

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

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

Diseño de un protocolo para la identificación de probióticos en camarones peneidos utilizando la *Artemia franciscana* como organismo modelo.

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

#### **Ingeniero Acuícola**

Presentado por:

Josselyn Margoth Pizarro Echeverría

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año 2021

## DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios, por ser la guía y el soporte a lo largo de toda mi vida. A mi papito Rolando, por ser mi consejero, mi guía, mi apoyo, y sobre todo mi héroe. Hoy en día soy quien soy por todas tus palabras de aliento, y cualquier palabra que escriba se va a quedar corta para todo lo que tengo que agradecerte. A mi mamita Silvia, por darme la vida y ser mi mejor amiga, mi cómplice y, sobre todo, por brindarme su mano para apoyarme y seguir adelante, te agradezco siempre estar ahí en cada logro que tuve. A mis abuelos, Gloria y Luis Carlos, por sus palabras de aliento y por cada consejo, que hoy en día por fin entendí. A mis hermanos Stephanie, Adonis y Mateo (+), ustedes son mi inspiración para cada día ser mejor y este logro es más suyo que mío. A mi hermana Gema, porque fue mi paño de lágrimas, mi cómplice y mi confidente durante todos estos años fuera de casa, toda la vida te estaré agradecida por no dejarme desfallecer y por creer en mí. Y finalmente, una especial dedicatoria a mi abuelito Lucho (+), siempre te tengo en mi corazón, y sólo espero que donde sea que estés, te sientas orgulloso de mí.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi más sincero agradecimiento a Bonny Bayot, Ph.D. Por su paciencia, guía, confianza y apoyo para el desarrollo de este proyecto. Al Departamento de Salud Animal de CENAIM, especialmente al Tnlgo. Ac. Juan Muñoz y la Blga. Mrna. Karina Reyes por compartir conmigo su experiencia y conocimiento. A los Blgos. Leandro Bajaña, Ramiro Solórzano, Martha Borbor y Rubén Román, por su apoyo en la fase experimental de este proyecto. A mis padres por ser mi soporte, a mis tíos, Luis, Edgar y Luisiana por brindarme un hogar durante mi etapa universitaria. Y por último a mi alma máter ESPOL, por inculcarme la excelencia en todo lo que hago.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Josselyn Margoth Pizarro Echeverría* doy mi consentimiento para que la ESPOI 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”

Josselyn Pizarro E.

# EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:  
**BONNY NARCISA  
BAYOT ARROYO**

---

**Jerry Landívar, M.Sc.**

PROFESOR DE LA MATERIA

---

**Bonny Bayot, Ph.D.**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

Uno de los análisis más importantes para probar la efectividad de los probióticos para camarón son los ensayos donde los camarones suplementados con probióticos son desafiados con bacterias patógenas. Sin embargo, estos experimentos requieren grandes volúmenes de agua, espacio, algunos técnicos, y costos de experimentación relativamente altos. El presente trabajo tuvo como objetivo diseñar un protocolo para la identificación de probióticos para camarones peneidos utilizando a la *Artemia franciscana* como organismo modelo. Se determinó la factibilidad de usar pruebas de desafío con artemias suplementadas con probióticos y luego desafiadas con una cepa patógena para camarón, para evaluar la efectividad para identificar probióticos para camarón. En una prueba de concepto, se desafió a artemias, que previamente recibieron administración de seis probióticos comerciales, contra una cepa bacteriana patógena para camarón. Los resultados fueron consistentes con los de la prueba *in vitro* de exclusión competitiva, donde se evaluó los mismos probióticos comerciales y cepa patógena. Se observó una correlación lineal significativa ( $r = 0.97$ ,  $p = 0.01$ ) entre la supervivencia de las artemias al finalizar la prueba *in vivo* y los resultados de la prueba *in vitro* de exclusión competitiva. Se determinó que el uso de la artemia en una prueba de desafío posee un 70% de factibilidad para evaluar la efectividad de probiótico para camarón, lo cual fue superior a tres métodos de análisis tradicionales. Tal valor es explicado por los pocos recursos y facilidad de ejecución de la prueba con artemias, comparado con los métodos tradicionales.

**Palabras Clave:** *Artemia franciscana*, camarón, cribado de probióticos, organismos modelos, probióticos.

## **ABSTRACT**

*One of the most important analyzes to prove the effectiveness of probiotics for shrimp are trials in which shrimp supplemented with probiotics are challenged with a pathogenic bacteria. However, these experiments require large volumes of water, space, some technicians, and relatively high experimentation costs. The present work aimed to design a protocol for the identification of probiotics for penaeid shrimp using the *Artemia franciscana* as a model organism. The feasibility of using challenge tests with brine shrimp supplemented with probiotics and then challenged with a pathogenic strain for shrimp, to evaluate the effectiveness in identifying probiotics for shrimp was determined. In a proof of concept, brine shrimp, previously administered with six commercial probiotics, were challenged against a bacterial strain pathogenic for shrimp. The results were consistent with those of the *in vitro* competitive exclusion test, where the same commercial probiotics and pathogenic strain were evaluated. A significant linear correlation ( $r = 0.97$ ,  $p = 0.01$ ) was observed between the survival of the brine shrimp at the end of the *in vivo* test and the results of the *in vitro* competitive exclusion test. It was determined that the use of artemia in a challenge test presented a 70% feasibility to evaluate the effectiveness of a probiotic for shrimp, which was superior to the three traditional analysis methods. Such value is explained by the few resources and ease of execution of the brine shrimp test, compared to the traditional methods.*

*Keywords: Artemia franciscana, shrimp, probiotic screening, model organisms, probiotics.*

# ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	v
RESUMEN .....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1 .....	1
1.    Introducción .....	1
1.1    Descripción del problema .....	2
1.2    Justificación del problema .....	2
1.3    Objetivos .....	3
1.3.1    Objetivo General .....	3
1.3.2    Objetivos Específicos.....	4
1.4    Marco Teórico.....	4
1.4.1 <i>Artemia franciscana</i> y su aplicación en acuicultura .....	4
1.4.2    Enfermedades bacterianas en el cultivo de camarón .....	5
1.4.3    Probióticos en la industria acuícola .....	6
1.4.4    Mecanismos de acción de los probióticos .....	7
CAPÍTULO 2 .....	9
2.    Metodología.....	9
2.1    Uso de la artemia como organismo modelo para salud humana y animal .....	9
2.2    Factibilidad de la prueba de desafío con artemia para evaluar la efectividad de probióticos para camarón .....	9



2.2.1	Experimentación de exploración para la prueba del concepto.....	10
2.2.2	Pruebas de exclusión competitiva de probióticos comerciales contra cepa patógena para camarón .....	13
2.2.3	Análisis de factibilidad de las pruebas en artemia para identificar probióticos para camarón.....	14
2.3	Protocolo de evaluación de probióticos en camarones peneidos utilizando la <i>Artemia franciscana</i> como organismo modelo. ....	16
CAPÍTULO 3 .....		17
3.	Resultados y Análisis.....	17
3.1	Uso de la <i>Artemia</i> como organismo modelo para salud humana y animal ...	17
3.2	Factibilidad de la prueba de desafío con artemia para evaluar la efectividad de probióticos para camarón .....	25
3.2.1	Experimentación de exploración para la prueba del concepto.....	25
3.2.2	Pruebas de exclusión competitiva de probióticos comerciales contra cepa patógena para camarón .....	26
CAPÍTULO 4 .....		28
4.	Conclusiones y Recomendaciones .....	28
4.1	Conclusiones.....	28
4.1.1	Análisis de factibilidad de las pruebas en artemia para identificar probióticos para camarón.....	28
4.1.2	Protocolo de evaluación de probióticos en camarones peneidos utilizando la <i>Artemia franciscana</i> como organismo modelo. ....	31
4.2	Recomendaciones.....	34
BIBLIOGRAFÍA .....		35

## ABREVIATURAS

AHL	N-acil-homoserina
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FASW	Filtered Autoclaved Seawater
IC <sub>95</sub>	Intervalo de confianza al 95%
LC50	Prueba de Letalidad Media
MTT	3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NB	Nutrient Broth
PHB	Poli-beta-hidroxibutirato
QS	Quorum Sensing
QQ	Quorum Quenching
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## SIMBOLOGÍA

°C	Grados Centígrados
g/L	Gramos por cada litro
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
%	Porcentaje

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de los probióticos en acuicultura. (Lazado, Lacsamana, & Caipang, 2015) .....	8
Figura 2. Mecanismo de bloqueo de la comunicación bacteriana Quorum Sensing (QS) conocido como Quorum Quenching QQ. (Beitelshees, Hill, Jones, & Pfeifer, 2018). ..	8
Figura 3. Esquema de la metodología utilizada para el diseño del protocolo de identificación de camarones peneidos utilizado <i>A. franciscana</i> como organismo modelo. ....	9
Figura 4. Cono de eclosión de artemia utilizado en la determinación del LC50 de la bacteria patógena. ....	11
Figura 5. Ensayo experimental del LC50. ....	12
Figura 6. Esquema cronológico de la prueba de desafío de artemias suplementadas con probióticos .....	13
Figura 7. Regresión lineal entre supervivencia de las artemias suplementadas con seis probióticos comerciales e infectada con una cepa bacteriana patógena para camarón y diámetro de inhibición de los probióticos comerciales contra la cepa bacteriana patógena. ....	27
Figura 8. Factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar la efectividad de probióticos comerciales. ....	31
Figura 9. Diseño de un protocolo para la identificación de probióticos en camarones peneidos utilizando la <i>A. franciscana</i> como organismo modelo. ....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de ecotoxicidad donde se utiliza a la Artemia franciscana como organismo modelo. ....	18
Tabla 2. Estudios en el área de acuicultura donde se utiliza a la Artemia franciscana como organismo modelo en la extrapolación de resultados. ....	21
Tabla 3. Resultados de la prueba de letalidad media (LC50) de artemias infectadas con una cepa patógena de <i>V. parahaemolyticus</i> . ....	25
Tabla 4. Resultados de supervivencia de la prueba de desafío en artemias suplementadas con probióticos comerciales e infectadas con cepa patógena. ....	26
Tabla 5. Comparación entre los resultados de la prueba de exclusión competitiva y la supervivencia obtenida en la prueba de desafío en artemias suplementadas con probióticos. ....	26
Tabla 6. Valoración (en porcentaje) de criterios de factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar efectividad de probióticos comerciales, obtenida mediante entrevistas y ponderaciones propuestas por (Nuñez & Mora, 2020). ....	28
Tabla 7. Matriz de factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar la efectividad de probióticos comerciales. Se realiza la comparación entre tres métodos tradicionales (pruebas de desafío en larvas de camarón, prueba de desafío en juveniles de camarón, y prueba in vitro de exclusión competitiva) y la prueba de desafío con artemias propuesta en este trabajo. ....	29

# CAPÍTULO 1

## 1. Introducción

El camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* es el principal producto no petrolero de exportación del Ecuador. En el 2020 se exportó 1491 millones de libras, equivalente a un ingreso para el país de USD 3823 millones (BCE, 2021). A nivel internacional, Ecuador se mantuvo en el 2021 como el segundo productor mundial de camarón, pese al decrecimiento de las exportaciones por la pandemia de COVID-19 y las restricciones impuestas por el mercado chino. De tal forma que, la participación del sector camaronero en los mercados para Estados Unidos y Rusia aumentó 58% y 44%, respectivamente (Lizarraga, 2021). El camarón ecuatoriano es reconocido a nivel mundial por su sabor, calidad, valor agregado, y, sobre todo, por la sostenibilidad con la que se lleva a cabo el proceso de cultivo, que incluye las buenas prácticas de manejo y bienestar animal (SAE, 2018), (Reyes, 2021). Sin embargo, las enfermedades de etiologías bacterianas causan problemas durante el cultivo de camarón (Kautsky, Ronnback, Tedengren, & Troell, 2000). El método de control más usado para tratar las enfermedades bacterianas en acuicultura son los antibióticos, pero son perjudiciales para el cultivo de camarón por el riesgo de desarrollo de bacterias resistentes a estos fármacos, de tal forma que, su uso está regulado bajo estándares internacionales (Redrován, 2017). En tal contexto, el uso de probióticos es el método de control natural más utilizado para combatir infecciones bacterianas en la acuicultura del camarón. Los múltiples beneficios de los probióticos efectivos incluyen la capacidad de antagonismo contra bacterias patógenas, el mejoramiento del sistema inmune y colonización de estas bacterias en el tracto digestivo del camarón, entre otros modos de acción, lo cual además de proteger al animal de las bacterias patógenas, mejora la supervivencia y el crecimiento (Nayak, 2010).

## **1.1 Descripción del problema**

Las bacterias del género *Vibrio* son unos de los patógenos de mayor riesgo para las distintas etapas de cultivo del camarón, impactando negativamente en la supervivencia y producción. Pese a que el uso de probióticos está muy extendido en el cultivo de camarón para combatir este tipo de infecciones bacterianas, muchos son inefectivos (Sotomayor, y otros, 2019). Por tanto, es importante desarrollar probióticos efectivos y que los productores puedan evaluar la efectividad de los probióticos comerciales para evitar pérdidas económicas. Existen algunas pruebas para evaluar la efectividad de los probióticos comerciales, siendo estas las mismas que son usadas para el descubrimiento y desarrollo de los probióticos. Sin embargo, el principal problema para evaluar la eficacia de estos productos radica en los altos costos de algunos de los análisis de laboratorio y experimentación, así como el tiempo que implica llevarlos a cabo. Un ejemplo son las pruebas de desafío con patógenos a camarones que previamente recibieron la administración del potencial probiótico a ser estudiado. Esta clase de experimentos *in vivo* constituye la prueba básica para probar el efecto de los productos dirigidos a mejorar el estado de salud, pero son difíciles de llevar a cabo por el constante manejo que se necesita realizar a los camarones y los recursos empleados. Por lo tanto, es importante buscar organismos alternativos que sirvan como modelo para realizar estas pruebas, cuyo manejo sea más sencillo y menos costoso para los investigadores y productores pequeños. Esto podría ser especialmente útil en una etapa inicial de cribado cuando se cuentan con una cantidad alta de candidatos a potenciales cepas probióticas o cuando los productores cuentan con muchos probióticos a ser evaluados.

## **1.2 Justificación del problema**

Los organismos modelos son especies utilizadas en diversas áreas de la biología para estudiar procesos y respuestas biológicas importantes y extrapolarlos a organismos de interés, que son más difíciles de estudiar directamente (Fields & Johnston, 2005). La *Artemia franciscana* es utilizada como organismo modelo en

estudios ecotoxicológicos para extrapolar el impacto ambiental provocado por materiales industriales (Cavion, y otros, 2020). La artemia ha sido inclusive sugerida como una alternativa a las pruebas *in vitro* para evaluar la citotoxicidad de compuestos de distinta naturaleza (Rajab, Ramazani, Hamidi, & Naji, 2015). La artemia es también usada como especie experimental para el cribado y biodescubrimiento de compuestos bioactivos y posterior desarrollo de fitofármacos para humanos (Meyer, y otros, 1982). En acuicultura, la *A. franciscana* es el organismo modelo para investigaciones en crustáceos y para la evaluación de productos naturales bioactivos o tóxicos (Nunes, Carvalho, Guilhermino, & Stappen, 2006). Las principales ventajas experimentales de la *A. franciscana* incluyen facilidad de cultivo, mantenimiento y reproducción en laboratorio, ciclo biológico rápido y alto número de descendientes. Considerando que, la artemia ha sido utilizada como organismo modelo para la evaluación de productos naturales bioactivos para crustáceos, y que, algunos de los principales problemas para evaluar la eficacia de los productos comercializados para la salud de camarón radican en los altos costos y variedad de pruebas para testear los modos de acción, se plantea que, la *A. franciscana* puede ser usada para identificar cepas potencialmente probióticas para camarón a través de un screening previo con pruebas de desafíos de *A. franciscana* con patógenos bacterianos. De verificarse la hipótesis, y dada la facilidad de la experimentación con las artemias, estas podrían ser utilizadas como herramienta práctica y relativamente económica para la búsqueda de probióticos, e inclusive para el análisis de efectividad de los productos comercializados como antibacterianos para camarón, análisis de toxicidad de productos comercializados para la salud de camarón, entre otras aplicaciones.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

- Diseñar un protocolo para la identificación de probióticos en camarones peneidos utilizando la *Artemia franciscana* como organismo modelo.



### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Analizar estudios de *A. franciscana* como organismo modelo aplicados a la salud humana y animal.
- Desarrollar un protocolo de identificación de probióticos basado en *A. franciscana* para camarones peneidos

## 1.4 Marco Teórico

### 1.4.1 *Artemia franciscana* y su aplicación en acuicultura

La *A. franciscana* es un micro crustáceo que habita en ecosistemas acuáticos que alcanzan grandes concentraciones de sal. Las artemias son organismos filtradores no selectivos, por eso se la comercializa para fines alimenticios en acuicultura debido a su gran contenido nutricional, su capacidad de bioencapsulación, así como su gran resistencia a las distintas condiciones del medio, y la alta tasa de crecimiento que alcanza (Green, y otros, 2005). Se la utiliza como alimento vivo para las etapas de larvicultura de diversas especies de peces, así como de crustáceos más grandes como camarón, cangrejo y langostas (Hai, Buller, & Fotedar, 2010). Por lo general, los productores optan por enriquecerla con microalgas, probióticos o vitaminas antes de administrarlas a sus cultivos. Debido a su reducido tamaño, son fácilmente digeribles ya sea en su aplicación como biomasa fresca o congelada (Alvarez, 2017).

La artemia es también utilizada en acuicultura como organismo modelo para los estudios de invertebrados como *P. vannamei*, *Penaeus monodon* (Laranja, y otros, 2018), y cangrejo azul *Cardiosoma crassum* (Azrin, Yuzine, Ina-Salwany, & Karim, 2019) debido a que comparten con estos invertebrados similares respuestas del sistema inmune. Por ejemplo, se han realizado estudios con artemias para extrapolar a camarón los resultados de la expresión de genes codificantes de la proteína de choque térmico Hsp70 frente a variaciones bruscas de temperatura e infecciones causadas por la presencia de patógenos bacterianos y virales (Santander, 2009), (Baruah, Norouzitallab, Linayati, Sorgeloos, & Bossier, 2014). Otra aplicación de la *A. franciscana* ha sido

propuesto por (Bossier, 2015), quien la ha usado en condiciones gnotobióticas para la búsqueda de patógenos bacterianos de camarón. De igual manera, uno de los estudios recientes para medir la efectividad de potenciales probióticos contra *V. harveyi* en cangrejo azul (Azrin, Yuzine, Ina-Salwany, & Karim, 2019), propone el uso de la artemia en las Pruebas de Letalidad Media (LC50) para encontrar la concentración del patógeno a la que debe desafiarse a los juveniles de cangrejo azul.

En todos los estudios mencionados, las ventajas de usar la artemia radica en que las experimentaciones: se realizan a pequeña escala, son fácilmente ejecutables y repetibles, son altamente controlables, presentan una reducción en los tiempos de duración de los ensayos y, sobre todo, sus resultados son replicables en camarón.

Finalmente, las aplicaciones de la artemia van más allá de la industria acuícola, por ejemplo, se han realizado estudios eco-toxicológicos en búsqueda de extractos vegetales con propiedades farmacéuticas, de esta manera, se han hallado nuevos compuestos a través del cribado con artemia, lo que demuestra el beneficio que aporta al desarrollo de nuevos procedimientos de bioensayos que sean más económicos y fáciles de realizar (Meyer, y otros, 1982).

#### **1.4.2 Enfermedades bacterianas en el cultivo de camarón**

Las enfermedades de origen bacteriano en acuicultura son provocadas principalmente por *Vibrios* (Abud & Barracco, 2008). Los *Vibrios*, son considerados patógenos oportunistas, ya que se incrementan cuando el animal presenta un sistema inmune debilitado y coloniza primero el tracto digestivo (Amaro & Biosca, 2021). Estas bacterias utilizan un mecanismo de expresión de genes de virulencia llamado *quorum sensing* (QS), por el cual utilizan moléculas autoinductoras, conocidas como *lactonas N-acil homoserina* (AHL) para difundirse hacia el exterior de la membrana celular, con el objetivo de alcanzar concentraciones críticas y posteriormente ingresar a la célula y activar la expresión de genes de virulencia (Bai, Han, Chen, & Zhang, 2007). En presencia de factores bióticos, abióticos, genéticos e inmunológicos, estas bacterias en el camarón pueden desencadenar el desarrollo de infecciones con altas

mortalidades tales como la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). *AHPND* es una importante enfermedad emergente que se propagó progresivamente como epidemia en Asia desde el año 2009 y hoy en día afecta a la mayoría de los países camaroneros (Hong, 2016). Una diferente cantidad de bacterias del género *Vibrio* producen este evento entre ellas *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio owensii* y *Vibrio harveyi* (Hong, 2016). La enfermedad se produce cuando el patógeno coloniza el estómago de los camarones, liberando las toxinas binarias PirA y PirB, y afectando posteriormente al hepatopáncreas, al generar necrosis y desprendimientos celulares agudos en este órgano (Lai, Tze-Hann, & Ando, 2015), (Hong, 2016), (Restrepo, y otros, 2018).

#### **1.4.3 Probióticos en la industria acuícola**

El concepto original de probióticos ha cambiado a lo largo de los años. Una de las definiciones enfatiza en el concepto que los probióticos son microorganismos vivos usados como suplementos alimenticios con el fin de mejorar la salud del ser humano o del ganado, siendo el efecto benéfico la modificación de la microbiota del hospedero (Villamil Diaz & Martin Silva, 2009). Otro concepto válido de probiótico refiere al organismo de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos y ayuda al equilibrio microbiano intestinal (Sorroza L, 2016). En Ecuador la industria acuícola ha sufrido importantes pérdidas debido a eventos patológicos en los últimos años. Aunque existen alternativas para enfrentar estos eventos, como el uso de antibióticos, estos no son recomendados principalmente por el riesgo de adquisición de resistencia a estos químicos y consiguiente reducción de su efectividad (Lozano & Palacios, 2020)

Entre las diferentes especies de bacterias usadas como probióticos destaca el uso de *Bacillus* como principal candidato por sus propiedades antagonistas a patógenos. Los *Bacillus* son usados también para el mejoramiento de la calidad de agua de cultivo, puesto que pueden convertir la materia orgánica en CO<sub>2</sub>, en contraste con las bacterias gram negativas que degradan la materia orgánica formando un limo (Segundo, Párraga, & Santos, 2018). Los *Bacillus* son

bacterias formadoras de endosporas, poseen flagelos periícticos, son quimioheterótrofos y pertenecen a una familia con más de 60 especies, siendo aerobios o anaerobios (Turnbull, Melling, & Kramer, 1991). Por lo general, este género se encuentra en plantas y suelos donde el ciclo del nitrógeno y carbono cumplen un papel importante y la mayoría están más activos en sedimentos, donde su ciclo de vida se divide en dos etapas: una fase de crecimiento exponencial y otra de esporulación (Merchan & Marquéz, 2017). Entre las principales características de los bacilos esta la capacidad de producir antibióticos, la nitrificación y desnitrificación del medio, la termofilia y el parasitismo. Por ejemplo, un estudio mostró los efectos benéficos de cuatro cepas de *Bacillus* en larvas de *P. vannamei*, donde las cuatro cepas indujeron una supervivencia de larvas significativamente mayor comparada al control, así como un antagonismo marcado frente a *V. campbellii*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* (Irasema, y otros, 2011).

#### **1.4.4 Mecanismos de acción de los probióticos**

Los camarones, al ser invertebrados, no poseen una inmunidad adaptativa, por ende, se busca proveer a su sistema inmune con las mayores defensas posibles. (Laranja, y otros, 2017). Por eso, al administrar probióticos se espera que dichas bacterias puedan activar en los animales, genes de inmunidad que eviten la colonización de las bacterias patógenas (Figura 1). Los probióticos por lo general, favorecen el crecimiento del microbiota intestinal del hospedero. De esta manera compiten por espacio y nutrientes con las bacterias potencialmente perjudiciales, logrando mejorar los mecanismos de defensa naturales y con esto, su resistencia a enfermedades infecciosas (Ossorio, 2017).

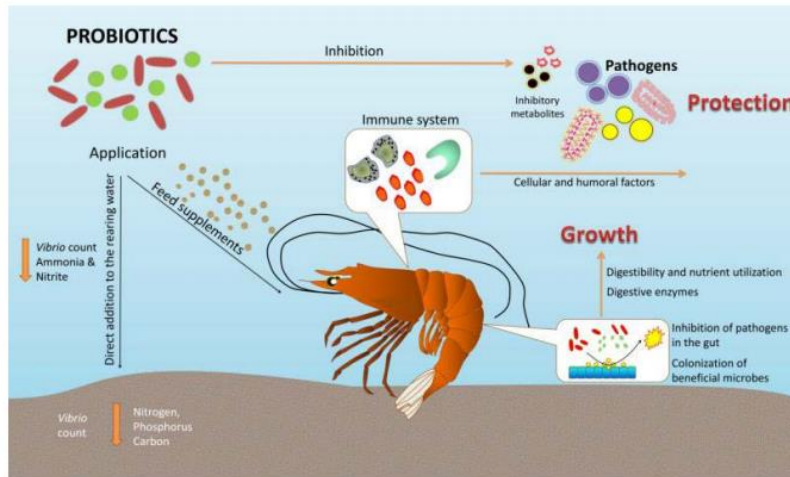


Figura 1. Mecanismos de acción de los probióticos en acuicultura. (Lazado, Lacsamana, & Caipang, 2015)

Por lo general, las bacterias probióticas producen ciertos compuestos inhibitorios que degradan las señales moleculares propias de las bacterias patógenas. Tal es el caso de los *Bacillus*, que poseen el gen *aiiA* que codifica la enzima AHL-lactonasa, que es capaz de inactivar las AHLs y con esto interferir en la detección del QS. A este mecanismo se lo conoce como *quorum quenching* o QQ (Figura 2) (Vinoj, Vaseeharan, Tomas, Spiers, & Shanthi, 2014). La interrupción del QS es una de las nuevas estrategias de control que se aplican en acuicultura y otras afectadas por este tipo de patógenos (Zhao, Chen, Quan, & Fan, 2015).

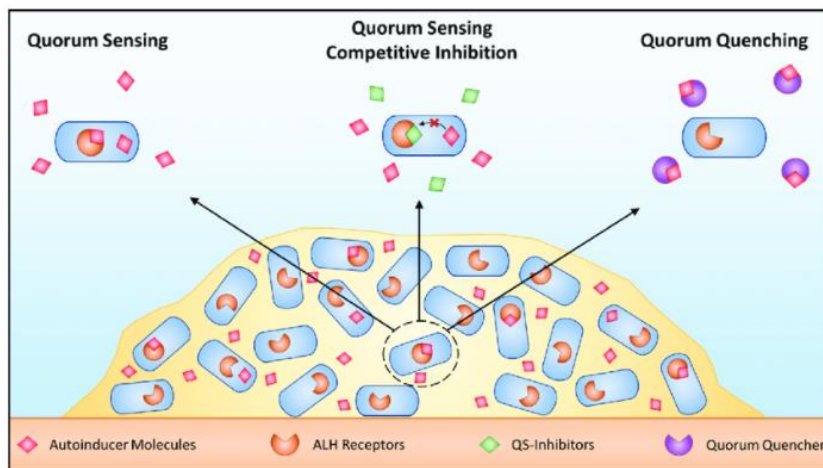


Figura 2. Mecanismo de bloqueo de la comunicación bacteriana Quorum Sensing (QS) conocido como Quorum Quenching QQ. (Beitelshees, Hill, Jones, & Pfeifer, 2018).

# CAPÍTULO 2

## 2. Metodología

El diseño del protocolo para la identificación de probióticos en camarones peneidos utilizando a la *A. franciscana* como organismo modelo se desarrolló en tres fases (Figura 3).



Figura 3. Esquema de la metodología utilizada para el diseño del protocolo de identificación de camarones peneidos utilizando *A. franciscana* como organismo modelo.

### 2.1 Uso de la artemia como organismo modelo para salud humana y animal

La primera fase consistió en la revisión de la literatura científica sobre el uso de la artemia como organismo modelo en estudios de diferentes áreas cuyos resultados hayan sido extrapolados a distintos organismos o ecosistemas de interés, incluyendo estudios dirigidos a camarones peneidos (Figura 3).

### 2.2 Factibilidad de la prueba de desafío con artemia para evaluar la efectividad de probióticos para camarón

En la segunda fase, se determinó mediante dos actividades la factibilidad de que la prueba de desafío con artemias pueda evaluar la efectividad de probióticos para camarón. En primer lugar, se realizó una exploración de prueba de concepto, donde mediante una experimentación *in vivo* se desafió a artemias, que previamente fueron administradas con seis probióticos comerciales, contra una cepa bacteriana patógena para camarón (Figura 3).

Posteriormente, se evaluó la efectividad de la prueba de desafío con artemias, comparando los resultados (supervivencia de las artemias luego de la infección con la cepa bacteriana patógena) con los resultados del análisis *in vitro* de exclusión competitiva (diámetro de inhibición) de los probióticos comerciales contra la cepa bacteriana patógena utilizados en la prueba *in vivo*. Una vez que se comprobó que era factible usar a la artemia para evaluar la calidad de probióticos comerciales, se valoró esta factibilidad. Se incluyó en esta valoración tres análisis utilizados tradicionalmente para evaluar la calidad de probióticos para camarón. La valoración se realizó en base a criterios propuestos en la literatura para evaluar cuantitativamente las metodologías de evaluación de efectividad de los probióticos.

### **2.2.1 Experimentación de exploración para la prueba del concepto**

Para la prueba de concepto se utilizó 6 probióticos comerciales (P1, P2, P3, P4, P5 y P6), mientras que la bacteria patógena para camarón fue la cepa *V. parahaemolyticus* Ba94C2, causante de AHPND (Restrepo, y otros, 2018).

#### **2.2.1.1 Determinación de la concentración letal de la cepa patógena**

Para determinar la concentración de bacteria patógena adecuada para infectar a las artemias se realizó un experimento de toxicidad, con el cual se identificó la concentración letal 50 (LC50) (Castaño, Cantarino, Castillo, & Tarazona, 1996) de la cepa *V. parahaemolyticus* Ba94C2. Se trabajó con artemias de alto nivel de bioseguridad (cistos de artemia IL, INVE, Lote N°2120233228). Se realizó una siembra directa de 1 g de quistes en un cono de eclosión (Figura 4), con volumen final de 1 L de agua de mar filtrada por UV y autoclavada (FASW) previamente. Además, se colocó aireación e iluminación constante durante 24 horas antes de cosechar y enjuagar a los nauplios (Figura 4).



*Figura 4. Cono de eclosión de artemia utilizado en la determinación del LC50 de la bacteria patógena.*

Para el diseño experimental se realizó una variación del protocolo descrito por (Laranja, y otros, 2018). Se tuvieron cuatro tratamientos consistentes en diferentes concentraciones de la bacteria patógena:  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , y  $10^5$  UFC/mL. Se incluyó un control negativo, donde la artemias no fueron infectadas con la cepa patógena. Cada tratamiento tuvo un total de seis réplicas y cada unidad experimental (tubos Falcon 50 mL) contenía 30 ml de FASW, a una densidad de 1 nauplio de artemia/mL. El experimento se llevó a cabo sin aireación, con una temperatura promedio del agua de  $30.1 \pm 0.9$  °C. La infección se realizó una hora después de colocar los nauplios en las unidades experimentales. La primera alimentación se suministró a las cuatro



horas post-infección y luego cada cuatro horas con 30  $\mu$ L de la cepa bacteriana ILI autoclavada (Cobo & Cedeño, 2007). El ensayo se realizó en una sala experimental de las instalaciones del CENAIM-ESPOL (Figura 5) y tuvo una duración de 48 horas, luego de lo cual se contó los nauplios sobrevivientes y se comparó la supervivencia entre tratamientos. Posteriormente, se realizó otras dos pruebas de desafío adicionales para confirmar la repetibilidad del rango de mortalidad conteniendo el valor del 50%, provocado por la dosis de bacteria patógena escogida en la primera prueba de desafío.

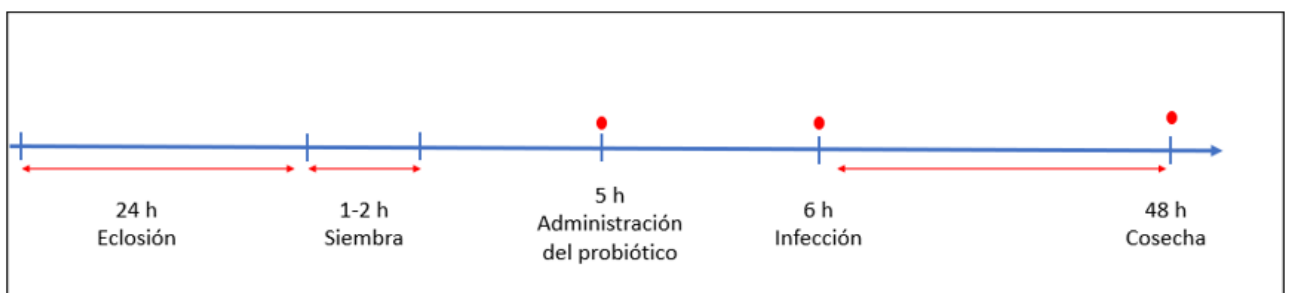


*Figura 5. Ensayo experimental del LC50.*

### **2.2.1.2 Prueba de desafío de artemias suplementadas con probióticos para camarón**

Una vez determinada la concentración de la cepa bacteriana patógena que mató a aproximadamente el 50% de las artemias, se realizó una prueba de desafío, donde las artemias fueron suplementadas con los probióticos escogidos para la prueba, y posteriormente desafiadas con la cepa patógena Ba94C2. Para esta prueba se siguió realizando una variación de la metodología descrita por (Laranja, y otros, 2018). De igual manera se trabajó con artemias de alto nivel de bioseguridad (cistos de artemia IL, INVE Lote N°2120233228).

Se realizó una siembra directa de 0,5 g de quistes de artemia en un cono de eclosión con volumen final de 1 L de agua de mar filtrada por UV y autoclavada previamente (FASW). El cono se mantuvo con iluminación y aireación constante durante 24 horas antes de enjuagar y re suspender en 10 litros de FASW para un mejor conteo. El conteo de nauplios se realizó en pipetas de vidrio de 1 ml y se completó el volumen restante alcanzando un total de 30 ml. Dado que, el animal no tiene desarrollado completamente el sistema digestivo hasta que cambia de estadio a Nauplio 2 (Bowen & Sterling, 1978), la administración del probiótico se realizó a las 5 horas después de la siembra en los tubos Falcon (50 mL, unidad experimental). Los 6 probióticos comerciales fueron preparados de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se incluyó un control negativo, donde las artemias solo fueron infectadas con la cepa patógena, no recibiendo suplementación de probióticos. Cada tratamiento tuvo 6 réplicas. La infección se realizó 6 horas después de la administración del probiótico. Se realizó el conteo de supervivencia 48 horas después de la infección (Figura 6).



*Figura 6. Esquema cronológico de la prueba de desafío de artemias suplementadas con probióticos*

### **2.2.2 Pruebas de exclusión competitiva de probióticos comerciales contra cepa patógena para camarón**

Los seis probióticos comerciales fueron utilizados para la prueba *in vitro* de exclusión competitiva frente a la cepa patógena Ba94C2. La cepa patógena fue

sembrada en cajas de agar TSA al 2% de NaCl, incubada por 18 horas a 30 °C. Posteriormente, una colonia fue transferida a 5 ml de medio TSB al 2% de NaCl. Se incubó en baño María por 4 horas a 30°C con agitación constante. La concentración de la bacteria patógena fue ajustada a una concentración de 10<sup>5</sup> UFC/ml utilizando el estándar 0.5 de McFarland. Se inoculó 100 µl de bacteria patógena en cada caja con agar con medio Mueller-Hinton y se dispersó con hisopo estéril. Por otro lado, los probióticos comerciales fueron activados el día anterior en placas Petri utilizando medio de cultivo Agar Trypticase Soya (TSA), e incubadas por 18 horas a 30°C. Del césped bacteriano se colectó un cúmulo de bacterias probióticas y se colocó sobre el patógeno. Las bacterias probióticas y patógena fueron incubadas a 30°C por 24 horas, registrando los halos de inhibición de las bacterias probióticas frente a la bacteria patógena. Finalmente, se realizó un análisis de regresión y correlación lineal para comparar la efectividad de la prueba de desafío con artemias (supervivencia de las artemias luego de la infección con la cepa bacteriana patógena) con los resultados del análisis *in vitro* de exclusión competitiva (diámetro de inhibición) de los probióticos comerciales contra la cepa bacteriana patógena utilizados en ambas pruebas.

### **2.2.3 Análisis de factibilidad de las pruebas en artemia para identificar probióticos para camarón**

Se valoró la factibilidad de la experimentación *in vivo* de desafío a artemias para evaluar la calidad de los probióticos comerciales para camarón. Los resultados fueron comparados con los siguientes tres análisis utilizados tradicionalmente para evaluar la calidad de probióticos para camarón: a) pruebas de desafío a larvas de camarón que han recibido administración de probióticos y luego son desafiadas con una bacteria patógena, b) pruebas de desafío con juveniles de camarón que han recibido administración de probióticos y luego son desafiados con una bacteria patógena y c) prueba de exclusión competitiva de los probióticos contra una bacteria patógena. La valoración de la factibilidad de los tres análisis tradicionales y el propuesto en este estudio se realizó usando los

criterios propuestos por (Nuñez & Mora, 2019), mediante el cual se valora cuantitativamente las metodologías de análisis usadas para evaluar la efectividad de probióticos.

Estos criterios de valoración fueron:

- a) Costo, donde se valoró mediante indicadores cuantitativos la cantidad de recursos necesarios para realizar los análisis. Estos indicadores fueron: equipos, reactivos/materiales, agua, aireación, alimentación, espacio para la experimentación, organismos (incluyó disponibilidad) y personal (cantidad y entrenamiento calificado).
- b) Tiempo, que valoró tanto la duración de la experimentación como el tiempo que toma obtener los resultados del análisis.
- c) Calidad de los resultados, que valoró el grado de extrapolación de los resultados de los análisis a camarón de cultivo.
- d) Facilidad de ejecución, que valoró la viabilidad de ejecución del análisis, considerando los recursos empleados y la disponibilidad de ejecución de estos análisis en los laboratorios de servicios para la industria acuícola.

Mediante una entrevista, los criterios fueron valorados por un productor, un investigador y un técnico local de laboratorio de análisis de servicios para la industria acuícola. Estos valores y las ponderaciones propuestas por (Nuñez & Mora, 2019) para cada criterio fueron promediados.

Los cuatro análisis (tres análisis tradicionales y el propuesto de prueba de desafío con artemias) fueron valorados aplicando los criterios mencionados. Para el caso del criterio de costo (cantidad de recursos) se evaluaron los ocho indicadores (equipos, reactivos/materiales, agua, aireación, alimentación, espacio para la experimentación, organismos y personal). La valoración se realizó con los valores de 0 a 5. Para el caso de los criterios de costo, tiempo, la valoración se efectuó con la siguiente escala de calificación: 0 (Muy alta), 1 (Alta), 2 (Media), 3 (Baja), 4 (Muy baja) y 5 (No se requiere). Los criterios de facilidad de ejecución y calidad de los resultados fueron valorados con otra escala de calificación: 0 (No se requiere), 1 (Muy baja), 2 (Baja), 3 (Media), 4 (Alta) y 5 (Muy alta).

Luego de calificar a los indicadores y ponderarlos con el valor promedio obtenido en cada criterio se realizó la sumatoria para cada tipo de análisis, siendo este total el valor de factibilidad para cada caso. Sumatorias con valores más altos indicaron una mayor factibilidad del análisis para determinar la efectividad de probióticos para camarones.

### **2.3 Protocolo de evaluación de probióticos en camarones peneidos utilizando la *Artemia franciscana* como organismo modelo.**

Finalmente, en la tercera fase, se elaboró un protocolo para la identificación de probióticos para camarones usando artemias. Este protocolo incluyó la descripción de estudios adicionales requeridos para respaldar la hipótesis de que las artemias puedan ser utilizadas como herramienta para la búsqueda de probióticos comerciales.

# CAPÍTULO 3

## 3. Resultados y Análisis

### 3.1 Uso de la *Artemia* como organismo modelo para salud humana y animal

La búsqueda bibliográfica permitió determinar que la artemia es ampliamente utilizada como organismo modelo para varios tipos de estudios, incluyendo la salud humana (Tabla 1). Con respecto a los estudios ecotoxicológicos, la *A. franciscana* es empleada para determinar el impacto ambiental a la cadena alimentaria acuática (Cavion, y otros, 2020). Los ensayos de toxicidad con artemia también han sido sugeridos como reemplazo más barato y sencillo que el ensayo *in vitro* del MTT 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Rajab, Ramazani, Hamidi, & Naji, 2015) para determinar la citotoxicidad de compuestos y sustancias.

La artemia es también muy utilizada para estudios de cribado en acuicultura, como el de Chan et al. 2021, donde fue usada para extrapolar a peces los resultados de toxicidad. También se ha utilizado a la artemia para el descubrimiento de diferentes compuestos bioactivos como potenciales probióticos para *P. monodon* y *C. crassum* (Tabla 2). Por su parte, (Laranja, y otros, 2018) buscaron determinar si las concentraciones mayores de poli-beta-hidroxibutirato (PHB) amorfo acumulado en una cepa de *Bacillus* ofrecían protección en artemia desafiada a una cepa patógena de *V. campbelli*, obteniéndose resultados favorables, que posteriormente fueron aplicados a postlarvas de *P. monodon* para mejorar su sistema inmune, e incrementar la supervivencia, crecimiento y robustez. Las tablas 1 y 2 resumen algunos resultados de varios estudios donde la artemia ha sido usada como organismo modelo para diferentes áreas, incluyendo la salud humana y animal.

Tabla 1. Estudios de ecotoxicidad donde se utiliza a la *Artemia franciscana* como organismo modelo.

Objetivo del estudio	Organismo o Ecosistema de interés para el cual se extrapola los resultados	Compuestos evaluados	Principales resultados	Fuente
Ecotoxicidad. Comparar la efectividad del ensayo in vivo de letalidad usando <i>Artemia salina</i> comparado con el ensayo <i>in vitro</i> de MTT para evaluar la citotoxicidad de diferentes clases de nanopartículas.	Humanos y ambiente	Nanopartículas: inorgánicas, lipídicas, poliméricas y materiales usados para el transporte de drogas a distintos órganos humanos (Atorvastatina, Ibuprofeno, Repaglinida, Ciclosporina, Azitromicina)]	El ensayo <i>in vivo</i> de letalidad con artemia cuantificó con exactitud la citotoxicidad de las nanopartículas evaluadas, comparado con el ensayo <i>in vitro</i> de MTT.	Rajabi J et al. (2015)
Ecotoxicidad. Determinar el potencial impacto ambiental en ecosistemas acuáticos provocado por los materiales basados en grafeno utilizando <i>Artemia franciscana</i> como organismo modelo para evaluar las diferentes reacciones producto de altas concentraciones.	Cadena alimentaria acuática	Óxido de grafeno	Los ensayos sobre toxicidad del óxido de grafeno muestran un bajo impacto negativo sobre adultos de <i>A. franciscana</i> . La acumulación en poblaciones naturales de artemia puede provocar efectos tóxicos en otros organismos, y como consecuencia bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria.	Cavion, F et al. (2020).

<p>Compuestos bioactivos. Desarrollar un método sencillo de exploración para la detección y aislamiento de compuestos naturales activos con propiedades farmacológicas provenientes de plantas superiores usando como cribado a la <i>Artemia franciscana</i>.</p>	<p>Humanos</p>	<p>Podofilotoxina, cloruro de berberina, sulfato de estricnina, digitalina, sulfato de quinidina, sulfato de efedrina, estrofantina, arbutina, cafeína, timol, atropina SO<sub>4</sub>, santonina</p>	<p>La <i>A. franciscana</i> es una herramienta económica y sencilla de manejar como cribado en estudios sistemáticos que detecten y aislen compuestos activos provenientes de plantas. Se recomienda su uso en farmacognosia y fitoquímica.</p>	<p>Meyer, B. et al. (1982).</p>
<p>Ecotoxicidad. Examinar si la artemia en bioensayos produce resultados similares a ensayos de toxicidad ictiológica. Se prueba la toxicidad relativa de extractos tóxicos de moluscos <i>Goniobranchus splendidus</i> para validar su uso como herramienta de cribado preliminar para vertebrados acuáticos.</p>	<p>Pez damisela azul <i>Chromis viridis</i></p>	<p>Extractos tóxicos de moluscos <i>Goniobranchus splendidus</i></p>	<p>Los extractos tóxicos para artemia también lo son para el pez damisela azul. Extractos no tóxicos para la artemia también pueden afectar al pez. La artemia indica razonablemente la toxicidad potencial de diferentes compuestos para peces.</p>	<p>Chan, W. et al. (2021).</p>
<p>Toxicidad ambiental. Utilizar la artemia como modelo para la evaluación de políticas de manejo de recursos costeros y toma de decisiones.</p>	<p>Ecosistemas acuáticos</p>	<p>No aplica</p>	<p>La artemia es utilizada como modelo, para evaluar políticas de manejo de recursos costeros para toma de decisiones de protección de especies costeras</p>	<p>De Los Ríos &amp; Gajardo, (2004).</p>



---

<p>Seleccionar extractos provenientes de plantas nativas de la India para usarlos en terapias contra el cáncer en humanos.</p>	<p>Células cancerígenas</p>	<p><i>Physalis minima,</i> <i>Allium odoratum,</i> <i>Tabebuia chrysantha,</i> <i>Chentotecha.</i> <i>longilamina, Impatiens</i> <i>balsamina</i></p>	<p>Se realizó una prueba de LC50 en nauplios de artemia. Seis extractos de plantas nativas de la India presentaron potencial biológico contra el cáncer.</p>	<p>Chasanah, U., et al. (2012)</p>
--	-----------------------------	---	--	------------------------------------

---

Tabla 2. Estudios en el área de acuicultura donde se utiliza a la *Artemia franciscana* como organismo modelo en la extrapolación de resultados.

Objetivo del estudio	Organismo o Ecosistema de interés para el cual se extrapola los resultados	Compuestos evaluados	Principales resultados	Fuente
Bioencapsuladores para acuicultura. Evaluar el modo de acción de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> según su efecto nutricional y probiótico en un sistema modelo utilizando artemia gnotobiótica.	Granjas acuícolas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Dunaliella tertiolecta</i>	En combinación con alimento vivo de diferente calidad, las bacterias muertas favorecieron la supervivencia en artemia, sin embargo, no mostraron un efecto significativo en la talla individual. En contraparte, cuando se administró bacteria viva hubo una mejora en el crecimiento de los organismos. Estos organismos son los más recomendables para utilizar como vector para transferir probióticos a larvas de diferentes especies objetivos.	Marqués, A. et al. (2005).
Patógenos en acuicultura. Determinar si los compuestos producidos por bacterias del clado <i>Roseobacter</i> , <i>Photobacteriaceae</i> y	Granjas acuícolas	Compuestos producidos por bacterias	Las bacterias del género <i>Roseobacter</i> , productoras de TDA son consideradas como un grupo potencialmente probiótico en acuicultura, sin embargo, <i>Actinobacteria</i> ,	Neu, A. K., et al. (2014).

<p><i>Vibrionaceae</i> causan toxicidad en los organismos eucariotas <i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Artemia sp.</i></p>			<p><i>Pseudoalteromona</i>, <i>Photobacteriaceae</i> y <i>Vibrionaceae</i> deben usarse con precaución</p>	
<p>Biocontrol en acuicultura. Determinar si las concentraciones mayores de PHB amorfo acumulado en la cepa <i>Bacillus</i> J47 tenían efectos protectores sobre la <i>A. franciscana</i> cultivada en ambiente gnotobiótico y desafiada posteriormente a una cepa patógena de <i>Vibrio campbellii</i>.</p>	<p><i>Penaeus monodon</i></p>	<p>Poli-beta-hidroxibutirato amorfo</p>	<p>La cepa J47 con 48 horas de cultivo y un contenido aproximado del 55% de PHB amorfo mostró un incremento significativo en la supervivencia de las artemias, esto ayudó a que posteriormente se pruebe la cepa en <i>P. monodon</i> con resultados favorables en crecimiento, robustez y supervivencia.</p>	<p>Laranja, J., et al. (2018).</p>
<p>Probióticos para acuicultura. Evaluar una potencial cepa probiótica (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) para juveniles de cangrejo azul con un screening previo en artemia gnotobiótica. Las pruebas realizadas fueron: Tiempo de colonización y Prueba de Letalidad al 50% para infección con <i>V. harveyi</i></p>	<p><i>Callinectes sapidus</i></p>	<p><i>Bacillus amyloliquefaciens</i></p>	<p>Se demostró que la cepa L11 identificada previamente como <i>B. amyloliquefaciens</i> y probada en artemia, mostró un aumento significativo en la supervivencia de larvas de cangrejo azul (42 ± 1%) frente a las que fueron desafiadas con <i>V. harveyi</i> (12 ± 1 %)</p>	<p>Azrin, N., et al. (2019).</p>

Inducir la expresión de esta proteína Hsp70 mediante el uso de Hspi para evaluar la protección contra <i>Vibrio</i> y comparar la respuesta del sistema inmune a varios factores estresantes biológicos tanto en artemia como en larvas de camarón.	Larvas de camarón	Tex-OE (Hspi), proveniente de un extracto de la fruta de la tuna ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	El producto Hspi desencadena una síntesis de Hsp70 incluso en animales modelo como la artemia. Con esto se demuestra que el producto actúa de manera profiláctica para brindar protección contra vibrios patógenos.	Baruah, K., et al. (2014)
Patógenos en acuicultura. Evaluar de manera <i>in vitro</i> el efecto antimicrobiano de diferentes productos comerciales usados para combatir enfermedades de tipo bacteriano en larvas de camarón	<i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i>	5 probióticos comerciales, 9 ácidos orgánicos y 2 aceites esenciales	Se realizó un screening de las cepas patógenas en nauplios de artemia para posteriormente realizar pruebas de desafío en post larvas de <i>L. vannamei</i> . De 16 productos usados en el mercado, sólo 3 fueron efectivos para controlar a las cepas patógenas	Sotomayor, M. et al. (2019).
Bioencapsuladores para acuicultura. Demostrar la aplicación de la <i>A. franciscana</i> como bioencapsulador para suministro de probióticos en juveniles de peces y camarones de cultivo.	Juveniles de peces y camarones de cultivo	<i>Streptomyces</i> sp. Cepa RL8	Tras 24 horas de enriquecimiento a los nauplios de artemia, todos los grupos se desafiaron con una cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> . Los nauplios que fueron previamente enriquecidos con la cepa probiótica RL8 mostraron una supervivencia significativamente mayor	Ossorio, P. (2017).

---

(88,7% y 86,25%) en comparación al control (57,5%).

---

Epigenética. Utilizar a la <i>Artemia franciscana</i> como organismo modelo para evaluar mecanismos epigenéticos de control del desarrollo y heredabilidad de fenotipos deseables para especies acuícolas.	Especies acuáticas	No aplica	Al exponer a una población partenogenética de artemias a un desafío con <i>V. campbellii</i> , las tres generaciones sucesivas mostraron alta resistencia en un desafío posterior con la misma cepa, característica replicable en otras especies.	Norouzitallab, P. (2015).
--	--------------------	-----------	---	---------------------------

---

### 3.2 Factibilidad de la prueba de desafío con artemia para evaluar la efectividad de probióticos para camarón

#### 3.2.1 Experimentación de exploración para la prueba del concepto

##### 3.2.1.1 Determinación de la concentración letal de la cepa patógena

Se determinó que la concentración de la cepa patógena que mató aproximadamente al 50% de las artemias en las unidades experimentales fue  $10^4$  UFC/mL (Tabla 3). Las dos pruebas de desafíos posteriores confirmaron que la concentración mencionada de la cepa patógena era la más adecuada para realizar la posterior prueba de desafío (Tabla 3).

*Tabla 3. Resultados de la prueba de letalidad media (LC50) de artemias infectadas con una cepa patógena de V. parahaemolyticus.*

No. de la prueba de desafío	Concentración de infección con la cepa patógena (UFC/mL)	Supervivencia de artemias (%)	
		Límite inferior del IC <sub>95</sub>	Límite superior del IC <sub>95</sub>
Prueba de desafío 1	$1.0 \times 10^2$	62.0	76.8
	$1.0 \times 10^3$	57.4	64.8
	$1.0 \times 10^4$	48.8	61.2
	$1.0 \times 10^5$	28.3	55.1
Prueba de desafío 2	$1.0 \times 10^4$	43.3	51.2
Prueba de desafío 3	$1.0 \times 10^4$	42.2	53.3

IC<sub>95</sub> = Intervalo de confianza al 95%

### 3.2.1.2 Prueba de desafío en artemias suplementadas con probióticos para camarón

Tras desafiar a las artemias que previamente habían recibido suplementación con los probióticos comerciales se obtuvo las supervivencias descritas en la tabla 4. Siendo el probiótico comercial 6 el que mostró mejores resultados de supervivencia y los probióticos comerciales 2 y 4 los que mostraron las supervivencias más bajas tras el desafío.

Tabla 4. Resultados de supervivencia de la prueba de desafío en artemias suplementadas con probióticos comerciales e infectadas con cepa patógena.

Probiótico comercial	Supervivencia de artemias (%)
Probiótico 1	31.1 ± 8.4
Probiótico 2	12.2 ± 1.9
Probiótico 3	34.4 ± 3.8
Probiótico 4	15.6 ± 1.9
Probiótico 5	31.1 ± 5.1
Probiótico 6	68.9 ± 7.7

### 3.2.2 Pruebas de exclusión competitiva de probióticos comerciales contra cepa patógena para camarón

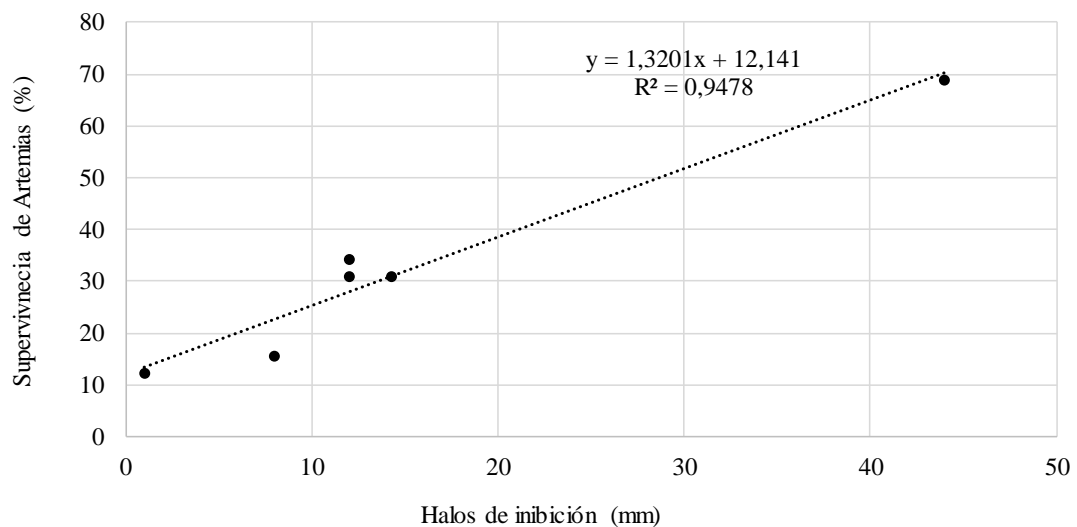
Los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* de exclusión competitiva de los probióticos comerciales contra la bacteria patógena mostraron consistencia con los resultados de la prueba *in vivo* de desafío de las artemias (Tabla 5). El probiótico 6 y los probióticos 2 y 4 mostraron la mayor y menores inhibiciones frente a la bacteria patógena, respectivamente.

Tabla 5. Comparación entre los resultados de la prueba de exclusión competitiva y la supervivencia obtenida en la prueba de desafío en artemias suplementadas con probióticos.

Probióticos suplementados a las artemias	Inhibición de cepa patógena (mm)
Probiótico 1	14.2
Probiótico 2	1.0
Probiótico 3	12.0
Probiótico 4	8.0

Probiótico 5	12.0
Probiótico 6	44.0

Los resultados de la regresión lineal confirman que, para las condiciones utilizadas en la experimentación existió una correlación lineal significativa ( $r = 0.97$ ,  $p = 0.01$ ) entre la supervivencia de las artemias suplementadas con los probióticos comerciales y posteriormente desafiadas con la cepa patógena, y los resultados de la prueba *in vitro* de exclusión competitiva (Figura 7).



*Figura 7. Regresión lineal entre supervivencia de las artemias suplementadas con seis probióticos comerciales e infectada con una cepa bacteriana patógena para camarón y diámetro de inhibición de los probióticos comerciales contra la cepa bacteriana patógena.*



# CAPÍTULO 4

## 4. Conclusiones y Recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

#### 4.1.1 Análisis de factibilidad de las pruebas en artemia para identificar probióticos para camarón

Los criterios de recursos y confiabilidad de los resultados obtuvieron las más altas ponderaciones, que en promedio equivalió al 30% cada uno (Tabla 6). Por otra parte, los criterios correspondientes al tiempo de obtención de los resultados y facilidad de ejecución tuvieron ambos una calificación equivalente al 20% (Tabla 6).

*Tabla 6. Valoración (en porcentaje) de criterios de factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar efectividad de probióticos comerciales, obtenida mediante entrevistas y ponderaciones propuestas por (Nuñez & Mora, 2020).*

<b>Criterio de factibilidad</b>	<b>Entrevistado No. 1</b>	<b>Entrevistado No. 2</b>	<b>Entrevistado No. 3</b>	<b>Núñez &amp; Mora</b>	<b>Promedio</b>
Recursos	30	40	30	20	30
Tiempo en obtener resultados	20	20	30	10	20
Facilidad de ejecución	20	15	15	30	20
Calidad de resultados	30	25	25	40	30
Total	100%	100%	100%	100%	100%

Al utilizar estos criterios para valorar la factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar efectividad de los probióticos comerciales se obtuvo como resultado que las pruebas de desafío en artemia son un 70% factible, siendo superior a lo determinado con los tres métodos tradicionales de evaluación de probióticos (Tabla 7).

Tabla 7. Matriz de factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar la efectividad de probióticos comerciales. Se realiza la comparación entre tres métodos tradicionales (pruebas de desafío en larvas de camarón, prueba de desafío en juveniles de camarón, y prueba in vitro de exclusión competitiva) y la prueba de desafío con artemias propuesta en este trabajo.

Criterio de evaluación	Indicadores cuantificables	Ponderaciones	Ponderaciones Indicadores cuantificables	Valores				Factibilidad (valores ponderados según las ponderaciones de indicadores cuantificables)			
				Prueba de desafío con larvas de camarón	Prueba de desafío con juveniles de camarón	Prueba de exclusión competitiva	Prueba de desafío con artemia	Prueba de desafío con larvas de camarón	Prueba de desafío con juveniles de camarón	Prueba de exclusión competitiva	Prueba de desafío con artemia
Recursos	Agua	30%	4	2	0	5	4	1.6	0.0	4.0	3.2
	Disponibilidad de organís		3	1	2	5	4	0.6	1,2	3.0	2.4
	Aireación		3	2	0	5	4	1.2	0.0	3.0	2.4
	Espacio para la experimentación		4	2	0	4	4	1.6	0.0	3.2	3.2
	Alimentación		4	0	1	5	5	0.0	0,8	4.0	4.0
	Reactivos/Materiales		4	1	1	2	3	0.8	0,8	1.6	2.4
	No. de personas		4	0	1	4	5	0.0	0,8	3.2	4.0
	Nivel de entrenamiento		4	3	4	2	3	2.4	3,2	1.6	2.4
Tiempo en obtener resultados	Duración de experimentación	20%	20	4	0	4	4	16.0	0.0	16.0	16.0
Facilidad de ejecución	Facilidad de ejecución	20%	20	0	0	2	3	0.0	0.0	8.0	12.0
Calidad de los resultados	Extrapolación a camarón	30%	30	5	5	2	3	30.0	30.0	12.0	18.0
<b>Factibilidad de cada análisis para evaluar efectividad de probióticos comerciales</b>								<b>54.2 %</b>	<b>36.8 %</b>	<b>59.6 %</b>	<b>70.0%</b>

La valoración se realizó entre 0 a 5. Para el caso de los criterios de costo y tiempo, la valoración se efectuó con la siguiente escala de calificación: 0 (Muy alta), 1 (Alta), 2 (Media), 3 (Baja), 4 (Muy baja) y 5 (No se requiere). Los criterios calidad de los resultados y facilidad de ejecución fueron valorados con la escala de calificación: 0 (No se requiere), 1 (Muy baja), 2 (Baja), 3 (Media), 4 (Alta) y 5 (Muy alta).

Para el caso de la evaluación de probióticos utilizando la artemia, el criterio de *Recursos* resultó el indicador cuantificable con mejor puntaje (24%), comparable con el puntaje en este criterio para la prueba *in vitro* de exclusión competitiva (24%, Figura 8). En el caso de la prueba *in vitro*, aunque se utiliza reactivos, materiales y personal calificado, la técnica no implica tantos recursos de agua, organismos y espacio, y no se necesita gastar en alimentación; en tanto que, aunque se necesita personal calificado, no se requiere un número alto de personas para realizar el análisis. En el caso de la evaluación de probióticos utilizando la artemia, el puntaje alto en el criterio *Recursos* obedece a que además de que no se requiere tantos recursos de agua, disponibilidad de organismos, aireación, espacio y alimentación, no se requiere gran cantidad de reactivos o materiales. Además, se requiere un mínimo de personal. El método tradicional que le sigue en porcentaje de factibilidad es la prueba *in vitro* de exclusión competitiva. Sin embargo, por tratarse de una prueba *in vitro* sólo alcanza el 59,6% de factibilidad, con una *confiabilidad de los resultados* del 12%, en comparación a los otros métodos tradicionales de desafío, ya sea que se realice en larvas o en juveniles de camarón, para los cuales el porcentaje ponderado en esa categoría es del 30%. Al respecto, aunque estas pruebas tradicionales de desafío de patógenos en larvas y juveniles de camarón presentaron un 30% de confiabilidad en el criterio de extrapolación de resultados a camarón, el resultado global fue inferior a la evaluación de probióticos utilizando la artemia. Esto se explica por los bajos valores de factibilidad obtenidos en las pruebas de desafío con juveniles y larvas para el criterio de *Recursos*, así como en la *Facilidad de ejecución*.

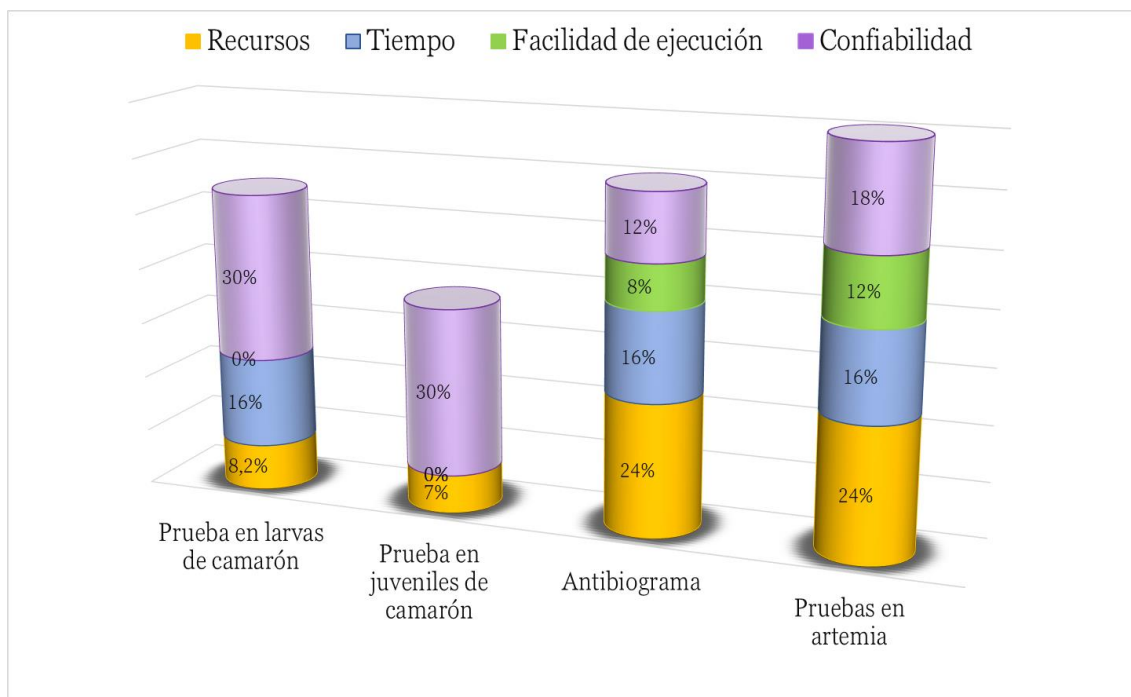


Figura 8. Factibilidad de las metodologías de análisis para evaluar la efectividad de probióticos comerciales.

#### 4.1.2 Protocolo de evaluación de probióticos en camarones peneidos utilizando la *Artemia franciscana* como organismo modelo.

Al avanzar en la revisión bibliográfica sobre el uso de la *A. franciscana* como organismo modelo para acuicultura, se detectó que no hay metodologías estandarizadas para evaluar e identificar probióticos utilizando a las artemias como organismo modelo. Dado que, el uso de artemias es factible para identificar potenciales probióticos y que, la técnica resulta más sencilla y menos costosa, la prueba con artemias puede ser usada especialmente en una etapa inicial de cribado cuando se requiere evaluar muchos candidatos a probióticos. Por tal motivo, se propone la siguiente metodología para la identificación de probióticos para camarones peneidos. La figura 9 esquematiza los procedimientos básicos para identificar potenciales cepas probióticas para camarones peneidos.

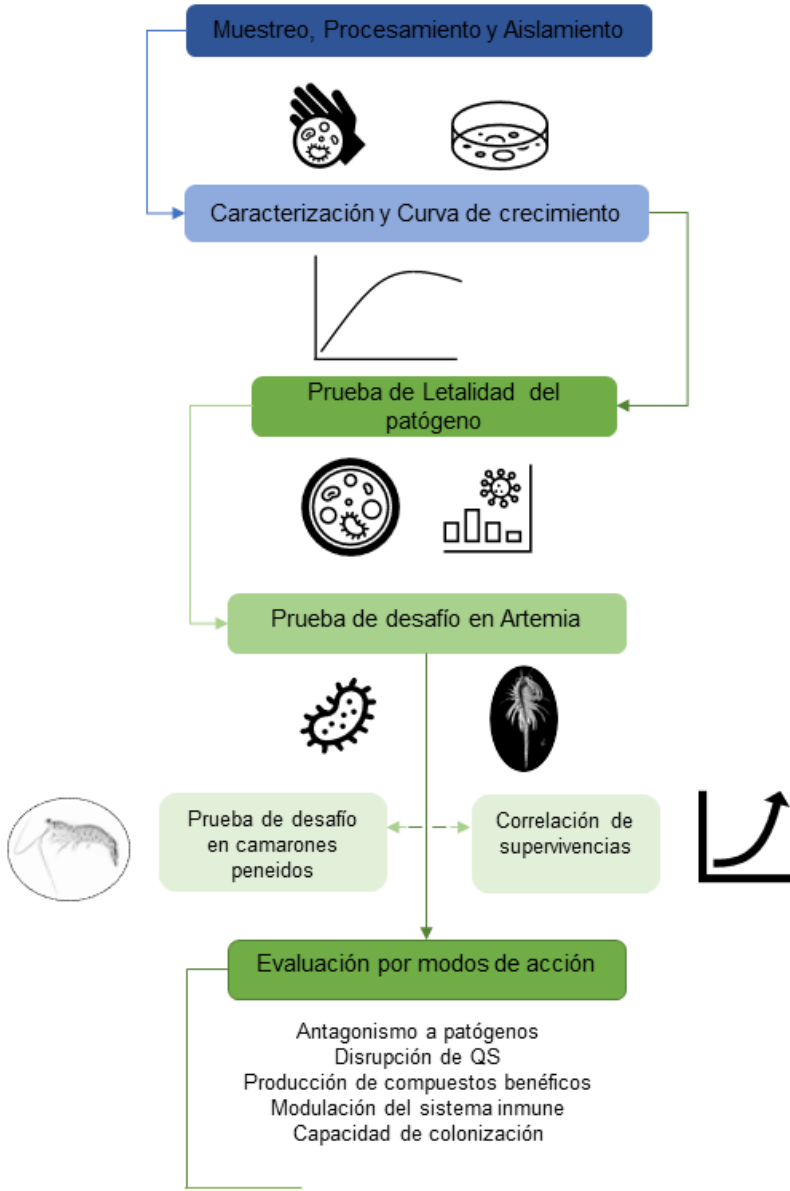
Luego del muestreo, procesamiento y aislamiento de las cepas candidatas, se deberá realizar la caracterización de la cepa y curva de crecimiento para determinar las concentraciones a ser utilizadas posteriormente. Posteriormente,

se deberá realizar una prueba de letalidad del patógeno escogido, a fin de determinar la concentración que mate al 50% de las artemias. Luego, se sugiere trabajar directamente con la prueba de desafío en artemia, suplementándolas previamente con las cepas potencialmente probióticas. Este periodo de suplementación, así como el de desafío son de pocas horas (Capítulo 3), por lo que en un periodo corto de tiempo se obtendrá resultados.

Este estudio tuvo como finalidad proponer una metodología que utilice un organismo alternativo al camarón para evaluar compuestos que mejoren su salud. La propuesta es una alternativa práctica y económica, que puede permitir la evaluación de una cantidad considerable de cepas potencialmente probióticas. Para elaborar esta propuesta se realizó una revisión bibliográfica acerca de la literatura donde se utiliza a la artemia para extrapolar sus resultados a organismos superiores. Se destaca su uso en estudios de ecotoxicidad, descubrimiento de compuestos bioactivos para organismos acuáticos y salud humana. Principalmente, la literatura es consistente en sugerir a la artemia como organismo modelo para extrapolar los resultados, no sólo a otras especies acuáticas, sino también a la cadena alimenticia, e incluso aplicables a la salud humana.

Como segunda parte de este estudio, se comprobó con una prueba *in vivo*, parte de la metodología propuesta para en el protocolo. Es importante mencionar que, los resultados en artemia fueron consistentes con la prueba *in vitro* tradicional de exclusión competitiva (correlación lineal significativa,  $r = 0.97$ ,  $p = 0.01$ ), demostrando de esta manera, que es posible utilizar esta metodología con resultados confiables en artemia. Además, con el análisis de factibilidad para el uso de la artemia en estas pruebas con probióticos, se determinó que el uso de la artemia en una prueba de desafío posee un 70% de factibilidad, cantidad que fue superior a los otros ensayos tradicionales. Se concluye que utilizar artemia para la identificación de probióticos para camarones peneidos es factible.

**Diseño de un protocolo para la identificación de probióticos en camarones peneidos utilizando la *Artemia franciscana* como organismo modelo.**



*Figura 9. Diseño de un protocolo para la identificación de probióticos en camarones peneidos utilizando la A. franciscana como organismo modelo.*

## 4.2 Recomendaciones

Las pruebas de desafío constituyen una parte fundamental para probar la efectividad de los compuestos bioactivos, como probióticos para camarón. Sin embargo, los altos costos de experimentación son una limitante para los investigadores. Por eso, a través del protocolo propuesto se espera que se evalúen de manera efectiva bacterias potencialmente probióticas. En el presente trabajo se demostró la factibilidad de utilizar a la *Artemia franciscana* como cribado previo, por lo que es importante que, si se desea evaluar o identificar un potencial probiótico se sigan los procesos presentados en este estudio. Adicional, se incluyen algunas recomendaciones:

- Para las pruebas de desafío llevadas en artemia no es necesario utilizar aireación complementaria, ya que podría causar mortalidad y alterar los resultados finales.
- Es importante destacar que los resultados propuestos en este estudio constituyen un primer paso, por lo que, la propuesta de utilizar a la artemia para identificar probióticos para camarón tendrá que ser validada con un análisis de correlación entre las supervivencias de las pruebas de desafío en artemias con la de camarones. Los modos de acción de los potenciales probióticos tendrán que ser validados con las metodologías descritas en la literatura científica.
- Esta metodología puede ser usada para investigar otra clase de compuestos bioactivos, tales como derivados de plantas, destinados a mejorar la salud del camarón.

La presente investigación está enmarcada en el proyecto de investigación PIC-21-INE-ESPOL-004 Biotecnología azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando Vibrios patógenos, auspiciado por el Programa INEDITA de SENESCYT.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abud, M. J., & Barracco, M. A. (2008). *Patología e inmunología de camarones Penaeidos*. Panamá: New Concept Publications, Inc.
- AllTech. (20 de Abril de 2021). *Alltech.com*. Obtenido de <https://go.alltech.com/es/sinbioticaecuador?hsCtaTracking=e5682ab7-c3c9-484c-b91f-b9f04f58a443%7Cd64f866d-7a7d-4345-a3b7-023aa05e51aa>
- Alvarez, P. O. (2017). Importancia de la artemia en la producción acuícola. En P. O. Alvarez, *Bioencapsulación de Streptomyces sp. RL8 en nauplios de Artemia franciscana y estudios de su resistencia contra Vibrio patógeno* (pág. 6). Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas-Tesis.
- Amaro, C., & Biosca, E. (2021). *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 212-215.
- Azrin, N., Yuzine, E., Ina-Salwany, M., & Karim, M. (2019). The efficacy of the potential probiont *Bacillus amyloliquefaciens* Strain L11 in protecting *Artemia nauplii* and Blue Crab Juveniles against *Vibrio harveyi* infection. *J Pure Appl Microbiology*, 923-931.
- Bai, F., Han, Y., Chen, J., & Zhang, X.-H. (2007). Disruption of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by the AiiA protein of *Bacillus thuringiensis*. *Aquaculture*, 36-40.
- Baruah, K., Norouzitallab, P., Linayati, L., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2014). Reactive oxygen species generated by a heat shock protein (Hsp) inducing product contributes to Hsp70 production and Hsp70-mediated protective immunity in *Artemia franciscana* against pathogenic vibrios. *Developmental & Comparative Immunology*, 470-479.
- BCE. (31 de diciembre de 2021). *Estadísticas del Sector Externo: Productos Principales*. Obtenido de Banco Central del Ecuador: <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/LEMensual.js>
- p



- Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C. H., & Pfeifer, B. A. (2018). Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design. *Materials*, 1086.
- Bossier, P. (2015). Strategies for microbial community management. *Impact of prebiotics and probiotics on animal health and production* (pág. 9). Guayaquil: Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.
- Bowen, & Sterling. (1978). Biología y Ecología de la Artemia parthenogenetica. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 593-595.
- Castaño, A., Cantarino, M., Castillo, P., & Tarazona, V. (1996). Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and in vivo LC50 rainbow trout bioassay. *Chemosphere*, 2141-2157.
- Cavion, F., Fusco, L., Sosa, S., Manfrin, C., Alonso, B., Zurutuza, A., . . . Pelin, M. (2020). Ecolotoxicological impact of graphene oxide: toxic effects on the model organism Artemia franciscana. *Environmental Science Nano*, 3605-3616.
- CNA. (2020). *Reporte de Exportaciones Ecuatorianas Totales*. Guayaquil.: Cámara Nacional de Acuicultura.
- Cobo, L., & Cedeño, R. (2007). Uso de la bacteria *V. alginolyticus*, cepa ILI, como probiótico en la larvicultura del camarón *L. vannamei*. *AquaCultura Técnica*, 1-3.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Wiele, T. V., Sorgeloos, P., . . . Verstraete, W. (2006). The bacterial storage compound poly- $\beta$ -hydroxybutyrate protects Artemia franciscana from pathogenic Vibrio campbellii. *Environmental Microbiology*, 445-452.
- Fields, S., & Johnston, M. (2005). Whither Model Organism Research? *Science*, 1885-1886.
- Green, A. J., Sánchez, M. I., Amat, F., Figuerola, J., Hontoria, F., Ruiz, O., & Hortas, F. (2005). Dispersal of Invasive and Native Brine Shrimps Artemia (Anostraca) via Waterbirds. *Limnology and Oceanography*, 737-742.
- Hai, N. V., Buller, N., & Fotedar, R. (2010). Encapsulation capacity of Artemia nauplii with customized probiotics for use in the cultivation of western king

- prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research*, 893-903.
- Hong, X. L. (3 de marzo de 2016). Avances en la investigación de la Necrosis hepatopancreática aguda. *Aquaculture International*, 577-593.
- Irasema, E., Luis-Villaseñor, Macías-Rodríguez, M. E., Gómez-Gil, B., Irasema E. Luis-Villaseñor a, M. E.-R.-G., & Campa-Córdova, Á. I. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 136-144.
- Kautsky, N., Ronnback, P., Tedengren, M., & Troell, M. (2000). Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 145-161.
- Lai, H.-C., Tze-Hann, N., & Ando, M. (2015). Pathogenesis of Acute Hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 1007.
- Laranja, J. L., Amar, E., Ludevese-Pascual, G., Niu, Y., Geaga, M. J., De-Schryver, P., & Bossier, P. (2017). A probiotic *Bacillus* strain containing amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) stimulates the innate immune response of *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 202-210.
- Laranja, J. L., Ludevese-Pascual, G. L., Amar, E. C., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Schryver, P. D. (2014). Poly-b-hydroxybutyrate (PHB) accumulating *Bacillus* spp. improve the survival, growth and robustness of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) postlarvae. *Veterinary Microbiology*, 310-317.
- Laranja, J., Schryver, P. D., Ludevese-Pascual, G., Amar, E., Aerts, M., Vandamme, P., & Bossier, P. (2018). High amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) content in a probiotic *Bacillus* strain displays better protective effects in *Vibrio*-challenged gnotobiotic *Artemia*. *Aquaculture*, 15-21.
- Lazado, C. C., Lacsamana, J. I., & Caipang, C. M. (2015). Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines*, 89-114.

- Lizarraga, J. (23 de marzo de 2021). *Portal de inteligencia comercial de productos Del Mar*. Obtenido de Exportación de camarones en Ecuador: <https://seinmex.com/exportacion-de-camarones-en-ecuador/>
- Llamas, S., & Hernández, S. (1996). How are clinical procedures worked out? Proposal of a model for their design. *Primary Attention*, 94-96.
- López-Acevedo, E. A., & Aguirre-Guzmán, G. (2013). Probiotic, a tool in livestock and aquaculture production. *Scientia Agropecuaria*, 129-137.
- Lozano, K., & Palacios, C. (2020). Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos. En *Factibilidad de aplicación de la fagoterapia para el control de bacterias patógenas en cultivo de larvas de camarón en Ecuador* (págs. 45-46). Guayaquil, Ecuador: Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.
- Merchan, R., & Marquéz, F. (2017). Relación de la materia orgánica con la comunidad bacteriana en suelos de piscinas de cultivos. *Universidad Técnica de Machala*, 5-6.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journarl of Medicinal Plant Research*, 31-34.
- Nayak, S. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* , 2-14.
- Norouzitallab, P. (2015). Model Organism. En P. Norouzitallab, *Use of Artemia as Model Organism to Study Epigenetic Control of Phenotypes Relevant for Aquaculture Species* (págs. 22-23). Gent: Universiteit Gent.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., & Stappen, G. V. (2006). Use of genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Enviroment Pollution*, 453-462.
- Núñez, J., & Mora, M. E. (2019). *Diseño de un protocolo de evaluación de probióticos para camarón *Pennaeus vannamei* basado en criterios de calidad*. Guayaquil-Ecuador: FIMCM-ESPOL.
- Ossorio, P. (2017). Mecanismo de acción de los probióticos. En P. Ossorio, *Bioencapsulación de *Streptomyces sep. RL8* en nauplios de *Artemia franciscana* y estudio de su resistencia contra *Vibrio* patógeno* (pág. 9). Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.

- Padilla, C. J. (2010). Caracterización de la enzima acil homoserina lactonasa de una cepa de *Bacillus thuringiensis*. *Universidad Nacional de Colombia*, 18-20.
- Parraga, D., & Sotomayor, M. (2019). *Selección y evaluación de cepas probióticas tipo Bacillus con actividad antagónica sobre cepas bacterianas patógenas aisladas en Litopenaeus vannamei*. San Pedro de Manglaralto: Universidad Estatal Península de Santa Elena, UPSE; Escuela Superior Politécnica del Litoral ESPOL.
- Rajab, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). Artemia salina as model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23-29.
- Rao, D. A. (2009). Vibriosis en la acuicultura de camarón. *Aquahoy*, 12-13.
- Redrován, K. (2017). *Medidas terapéuticas para el control de vibriosis en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Machala: Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias-UTMACH.
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Muñoz, A. R. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new Vibrio species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific Reports*, 1-14.
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Muñoz, A. R. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new Vibrio species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Nature-Scientific Report*, 1-14.
- Reyes, J. V. (15 de abril de 2021). El camarón ecuatoriano entra con fuerza en Estados Unidos en momentos en que las ventas caen con China. *El Universo*.
- Ríos, P. D., & Gajardo, G. (2004). The brine shrimp Artemia (Crustacea; Anostraca): a model organism to evaluate management policies in aquatic resources. *Revista Chilena de Historia Natural*, 3-4.
- Rodríguez, J., Cobo, L., Domínguez, C., Malavé, R., & Panchana, M. (2014). Uso de probióticos para prevenir problemas bacterianos durante la larvicultura del camarón. *Aqua Cultura*, 32-34.

- SAE. (4 de enero de 2018). *Servicio de Acreditación Ecuatoriano*. Obtenido de Esquema de acreditación para Buenas Prácticas Acuícolas: <https://www.acreditacion.gob.ec/buenas-practicas-acuicolas/>
- Sanchez, J. M., Valdivia, E., & Baños, A. (2021). *Alternativa al uso de antibióticos en animales de granja y acuicultura*. Sevilla: Biosai.
- Santander, R. (2009). *Efecto de la proteína de choque térmico (HSP70) sobre la susceptibilidad del camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* al WSSV y sobre la capacidad de los hemocitos para tolerar condiciones de estrés*. Santa Elena-Ecuador: Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas.
- Scelzo, M. (1997). Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Investigaciones Marinas*, 177-185.
- Segundo, D. D., Párraga, C., & Santos, D. (2018). *Selección y evaluación de cepas bacterianas probióticas tipo *Bacillus* con actividad antagónica sobre cepas bacterianas patógenas aisladas en *Penaeus Litopenaeus vannamei**. Camaguey: Universidad de Camaguey, Cuba.
- Sorroza L, y. o. (2016). Uso de probióticos en acuicultura. *Revista Canaria de las ciencias veterinarias*, 12-14.
- Sotomayor, M. A., Reyes, K., Restrepo, L., Domínguez, C., Borbor, M., & Bayot, B. (2019). 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*.
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversidad de vibrios. *American Society for Microbiology*, 421-423.
- Tinwongger, S., Proespraiwong, P., & Thawonsuwan, j. (2014). *Development of PCR Diagnosis for Shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) Strain of *Vibrio parahaemolyticus**. China.
- Turnbull, P., Melling, J., & Kramer, J. (1991). *Bacillus*. *Manual of clinical microbiology*, 296-303.

- Varela, A., Peña, N., & Aranguren, L. (20 de abril de 2018). Necrosis Aguda del hepatopancreas: Una revision de la enfermedad en *Penaeus Vannamei*. Costa Rica.
- Villamil Diaz, L., & Martin Silva, M. (2009). Probioticos como herramienta biotecnologicas en el cultivo de camaron: reseña. *Aquadocs*, 167-168.
- Vinoj, G., Vaseeharan, B., Tomas, S., Spiers, A., & Shanthi, S. (2014). Quorum-Quenching Activity of the AHL-Lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 Inhibits *Vibrio* Biofilm Formation In Vitro and Reduces Shrimp Intestinal Colonisation and Mortality. *Mar Biotechnol*, 707-715.
- Zhao, J., Chen, M., Quan, C., & Fan, S. (2015). Mechanisms of quorum sensing and strategies for quorum sensing disruption in aquaculture pathogens. *Journal of fish diseases*, 771-786.