6, 2014.
- [34] T. Defoirdt, P. Sorgeloos, and P. Bossier, "Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 14, no. 3, pp. 251–258, 2011.
- [35] A. S. Ninawe and J. Selvin, "Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges A.S. Ninawe et al.," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 35, no. 1, pp. 43–66, 2009.
- [36] M. Brown, "Modes of action of probiotics: Recent developments," *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 10, no. 14, pp. 1895–1900, 2011.
- [37] M. J. Medellin-Peña, H. Wang, R. Johnson, S. Anand, and M. W. Griffiths, "Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 13, pp. 4259–4267, 2007.
- [38] Y. H. Dong, L. H. Wang, and L. H. Zhang, "Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 362, no. 1483, pp. 1201–1211, 2007.
- [39] T. Defoirdt, N. Boon, P. Bossier, and W. Verstraete, "Disruption of bacterial quorum sensing: An unexplored strategy to fight infections in aquaculture," *Aquaculture*, vol. 240, no. 1–4, pp. 69–88, 2004.
- [40] B. Lakshmi, B. Viswanath, and D. V. R. Sai Gopal, "Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture," *J. Pathog.*, vol. 2013, pp. 1–13, 2013.
- [41] A. Farzanfar, "The use of probiotics in shrimp aquaculture," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 48, no. 2, pp. 149–158, 2006.
- [42] J. L. Balcázar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, and J. L. Múzquiz, "The role of probiotics in aquaculture," *Vet. Microbiol.*, vol. 114, no. 3–4, pp. 173–186, 2006.
- [43] S. Uematsu and S. Akira, "Innate immune recognition of viral infection," *Uirusu. J. Virol.*, vol. 56, no. 1, pp. 1–8, 2006.
- [44] C. Boyd, W. Hollerman, J. Plumb, and M. Saeed, "Effect of treatment with a commercial bacterial suspension on water quality in channel catfish ponds.," *Prog. Fish Cult.*, vol. 46, pp. 37–40, 1984.
- [45] C. C. Lazado and C. M. A. Caipang, "Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 4, pp. 990–998, 2014.
- [46] N. G. Vine, W. D. Leukes, and H. Kaiser, "Probiotics in marine larviculture," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 3, pp. 404–427, 2006.
- [47] C. C. Lazado, J. I. Lacsamana, and C. M. A. Caipang, "Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture," *Biotechnol. Adv. Shrimp Heal. Manag. Philipp.*, vol. 661, no. 2, pp. 89–114, 2015.

- [48] R Fuller, "Probiotics in man and animals," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 66, pp. 365–378, 1989.
- [49] B. AUSTIN, L. F. STUCKEY, P. A. W. ROBERTSON, I. EFFENDI, and D. R. W. GRIFFITH, "A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*," *J. Fish Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 93–96, 1995.
- [50] A. Irianto and B. Austin, "Irianto\_et\_al-2002-Journal\_of\_Fish\_Diseases.pdf," vol. 25, no. 11, pp. 333–342, 2002.
- [51] S. Rengpipat, A. Tunyanun, A. W. Fast, S. Piyatiratitivorakul, and P. Menasveta, "Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 55, no. 2, pp. 169–173, 2003.
- [52] W. Brenner and F. Uebernickel, *Design Thinking for Innovation*. St.Gallen, Switzerland, 2016.
- [53] A. Anadón, M. Rosa Martínez-Larrañaga, and M. Aranzazu Martínez, "Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 45, no. 1, pp. 91–95, 2006.
- [54] S. Hariharan and S. Dharmaraj, *Selection of New Probiotics: The Case of Streptomyces*. Elsevier Inc., 2018.
- [55] FAO, *Probiotics in animal nutrition - Production, impact and regulation*, vol. 24, no. 1. 2016.
- [56] S. Doron and D. R. Snyderman, "Risk and safety of probiotics," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 60, no. Suppl 2, pp. S129–S134, 2015.
- [57] S. Lorenzon, S. De Guarrini, V. J. Smith, and E. A. Ferrero, "Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 31–50, 1999.
- [58] T. R. Klaenhammer, "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 1–3, pp. 39–85, 1993.
- [59] P. V. Bramhachari, *Pallaval Veera Bramhachari*, Department. Machilipatnam.
- [60] M. Manefield *et al.*, "Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover," *Microbiology*, vol. 148, no. 4, pp. 1119–1127, 2002.
- [61] S. Mohapatra, T. Chakraborty, V. Kumar, G. Deboeck, and K. N. Mohanta, "Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention," *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, vol. 97, no. 3, pp. 405–430, 2013.
- [62] Y. L. Song and C. Y. Li, "Shrimp immune system - Special focus on penaeidin," *J. Mar. Sci. Technol.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [63] M. Halwart, S. Funge-smith, and J. Moehl, "El Papel de la Acuicultura en el Desarrollo Rural Introducción Seguridad Alimentaria , Desarrollo Rural , y Alivio de la Pobreza," pp. 59–103, 2011.
- [64] A. Kesarcodi-Watson, H. Kaspar, M. J. Lategan, and L. Gibson, "Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes," *Aquaculture*, vol. 274, no. 1, pp. 1–14, 2008.



- [65] V. Kumar, S. Roy, D. K. Meena, and U. K. Sarkar, "Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration," *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, vol. 24, no. 4, pp. 342–368, 2016.
- [66] Y. Cai *et al.*, "In vitro screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: To white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water," *Aquaculture*, vol. 498, pp. 61–71, 2019.
- [67] C. Tomalá, "ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE PRODUCTOS PROBIÓTICOS COMERCIALES EMPLEADOS EN LA LARVICULTURA DE CAMARÓN *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, USANDO UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MOLECULAR, PCR-DGGE," Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2011.
- [68] S. Jinendiran, S. Boopathi, N. Sivakumar, and G. Selvakumar, "Functional Characterization of Probiotic Potential of Novel Pigmented Bacterial Strains for Aquaculture Applications," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 11, no. 1, pp. 186–197, 2019.
- [69] P. F. Perez and D. Ph, "Cenaim informa," *Control*, no. 109, p. 2269494, 2004.
- [70] B. AUSTIN, E. BAUDET, and M. STOBIE, "Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*," *J. Fish Dis.*, vol. 15, no. 1, pp. 55–61, 1992.
- [71] H. Zokaeifar *et al.*, "Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 33, no. 4, pp. 683–689, 2012.
- [72] C. Domínguez-Borbor *et al.*, "The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans*, is effective to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture," *Aquaculture*, vol. 508, no. April, pp. 127–136, 2019.
- [73] J. Rodríguez and G. Le Moullac, "State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp," *Aquaculture*, vol. 191, no. 1–3, pp. 109–119, 2000.
- [74] X. Dong *et al.*, "Conjugative transfer of the PVA1-type plasmid carrying the PirABVP genes results in the formation of new AHPND-causing vibrio," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 9, no. JUN, pp. 1–11, 2019.
- [75] P. D. Munro, A. Barbour, and T. H. Birkbeck, "Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 12, pp. 4425–4428, 1995.
- [76] C. E. Boyd, W. D. Hollerman, and J. A. Plumb, "Effect of Treatment with a Commercial Bacterial Suspension on Water Quality in Channel Catfish Ponds 1 Bacteria capable of fixing nitrogen and mineralizing phosphorus have been widely applied to agricultural soils in the nutrient concentrations and crop y," no. 497.
- [77] X. Bi *et al.*, "Effects of *Bacillus subtilis* on the growth, colony maintenance, and attached bacterial community composition of colonial cyanobacteria," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 26, no. 15, pp. 14977–14987, 2019.
- [78] E. Muñoz-Atienza *et al.*, "Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture," *BMC Microbiol.*, vol. 13, no. 1, 2013.
- [79] D. Sharma and S. Kumar, *In Vitro Cultivation of AMF Using Root Organ Culture*,

no. June. 2018.

- [80] A. Uma and G. Rebecca, "Antibiotic Resistance in Bacterial Isolates from Commercial Probiotics Used in Aquaculture," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 1737–1743, 2018.
- [81] H. Wang, C. Wang, Y. Tang, B. Sun, J. Huang, and X. Song, "Pseudoalteromonas probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*," *Aquaculture*, vol. 494, no. January, pp. 30–36, 2018.
- [82] N. T. N. Tinh, R. A. Y. S. Asanka Gunasekara, N. Boon, K. Dierckens, P. Sorgeloos, and P. Bossier, "N-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 62, no. 1, pp. 45–53, 2007.
- [83] M. . Noarashikin, L. Y. Li, M. Karim, H. M. Doud, and M. I. Natrah, "Screening and identification of quorum sensing degraders from live feed *Artemia*," *J. Environmental Biol.*, vol. 37, pp. 811–816, 2016.
- [84] Y. B. Wang, "Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*," *Aquaculture*, vol. 269, no. 1–4, pp. 259–264, 2007.
- [85] S. Ziaei-Nejad, M. H. Rezaei, G. A. Takami, D. L. Lovett, A. R. Mirvaghefi, and M. Shakouri, "The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*," *Aquaculture*, vol. 252, no. 2–4, pp. 516–524, 2006.
- [86] M. Adel, A. F. M. El-Sayed, S. Yeganeh, M. Dadar, and S. S. Giri, "Effect of Potential Probiotic *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* on Growth Performance, Intestinal Microbiota, Digestive Enzyme Activities, and Disease Resistance of *Litopenaeus vannamei*," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 9, no. 2, pp. 150–156, 2017.
- [87] M. Sotomayor, "Moléculas estimulantes (ECPs) de la actividad enzimática en los crustáceos (*Artemia franciscana*)," 2008.
- [88] P. S. S. Anand *et al.*, "Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*," *Aquaculture*, vol. 418–419, pp. 108–115, 2014.
- [89] L. Rendón and J. Balcázar del Piñal, "Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances," *Aquat. Rev. electrónica Acuic.*, no. 19, pp. 27–33, 2003.
- [90] M. G. Klanian, "ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar " Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus Vannamei* " Requisito para optar al grado de MAGISTER EN CIENCIAS ES," no. January 2014, 2001.
- [91] M. Muñoz, R. Cedeño, J. Rodríguez, W. P. W. Van Der Knaap, E. Mialhe, and E. Bachère, "Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*," *Aquaculture*, vol. 191, no. 1–3, pp. 89–107, 2000.

- [92] C. Leonard, K. Söderhäll, and N. A. Ratcliffe, "Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes," *Insect Biochem.*, vol. 15, no. 6, pp. 803–810, 1985.
- [93] O. Lowry, L. Farr, R. Randall, and N. Rosebrough, "Protein measurement with the folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.*, vol. 193, pp. 265–275, 1951.
- [94] K. F. Liu, C. H. Chiu, Y. L. Shiu, W. Cheng, and C. H. Liu, "Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 28, no. 5–6, pp. 837–844, 2010.
- [95] X. Zheng, Y. Duan, H. Dong, and J. Zhang, "Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 62, pp. 195–201, 2017.
- [96] D. Mack *et al.*, "Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation," *Methods Enzymol.*, vol. 336, pp. 215–239, 2001.
- [97] J. M. A. VIDAL, M. N. D. C. PESSÔA, F. L. DOS SANTOS, P. D. P. MENDES, and M. S. MENDES, "PROBIOTIC POTENTIAL OF *Bacillus cereus* AGAINST *Vibrio* spp. IN POST-LARVAE SHRIMPS," *Rev. Caatinga*, vol. 31, no. 2, pp. 495–503, 2018.
- [98] M. . Sotomayor, D. Aquino, and F. Echeverria, "Evaluación de productos extracelulares y cepas probióticas en la estimulación de la actividad enzimática en *Penaeus vannamei*," 2009.
- [99] G. S. Ferreira *et al.*, "Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*," *Aquaculture*, vol. 448, pp. 273–279, 2015.
- [100] Francisca Burgos, "Efecto de las cepas probióticas P62 (*Vibrio* sp.) y P64 (*Bacillus* sp.) en un sistema de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei*," Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2005.
- [101] Y. Montgomery, "Efecto de la adición de ácidos orgánicos y probióticos sobre el crecimiento del camarón (," Universidad Técnica de Machala, 2014.
- [102] S. A. Norrell and K. E. Messley, *Microbiology Laboratory Manual: Principles and Applications*. Prentice Hall, 2003.
- [103] J. K. Reyes, "Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*," Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2018.
- [104] N. G. Vine, W. D. Leukes, and H. Kaiser, "In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 231, no. 1, pp. 145–152, 2004.
- [105] C. Domínguez-Borbor, B. Chalén-Alvarado, and J. A. Rodríguez, "A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture," *MethodsX*, vol. 5, pp. 90–95, 2018.
- [106] J. Hernández-López, T. Gollas-Galván, and F. Vargas-Albores, "Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes)," *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 113, no. 1, pp.



61–66, 1996.

- [107] M. Gullian, F. Thompson, and J. Rodriguez, “Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*,” *Aquaculture*, vol. 233, no. 1–4, pp. 1–14, 2004.
- [108] C. Domínguez-Borbor, I. Betancourt, F. Panchana, S. Sonnenholzner, and B. Bayot, “An effective white spot syndrome virus challenge test for cultured shrimp using different biomass of the infected papilla,” *MethodsX*, vol. 6, pp. 1617–1626, 2019.

# APÉNDICES

# APÉNDICE A

Formato de encuesta sobre uso de probióticos para productores de camarón.

## Encuesta dirigida a productores de camarón

Materia Integradora – Carrera Acuicultura

### I. Introducción

Somos estudiantes de la carrera de Acuicultura de la Escuela Superior Politecnica del Litoral (ESPOL), con el fin de evaluar sus necesidades en cuanto al uso de probióticos, solicitamos su colaboración llenando esta encuesta marcando con una X la respuesta de su elección. Su opinión será tomada en cuenta para elaborar una guía conteniendo un protocolo para la evaluación valorada de probióticos basado en criterios de calidad para el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*. De antemano, muchas gracias.

### II. Datos de encuestado

Nombres y Apellidos:.....

Empresa en que labora: .....

Nivel de producción (Maduración, laboratorio o camaronera): .....

Cargo que desempeña:.....

Teléfono de contacto: .....

### III. Cuestionario

#### 1. ¿Utiliza probióticos en su cultivo?

Marcar solo 1

Si

No (Explique el por qué): .....

#### 2. ¿Para qué utiliza los probióticos?

Marcar todos los que correspondan

Inmunoestimulante

Mejora de digestibilidad

Combatir patógenos

Otro (Mencione/los): .....

#### 3. ¿Qué tipo de cepas probióticas utiliza?

Marcar todos los que correspondan

*Bacillus*

Bacterias ácido-lácticas

*Aeromonas*

*Vibrios*

*Enterococcus*

*Pseudoenteromonas*

Otro (Mencione/los): .....

**4. ¿Cuántas cepas tienen los probióticos que utiliza?**

Marcar solo 1

Una cepa

Multicepa

**5. ¿Sigues los protocolos de la ficha técnica de los productos?**

Marcar solo 1

Sí

No (Explique el por qué): .....

**6. ¿Qué tipo de probiótico prefiere utilizar?**

Marcar todos los que correspondan

Aislado del hospedero (*Penaeus vannamei*)

Aislado del medio circundante al hospedero

Aislado de otras especies acuáticas

Aislado de especies terrestres

Aislado de medios terrestres

Otro (Mencione/los): .....

**7. ¿Contra qué enfermedad utiliza principalmente los probióticos?**

Marcar todos los que correspondan

Necrosis hepatopancreática aguda (AHPND/EMS)

Síndrome de bolitas

Síndrome de Zoea

Vibriosis sistémica

Enfermedad de la Mancha Blanca (WSSV)

Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV)

Necrosis del hepatopancreas bacteriano (NHP)

Otro (Mencione): .....

**8. ¿Cómo aplica los probióticos?**

Marcar todos los que correspondan

Agua

Balanceado enriquecido con probióticos

Balanceado con inclusión de probióticos por microencapsulación (fábrica)

Suelo

Bioencapsulación

Suspensión bacteriana

Otro (Mencione/los): .....

**9. ¿Con que frecuencia en promedio aplica los probióticos?**

Marcar todos los que correspondan

Cada semana o menos

Cada dos semanas

Cada mes

**10. Utiliza los probióticos como:**

Marcar solo 1

Profiláctico

Para tratar un problema ya presente en la producción (Curativo)

**11. ¿Cómo activan los probióticos?**

Marcar todos los que correspondan

Solo Agua

Melaza líquida

Melaza granulada

Azúcar morena

Otro (Mencione/los): .....

**12. ¿Cuál es su criterio de selección de probióticos?**

Marcar todos los que correspondan

Precio

Recomendación

Facilidades de preparación

Resultados de campo

Otro (Mencione/los): .....

**13. ¿Realiza algún tipo de prueba para evaluar la efectividad del probiótico que utilizará?**

Marcar solo 1

No

Si (Mencione/los): .....

**14. ¿Estaría interesado en un protocolo para que los productores de camarón puedan seleccionar probióticos de calidad?**

Marcar solo 1

Si

No (Mencione el por qué): .....

.....

**15. ¿Cuánto dinero como máximo estaría dispuesto a pagar por un análisis de laboratorio para determinar la efectividad de un probiótico?**

Marcar solo 1

\$0-50

\$50-100

\$100-200

\$200-500

>\$500