

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Marítima y Ciencias del Mar

Efecto del sulfato de calcio acidificado sobre el crecimiento in vitro de
diferentes cepas bacterianas.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Cesar Ramírez Andratta

Fabian Rosales Freire

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2020

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Faculty of Marine and Marine Sciences Engineering

Effect of acidified calcium sulfate on the in vitro growth of different bacterial strains.

INTEGRATING PROJECT

Prior to obtaining the Title of:

Aquaculture Engineer

Presented by:

Cesar Ramírez Andratta

Fabian Rosales Freire

GUAYAQUIL - ECUADOR

Year: 2020

DEDICATORIA

*A nuestras familias por
su apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a toda la familia toda la familia Espol por su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo de investigación, en especial al doctor Marcelo Muñoz por su dedicación y tiempo, y de manera particular al master Adrián Márquez profesor de la materia integradora por su comprensión, dedicación y entrega con nuestro trabajo, sus enseñanzas, nos han motivado a ser profesionales comprometido con un cambio positivo en la acuicultura y en la sociedad.

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (*nombre de los participantes*) y doy(damos) mi(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"



Rosales Freire Fabian



Cesar Ramirez Andratte

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
ADRIAN JOSE
MARQUEZ
MONTIEL

Adrián Márquez MSC

PROFESOR DE LA MATERIA

Marcelo Muñoz PhD

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El estudio fue diseñado para evaluar el efecto antibacteriano del sulfato de calcio acidificado sobre el crecimiento de *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Pseudomona sp.* Así, se demostró un efecto inhibitorio del sulfato de calcio a una concentración de 1 % sobre todas las cepas bacterianas utilizadas en este estudio. Sin embargo, también se demostró que a las concentraciones de 0,8 % y 0,4 % de sulfato de calcio tienen un efecto inhibitorio total sobre todas las cepas utilizadas en este estudio, excepto para la cepa de *Vibrio vulnificus*, en la cual demostró tener un efecto bacteriostático a esas concentraciones.

Palabras clave: Sulfato de calcio, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomona sp.*

ABSTRACT

The study was designed to evaluate the antibacterial effect of acidified calcium sulfate on the growth of *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Pseudomona* sp. Thus, an inhibitory effect of calcium sulfate was demonstrated at a concentration of 1% on all bacterial strains used in this study. However, it was also shown that at concentrations of 0.8% and 0.4% calcium sulfate have a total inhibitory effect on all strains used in this study, except for the *Vibrio vulnificus* strain, in which it demonstrated have a bacteriostatic effect at those concentrations.

Keywords: Calcium sulfate, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomona* sp.

ABREVIATURAS

WSSV	Virus de la mancha blanca
YHV	Virus de la cabeza amarilla
TSV	Virus del síndrome de Taura
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
SLSS	Síndrome de la concha blanca
NHP	Hepatopancreatitis necrotizante
MIC	Concentración mínima inhibitoria
FOB	Valor libre a bordo

SIMBOLOGÍA

ufc	unidades formadoras de colonias
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
ml	Mililitro
gr	Gramo

Tabla de contenido

EVALUADORES.....	6
<i>Resumen</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	2
ABREVIATURAS.....	3
SIMBOLOGÍA	4
CAPÍTULO 1	8
1. Introducción	8
1.1 Descripción del problema	9
1.2 Justificación del problema	10
1.3 Objetivos	11
1.3.1 Objetivo General.....	11
Demostrar las concentraciones a las cuales el sulfato de calcio tiene efecto en el crecimiento <i>in vitro</i> sobre cuatro cepas patógenas en ensayos de desafío en camarones juveniles.	11
1.3.2 Objetivos Específicos	11
• Diseñar un protocolo de aplicación del sulfato de calcio como un inhibidor del crecimiento de bacterias asociadas a epizootias en sistemas de producción.	11
1.4 Marco teórico	11
1.4.1 Producción de camarones en Ecuador.....	11
1.4.2 Problemas de enfermedades en el cultivo de camarón.....	12
1.4.3 Vínculo entre las enfermedades y la calidad del agua	12
1.4.4 Enfermedades.....	12
1.4.5 Uso de antibiótico en acuicultura	13
1.4.6 Factores considerados en el uso de antibióticos	14
1.4.7 Resistencia bacteriana	14
1.4.8 Quimiotratamientos	15
1.4.9 Uso de probiótico	15
CAPÍTULO 2	19
2. Metodología	19
2.1 Solución 1	19
2.1.1 Criterios de selección de probióticos	20
2.1.2 Ventajas del uso de probiótico	20
2.2 Solución 2	20
2.3 Solución 3	21
2.4 Selección de la mejor alternativa	21
2.4.1 Descripción de parámetros evaluados.....	22

2.4.2	Resultados de matriz de toma de decisiones:.....	23
2.4.3	Método de pares	23
2.5	Destajas y desventajas de las alternativas	25
2.5.1	USO DE PROBIÓTICOS.....	25
2.5.2	USO DE ACEITES ESENCIALES	26
2.5.3	USO DE SULFATO DE CALCIO ACIDIFICADA.....	26
CAPÍTULO 3		27
3.	Materiales y Métodos	27
3.1	Material Biológico.....	27
3.2	Siembra de Bacterias en medio sólido.....	27
3.3	Siembra de Bacterias en medio Líquido	27
3.4	Domesticación de cepas bacterianas.....	27
3.5	Ensayo antibacteriano	28
3.6	Resultados	28
Capítulo 4		34
4.	Conclusiones	34
4.1	Recomendaciones	34
5.	Bibliografía	35

Índice de tablas

Tabla 1: Beneficios de uso de diferentes cepas de probióticos	17
Tabla 2: Matriz de toma de decisiones	23
Tabla 3: Matriz de pares en criterio 1	24
Tabla 4: Matriz de pares en criterio 2	24
Tabla 5: Matriz de pares en criterio 3.....	24
Tabla 6: Matriz de pares en criterio 4.....	25
Tabla 7: Matriz de pares en criterio 5.....	25
Tabla 8: Matriz de ventajas y desventajas en el uso de solución 1	25
Tabla 9: Matriz de ventajas y desventajas en el uso de solución 2	26
Tabla 10: Matriz de ventajas y desventajas en el uso de solución 3	26
Tabla 11: Número promedio de UFC/ml obtenido de <i>Vibrio harveyi</i> en los diferentes tratamientos con sulfato de calcio, para cada una de las diluciones de cada tratamiento	29
Tabla 12: Número promedio de UFC/ml obtenido de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en cada uno de los diferentes tratamientos con sulfato de calcio en cada una de las diferentes diluciones de cada tratamiento.....	30
Tabla 13: Número promedio de UFC/ml obtenido de <i>Vibrio vulnificus</i> en cada uno de los diferentes tratamientos con sulfato de calcio en cada una de las diferentes diluciones. Concentración de sulfato de calcio	31
Tabla 14: Número promedio de UFC/ml obtenido de <i>Pseudomona sp</i> para los diferentes tratamientos con sulfato de calcio, en las diluciones de cada tratamiento.	32

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCION

Los productos pesqueros son la fuente primordial de proteína a bajo costo (FAO, 2016), se ha comprobado que el consumo de pescado y mariscos proporcionan beneficios para salud gracias a su perfil nutricional, los cuales son ricos en proteínas, ácidos grasos, vitaminas y minerales (Avdalov, 2014), el consume per cápita de pescado a nivel mundial es de 20.3 kg (OIAPES, 2017). Actualmente los stocks pesqueros se encuentran siendo explotados cerca de su máximo rendimiento sostenible (FAO, El estado mundial de la pesca y la acuicultura , 2018) dejando en evidencia el déficit que esta actividad deja a la hora de abastecer a la creciente población mundial en especial de cara al 2050, cuando se espera que la población alcance los 9 billones habitantes. Bajo este escenario es evidente que la acuicultura es la mejor alternativa para suplir este déficit, lo cual queda en evidencia en los últimos años. Hoy en día según los reportes de la FAO en 2018 para la pesca y la acuicultura se ha roto un hito, por primera vez la acuicultura aporta más alimentos que la pesquería con 56% de la producción total mundial de productos del mar (FAO, El estado mundial de la pesca y la acuicultura , 2018)

América latina no es la excepción a esta tendencia de crecimiento de la acuicultura siendo Chile, Ecuador, México y Perú los países con mayor crecimiento de esta industria, Ecuador destaca en la producción de crustáceos, llegando a ser el segundo productor a nivel mundial de esta especie (GOAL, 2018) exportando 500 mil Toneladas métricas las cuales sumaron un ingreso neto de 3,652.6 millones de dólares en el 2019 y representando el mayor rubro no petrolero del país y fuente de ingreso para innumerables familias. Los avances en tecnológicos alrededor de la producción de camarón han permitido aumentar densidades de cultivo y utilizar los antibióticos como medida profiláctica y terapéutica para el tratamiento de enfermedades lo cual ha generado la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en dosis elevadas en los entornos acuáticos, existiendo evidencias epidemiológicas y moleculares de que los genes de resistencia pueden ser transmitidos de bacterias acuáticas a bacterias capaces de producir infecciones en humanos, esto deja en evidencia que los compartimientos acuáticos y terrestres carecen de fronteras respecto del flujo de genes de resistencia a antibióticos (Santiago, 2008) en base a la presión selectiva que proporcionan diferentes

competitividad para la célula huésped alcanzando cualquier lugar, por lo que el fenómeno de resistencia es un fenómeno global, en la actualidad la marcada resistencia por agregación de bacterias mediante la comunicación bacteriana (*quorum sensing*) ha impulsado a los productores a buscar sustitutos como ácidos orgánicos, aceites esenciales, y compuestos químicos no tóxicos, entre otros, que presenten una respuesta profiláctica positiva y amigable con el ambiente.

1.1 Descripción del problema

En el país, las enfermedades virales y bacterianas han surgido como una gran problemática, siendo este, el reto más importante que enfrenta la industria. Los virus han sido el principal patógeno causante de grandes pérdidas, siendo el virus de la mancha blanca (WSSV), virus de la cabeza amarilla (YHV) y el virus del síndrome de Taura (TSV), los más conocidos por el alto impacto económicos causado por su presencia en los cultivos provocando mortalidades de hasta el 100% de los organismos cultivados. Otros patógenos de tipo bacteriano que también causa mortalidades son los vibrios *sp.* bacterias gram negativas que están representado por 14 especies que afectan a los cultivos de camarones entre los que se incluyen *harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. campbelli*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii*, *V. mediterrani*, *V. logei* (Cueller, 2013) además, existen otras bacterias causantes de enfermedades como las Rickettsias, organismos Gram negativos, intracelulares y flageladas siendo el agente causal de la enfermedad conocida como hepatopancreatitis necrotizante (NHP). Uno de los mayores peligros para la canaricultura es el mal uso de los antibióticos, lo cual genera una presión por selección y genes de resistencia siendo esto un problema mundial. (Serra, 2017)

Al igual que otros sectores de producción animal en acuicultura se emplean antibióticos durante la producción para evitar (uso profiláctico) y tratar (uso terapéutico) enfermedades bacterianas (FAO, Residuos de antibióticos en productos de acuicultura, 2016), de este modo la propagación de genes de resistencia presenta mecanismos conocidos como fagos y transposones cuyos genes móviles inducen una distribución rápida entre genomas de diferentes organismos, siendo los plásmidos los principales responsables del intercambio de genes de resistencia (Alcayna, 2017)

Además de presentar genes de resistencia en ambientes acuáticos y efectos en la bioquímica de sedimentos presentan una bioacumulación en los tejidos de camarón que

pueden alterar la flora intestinal y promueven intoxicaciones, existe actualmente alerta en la salud pública ya que muchos de los organismos cultivados presentan residualidad a los antibióticos (consumo pasivo) llegando a ocasionar problemas por efectos colaterales produciendo resistencia a antibióticos en bacterias patógenas para los seres humanos, este problema es planteado cuando las bacterias adquieren resistencia a uno o más de los antibióticos a los que antes eran susceptibles. (FAO, Residuos de antibióticos en productos de acuicultura , 2016)

En la actualidad se han desarrollado protocolos de aplicación de nuevas alternativas siendo la principal estrategia promover el desarrollo sustentable de la acuicultura, por lo cual la zootecnología ha buscado alternativas fundamentadas basadas en el conocimiento científico en la fisiología del camarón, específicamente en la histopatología e inmunología (Rojas, 2016) siendo estas alternativas el uso de: probióticos, prebióticos, simbióticos, aceites esenciales, ácidos orgánicos y acidificadores como Sulfato ácido de calcio (Ardoino, 2017).

Los compuestos químicos no tóxicos son sustancias inocuas con condiciones biológicas factibles para el uso en producción, el sulfato de calcio ácido es un compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas e induce al microbiota intestinal a producir compuestos que activan al sistema inmunológico de los camarones obteniendo mayor número de hemocitos circundantes.

1.2 Justificación del problema

Las crecientes preocupaciones mundiales sobre la resistencia a los antibióticos han impulsado a buscar nuevos enfoques ecológicos para prevenir, controlar y mitigar problemas de enfermedades en acuicultura, aunque la actividad acuícola ha presentado un gran desarrollo en los últimos años las enfermedades de origen viral y bacteriana se han convertido en un factor limitante para una mayor intensificación. Debido a que el uso de antibióticos ha llegado a la aparición generalizada de resistencia, se necesita una búsqueda de enfoques alternativos que no dañen el medio ambiente, en la actualidad dichos enfoques alternativos se basan en el uso de probióticos, prebióticos, su combinación (simbióticos), subproductos bacterianos o metabólicos no viables derivados de bacterias probióticas (postbióticos), compuestos naturales derivados de plantas (fitobióticos), y bacteriófagos que interfieren en el quórum sensing.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Demostrar las concentraciones a las cuales el sulfato de calcio tiene efecto en el crecimiento *in vitro* sobre cuatro cepas patógenas en ensayos de desafío en camarones juveniles.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Diseñar un protocolo de aplicación del sulfato de calcio como un inhibidor del crecimiento de bacterias asociadas a epizootias en sistemas de producción.
- Identificar la concentración de sulfato de calcio que inhibe el crecimiento de las cepas patógenas
- Desarrollar estrategias de uso de sulfato ácido de calcio en acuicultura, por inhibición bacteriana.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Producción de camarones en Ecuador

A partir de la introducción de la acuicultura en el país en el año de 1968 y después de la aplicación de métodos industriales en la producción Ecuador se transformó en un importante productor y exportador de camarones en el mercado internacional, en 1998 se llegó a exportar 114795 toneladas a un valor FOB de 875 millones de dólares, siendo estos los valores más altos en la historia (FAO, Visión general del sector acuícola del sector nacional, Ecuador, 2018), un año después la producción se vio afectada por un agente etiológico causante de grandes pérdidas en el país por mortalidades completas de piscinas de producción, (WSSV) el Virus de la mancha blanca producido por un *Baculovirus* de doble cadena de ADN, el cual presenta manifestación en los primeros 30 a 50 días de cultivo cuyo mayor signo clínico es la aparición de manchas blancas dentro del caparazón posiblemente se deben a depósitos de calcio y son las que le dan el nombre a la enfermedad (Angel, 2013) , las exportaciones tuvieron una reducción de 17,5% en volumen y 29% en valores FOB con respecto al periodo anterior.

1.4.2 Problemas de enfermedades en el cultivo de camarón

La camaronicultura ha surgido como una de las fuentes generadora de altas divisas, su desventaja estriba en que tienen un alto riesgo debido a la existencia de enfermedades bacterianas, protozoarias, micóticas y virales. En caso de no ser detectadas por diagnóstico, estas enfermedades pueden causar elevadas mortalidades.

1.4.3 Vínculo entre las enfermedades y la calidad del agua

El estrés que las condiciones ambientales sub ópticas ejercen en los organismos, extiende sus respuestas adaptativas más allá de sus posibilidades, siendo así que la influencia de las condiciones ambientales desventajosas afecta al sistema inmunológico limitando su eficiencia. El estrés inicia dando respuesta en los niveles bioquímicos y moleculares, induciendo una serie de respuestas funcionales y estructurales en la regulación hormonal, metabolismo, osmorregulación y regulación inmunológica, afectando la capacidad de sobrevivencia, crecimiento y reproducción. (Alcayna, 2017)

1.4.4 Enfermedades

Las enfermedades bacterianas han sido un gran problema dentro del cultivo, siendo así que las bacterias oportunistas del género *Vibrio* producen tasas elevadas de mortalidades en fase de larvicultura como engorde. Los vibrios son habitantes naturales de la flora marina y se encuentran con frecuencia en camarones silvestres y de cultivo; la mayoría son patógenos oportunistas y producen enfermedad sólo cuando el sistema inmune de los camarones se deprime por alguna causa. El ingreso de los vibrios al organismo se da cuando se supera la primera barrera de defensa que es el exoesqueleto. Esto puede suceder a través de heridas (soluciones de continuidad), poros o perforaciones producidas por bacterias quitinolíticas. También podrían penetrar el camarón a través de las branquias ya que están cubiertas por una cutícula delgada; sin embargo, se considera que el intestino medio es el lugar de mayor ingreso de patógenos presentes en el sedimento, agua y alimentos consumidos por los camarones (Cueller, 2013).

La Vibriosis es una enfermedad bacteriana, causada por cepas patógenas extracelulares de varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. Estas bacterias tienen en algunos casos una patogénesis desconocida. En camarones penaeidos sólo se ha demostrado patogenicidad de unas pocas especies de vibrios, a pesar de que se ha observado la existencia de muchas bacterias en camarones enfermos. La Vibriosis como patología de etiología bacteriana, ha sido la causa de mortalidades en cultivos de camarón en países productores del mundo entero y afecta tanto en larvicultura como en fase de engorde en estanques de cultivo. Los brotes de Vibriosis suelen darse cuando hay un cambio súbito de las condiciones ambientales, produciéndose un aumento en la velocidad de la reproducción bacteriana, superándose así las cargas toleradas por el organismo de los camarones. Las Vibriosis en camarones pueden presentarse como Vibriosis Oral, Vibriosis Entérica, Enfermedad de la Concha, Vibriosis Localizadas en las Heridas, Necrosis Séptica del Hepatopáncreas, Vibriosis Cuticular y de los Apéndices, Necrosis de la Cola, Síndrome de la Concha Suelta (SLSS), Enfermedad del Intestino Blanco (WGD), Enfermedad Roja y Vibriosis Sistémica, el método de transmisión puede ser vertical y horizontal. (Diáz, 2016)

1.4.5 Uso de antibiótico en acuicultura

Un antibiótico es una sustancia química derivada o producida por un microorganismo que posee la capacidad de inhibir o matar el crecimiento de otro microorganismo, los antibióticos más usados para contrarrestar enfermedades producidas por bacterias del género *Vibrio* son: oxitetraciclina (OTC), florfenicol (FFC), y enrofloxacin (ENRO) (Santiago, Uso de antibióticos en la camaronicultura, 2009) .

1.4.5.1 Oxitetraciclina (OTC)

Es un antibiótico de amplio espectro, pertenece al grupo de las tetraciclinas, las cuales ejercen su acción antimicrobiana en muchas bacterias Gram negativas y positivas, rickettsias, micoplasmas y otras. Es muy utilizada para el tratamiento de vibriosis y NHP, actúa como bacteriostático ejerciendo su acción en la inhibición de la síntesis de proteína.

1.4.5.2 Enrofloxacin (ENRO)

Es derivado del ácido nalidíxico, es un antibiótico principalmente lipofílico, su método de acción es a nivel del núcleo celular inhibiendo la síntesis de ADN de las bacterias.

1.4.5.3 Ciprofloxacina (CIPRO)

Es un metabolito de la enrofloxacin, posee actividad frente a un amplio espectro de bacterias Gran negativas aerobias, y patógenos Gran positivos, no actúa frente a bacterias anaerobias.

1.4.5.4 Florfenicol (FFC)

Es un compuesto fluorinado, derivado del tiamfenicol siendo un potente bacteriostático de amplio espectro.

1.4.6 Factores considerados en el uso de antibióticos

El uso de antibiótico no debe ser usado como medida preventiva, antes de establecer las dosis de administración de debe conocer las condiciones fisicoquímicas del agua, la vía e administración más frecuente es la oral siendo el principal vehículo la alimentación exógena, ya que este es incorporado en un medio sumamente agresivo, debido a esto se recomienda que el antibiótico este en estado intra pellet lo cual mantiene su estabilidad y lo protege de factores tales como lixiviación, aniones y uniones a cationes trivalentes y divalentes (María Luisa Santiago, 2009) .

1.4.7 Resistencia bacteriana

Se determina la sensibilidad de una bacteriana frente a algún antimicrobiano de diversas maneras, la medida más común es observando su sensibilidad a diferentes concentraciones de este antimicrobiano (MIC), siendo la capacidad natural o adquirida de una bacteria de permanecer insensible a los factores bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. Las bacterias poseen gran capacidad de adaptación, la cual está dada por sus cortos ciclos de vida y su alta frecuencia de mutación, los antibióticos deben cumplir con condiciones básicas para inhibir o destruir el desarrollo de un microorganismo las cuales son unirse a un sitio activo con el patógeno, empleando su principio de acción el cual es interrumpir algún mecanismo bioquímico indispensable para que la bacteria se desarrolle y sobreviva (Eugenia, 2007) .

1.4.8 Quimiotratamientos

Actualmente se han empleado diferentes tratamientos para reducir el uso de antibióticos en acuicultura los cuáles han permitido desarrollar nuevas estrategias que aplicación tener una acuicultura mas sustentable.

1.4.9 Uso de probiótico

Son microorganismos vivos que se administran al hospedero suplementado en el alimento el cual genera un balance positivo en el microbiota intestinal y modulando el sistema inmune, previniendo la colonización de bacterias patógenas. Mediante experimentos in vivo e in vitro se han podido observar los diferentes mecanismos que cumplen los probióticos dentro del hospedero; modulan la respuesta inmune no especifica, producen compuestos antimicrobianos y compiten con otra bacteria por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal (Gatesoupe, 2015) .

PROBIÓTICO	ORIGEN	OBSERVACIONES	MODO DE ADMINISTRACIÓN	POSIBLE MODO DE ACCIÓN
40 especies de bacterias aeróbicas como <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> y <i>B. macerans</i> .	Aislados de animales domésticos y pece	Rápido crecimiento luego del día 2, disminuyó la densidad cuando incrementó la densidad de protozoos. Los resultados sugieren una relación negativa entre protozoos y rotíferos	Adicionado al agua del cultivo	-
<i>Bacillus spp</i>	Probiótico comercial	Mantiene una óptima transparencia y baja carga orgánica en los tanques, promueve el crecimiento y la supervivencia y la salud	Adicionado al agua del cultivo de los estanques	Antagonismo
<i>Bacillus</i> y <i>Vibrio sp.</i>	Cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Incrementa la resistencia a <i>Vibrio harveyi</i> y mancha blanca en <i>L. vannamei</i>	Adicionado en la dieta	Antagonismo, inmuno estimulación

Bacillus subtilis	<i>Penaeus monodon</i>	Incrementa la supervivencia in vivo en una infección experimental con <i>V. harveyi</i>	Adicionado al agua del cultivo	Antagonismo
<i>Pseudomonas</i> sp. PM11 <i>Vibrio fluvialis</i> PM17	<i>P. monodon</i>	In vivo mejora el sistema inmune de camarón, pero no es consistente con la producción de sideróforos y enzimas extracelulares in vitro	Adicionado a la dieta	Inmuno estimulación
<i>Bacillus subtilis</i> UTM 126	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Produce actividad antimicrobiana a <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , y <i>V. harveyi</i> en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo
<i>Vibrio alginolyticus</i> UTM 102, <i>Bacillus subtilis</i> UTM 126, <i>Roseobacter gallaeciensis</i> SLV03, y <i>Pseudomonas aestuarina</i> SLV22	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Incrementa el factor de conversión y mejora la supervivencia en infecciones por baño con <i>V. parahaemolyticus</i> en <i>L. vannamei</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Colección	Incrementa la actividad, el estallido respiratorio superóxido dismutasa de <i>Vibrio alginolyticus</i> , así como profenoxidasa y peroxinectina en la transcripción de mRNA	Adicionado a la dieta	Inmuno estimulación

Synechocystis MCCB 114 y 115	<i>Colección de agua de mar</i>	Eliminación de Vibrio de poslarvas de Penaeus monodon Incremento la supervivencia durante infecciones con V. harvey	Adicionado a la dieta	Antagonismo
Bacillus licheniformis	<i>L. vannamei</i>	Disminuye el número de Vibrio. Incrementa el conteo de hemocitos, hemoloxidasa y super-óxido dismutasa en <i>L. vannamei</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo Inmuno estimulación
Bacillus (70 cepas) Probiótico comercial SANOLIFE MIC	-	Incrementa la tasa de crecimiento, supervivencia y disminuye la tasa de conversión alimenticia en <i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> y <i>P. monodon</i>	Adicionado en la dieta	-
<i>Paenibacillus spp., B. cereus y Pa. polymyxa</i>	Agua de mar, sedimento y muestras de intestino de peces marinos	Actividad probiótica de <i>Paenibacillus spp., B. cereus y. polymyxa</i> luego de infecciones con Vibrios en poslarvas de <i>P. monodon</i> .	-	Antagonismo
Bacillus (70 cepas) Probiótico comercial SANOLIFE MIC (<i>B. subtilis, B. licheniformis</i>)	-	Disminuye el número de Vibrio e incrementa la supervivencia de <i>P. monodon</i> y <i>L. vannamei</i>	Adicionado al agua del cultivo	Antagonismo in vitro

Tabla 1: Beneficios de uso de diferentes cepas de probióticos

En la siguiente tabla se muestran los mayores beneficios del uso de probióticos en el cultivo de camarón, observando mayor biomasa y supervivencia durante infecciones experimentales, asociadas con la potenciación de las defensas del sistema inmune innato, siendo significativos los cambios en la microbiota intestinal por la colonización de bacterias probióticas y desplazamiento de bacterias patógenas y oportunistas, esta colonización está dada por la producción de enzimas digestivas (proteasas y amilasas)

y exoenzimas cuya función es ser catalizadoras de glúcidos facilitando mayormente su adsorción.

Uso de ácidos orgánicos

Son compuestos orgánicos con más de un grupo carboxilo, incluyendo ácidos monocarboxílicos saturados de cadena lineal corta, son producidos mediante la fermentación microbiana de carbohidratos por diferentes especies de bacterias mediante diversas rutas metabólicas y condiciones ambientales, estos también pueden formar sales dobles y simples debido a la combinación con potasio (K), sodio (Na), calcio (Ca), etc.

Mejoran el crecimiento y la resistencia a enfermedades, el método de acción de los ácidos frente a patógenos es por cambio de PH en el matiz extracelular, alterando la fisiología normal de cierto tipo de bacterias. (Alarcon, 2016)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

En los últimos años el interés por reducir el uso de antibióticos en la industria acuícola ha ido en aumento, siendo las principales estrategias el uso de sustancias o productos de origen natural los cuales no sean bioacumulados en el suelo y en los organismos de cultivo, en el presente capítulo se presentarán tres soluciones amigables con el ambiente para reducir o mitigar el uso de antibióticos.

2.1 Solución 1

Uso de probióticos como mejoramiento de la respuesta a enfermedades y calidad el ambiente.

La incorporación de microorganismos benéficos para aumentar la resistencia a enfermedades y mejorar el estado nutricional es un método amigable con el ambiente y más seguro con gran ventaja para el hospedero, modificando las comunidades microbianas asociadas a este y a las del ambiente, siendo coadyuvante de la respuesta inmunológica y mejorando la calidad del entorno.

Los probióticos ejercen su efecto beneficioso mediante múltiples mecanismos, actuando sobre el organismo y el ambiente, los principales mecanismos son: colonizar y adherirse al tracto digestivo, modulación del sistema inmunológico, producción de compuesto beneficioso, producción de sustancias antagónicas contra patógenos y mejorar la calidad del medio acuático.

Los microorganismos con actividad probiótica tienen la capacidad de generar productos extracelulares que inhiben o matan otras bacterias potencialmente patógenas, produciendo sustancias antimicrobianas, ácidos orgánicos y bactericidas.

Los probióticos activan a las lisozimas las cuales son enzimas de defensa contra bacterias.

2.1.1 Criterios de selección de probióticos

Composición: *Lactobacillus*, *Bacilos*

Concentración: cfc/ml o cfu/gra

Sustrato: agua, sustratos vegetales, sales de dendritas

Actividad: tiempo, pH, fuente de carbono (melaza, azúcar, panela), fuente de nitrógeno (urea, alimento balanceado, harina de pescado), vitaminas, recipientes, volúmenes de agua, mano de obra, costos (hora/hombre)

Riesgos: contaminación cruzada (protozoarios, bacterias patógenas)

Control de calidad: empaque, vida útil, riesgo sanitario (adecuado para uso acuícola), seguridad de uso (humanos, plantas, animales), microorganismos heterotróficos, facultativos.

2.1.2 Ventajas del uso de probiótico

Por su contenido de bacterias coadyuvante de la digestión y enzimas especializadas logran eliminar los desechos de las especies en cultivo, residuos de plancton y alimento balanceado.

Mejora la calidad del agua, mediante la digestión de la materia orgánica residual en suspensión en la columna de agua y los compuestos nitrogenados tóxicos, sobre compitiendo por alimento a las bacterias que producen sulfato de hidrogeno y digiriendo otros contaminantes perjudiciales.

Disminuyen la tasa de mortalidad, al reducir el impacto del estrés ambiental en el huésped, por ende, usa su energía directamente en crecimiento y no la desperdicia combatiendo enfermedades incrementando la tasa de supervivencia.

2.2 Solución 2

Uso de aceites esenciales como inhibidores de crecimiento bacteriano en sistemas de producción

Los aceites esenciales están compuestos por sustancias lipofílicas principalmente monoterpenos y sesquiterpenos y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, ésteres y éteres) en distintas cantidades.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe principalmente a los compuestos fenólicos (carvacrol, timol y eugenol) presentes en ellos. Los aceites

esenciales con alta actividad antimicrobiana son aquellos en la que la proporción de compuestos fenólicos es alta, aunque se ha observado que el resto de elementos traza también son relevantes debido a efectos de sinergia con el resto de los compuestos.

La mayoría de los aceites esenciales usados en la industria acuícola son incomparados en el pellet, ya que esta manera no se tendría problemas de lixiviación y formación de emulsiones en el agua por diferencias de densidades.

2.3 Solución 3

Sulfato de calcio ácido como inhibidor de crecimiento de bacterias patógenas en sistemas de producción

El sulfato de calcio acidificado al 1.2% es un compuesto que ha demostrado incrementar el número de hemocitos, las proteínas presentes en la hemolinfa y el número de células fagocíticas en los camarones, lo cual favorece al sistema inmunitario. Además el sulfato de calcio acidificado tiene la propiedad de favorecer el dominio de bacterias Gram positivas, excluyendo a las bacterias Gram negativas presentes en los intestinos de los camarones, la acción bactericida del sulfato de calcio ha sido relacionada con la liberación de iones hidroxilos los cuales son radicales altamente oxidante y letales para las bacterias, estos pueden causar daño a la membrana citoplasmática al destruir sus fosfolípidos desnaturalización de proteínas por alcalinización, siendo así que muchas enzimas pierden su actividad biológica y alterando el metabolismo celular y la pérdida de genes.

El sulfato de calcio ácido adicionado al alimento como estimulador de la microbiota intestinal de camarones ha demostrado respuesta inmune mejorada que incluye capacidad fagocítica de hemocitos, mayor concentración de proteína en hemolinfa, aumento de células hialinas, además también poseen un efecto antimicrobiano en el cual los iones hidroxilos inducen peroxidación lipídica provocando la destrucción de los fosfolípidos los cuales son componentes de la membrana celular, remueven átomos de hidrogeno de los ácidos grasos creando reacción en cadena que conlleva a un daño extenso en la membrana de las bacterias.

2.4 Selección de la mejor alternativa

Como medida de control para minimizar el impacto que genera el uso de antibióticos en acuicultura hemos descrito anteriormente tres alternativas viables y amigables con el

ambiente, las mismas que no generan residuos ambientales y resistencia por parte de los patógenos. El criterio de evaluación para determinar la mejor alternativa se fundamenta en la capacidad bactericida y actividad inmunoestimulante de las tres alternativas.

En la elaboración de la matriz de decisiones se tomaron en consideración el mecanismo de acción de cada una de las soluciones, basadas en el poder inhibidor de patógenos y la capacidad de los organismos en formar nuevos compuestos a partir de la incorporación de las soluciones al sistema, los mismos se serán adyuvantes inmunológicos.

Dentro de la matriz se encontrarán los siguientes parámetros a evaluar, colonizar tracto digestivo, modulación del sistema inmune, producción de sustancias antagónicas, mejoramiento del medio, incremento de número de hemocitos y actividad antimicrobiana.

Se estableció un valor numérico designado para ponderar el nivel de presencia o ausencia de los criterios evaluados, la escala numérica estará comprendida de 1 al 5; 1 será el valor más bajo y 5 será el valor más alto, al final de efectuar un proceso de fallo para obtener una decisión final.

2.4.1 Descripción de parámetros evaluados

Modulación del sistema inmune: proceso de supresión o estimulación dentro de los cuales inmunopotenciadores les atribuye funciones importantes en las inmunodeficiencias de algunos tipos de infecciones virales y bacterianas (Martínez, 2006)

Producción de sustancias antagónicas: producción de compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias.

Mejorar calidad de medio: mantener óptimos los parámetros de cultivos mediante procesos de biorremediación

Actividad antimicrobiana: agente de mata microorganismos o detiene su crecimiento.

Incremento de número de hemocitos: aumento en el número de células defensoras en el sistema inmune.

Capacidad hemocíticas: proceso del sistema inmunológico en aumentar la respuesta inmune por adyuvantes inmunológico.

Eficiencia: efectividad de solución en el menor tiempo.

Criterios evaluados	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Modulación del sistema inmune	4	1	5
Producción de sustancias antagónicas	4	3	4
Mejora la calidad de medio	5	1	4
Actividad antimicrobiana	4	4	5
Incremento de numero de hemocitos	3	2	5
Capacidad fagocítica	4	3	4
Eficiencia de la solución	3	4	5

Tabla 2:Matriz de toma de decisiones

2.4.2 Resultados de matriz de toma de decisiones:

Solución1: 27 puntos

Solución 2: 14 puntos

Solución 3: 32 puntos

Ponderación

Solución1: 77.1%

Solución 2: 40%

Solución: 3 91.4%

2.4.3 Método de pares

Se realizó una matriz la cual evalúa presencia o usencia de varios criterios de selección, la metodología consiste en identificar por medio de comparación absoluta de cada solución si presentan o no presentan dicho criterio, los criterios evaluados serán: actividad antimicrobina, inmunopotenciadores, costos bajos de producción, factibilidad técnica y propuesta innovadora

Actividad Antimicrobiana.

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Solución 1	X	X	X
Solución 2	X	x	X
Solución 3	X	X	X

Tabla 3: Matriz de pares en criterio 1

Immunopotenciadores

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Solución 1	X		X
Solución 2			
Solución 3	X		X

Tabla 4: Matriz de pares en criterio 2

Costos Bajos de producción

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Solución 1			
Solución 2			
Solución 3			x

Tabla 5: Matriz de pares en criterio 3

Factibilidad técnica

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Solución 1	x		x
Solución 2			
Solución 3	x		x

Tabla 6:Matriz de pares en criterio 4

Propuesta innovadora

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Solución 1			
Solución 2			
Solución 3	x		x

Tabla 7:Matriz de pares en criterio 5

2.5 Destajas y desventajas de las alternativas

Se determinó las ventajas y desventajas de la implantación de las soluciones en los sistemas de producción.

2.5.1 USO DE PROBIÓTICOS

Desventajas	Ventajas
No todas las sepas de bacterias usadas como probióticos funcionan	Incremento en el aprovechamiento del alimento
No se alcanza la concentración estimada por el fabricante en campo	Mejora la respuesta a enfermedades
Fuente de carbono ineficientes	Estimula el microbiota intestinal
Niveles de pH en el sistema de producción no permiten su desarrollo	Mejoramiento del entorno
Contaminación cruzada en le preparación de probióticos en campo	

Tabla 8:Matriz de ventajas y desventajas en el uso de solución 1

2.5.2 USO DE ACEITES ESENCIALES

Desventajas	Ventajas
Única forma más estable de uso es incorporarlo al alimento	Adyuvantes del sistema
Presenta grandes problemas de lixiviación	Promotor de compuestos antimicrobianos
Para comprobar su efectividad se adiciona al sistema grandes cantidades	
Pocos aceites esenciales en el mercado	
No existen en el mercado solución lipofílicas que permitan tener mezclas homogéneas	

Tabla 9: Matriz de ventajas y desventajas en el uso de solución 2

2.5.3 USO DE SULFATO DE CALCIO ACIDIFICADA

Desventajas	Ventajas
Investigación nueva	Incremento de número de hemocitos
Pruebas microbiológicas realizadas con pocas cepas de bacterias patógenas	Favorecer el incremento de bacterias Gram positivas y excluye las bacterias gram negativas
	Altera el metabolismo celular
	Adyuvante de la muda del camarón
	Incremento de células fagocíticas

Tabla 10: Matriz de ventajas y desventajas en el uso de solución 3

De esta manera podemos determinar que el sulfato de calcio acidificado es el tratamiento más efectivo para inhibir el crecimiento bacteriano patógeno y coadyuvante del sistema inmunológico.

CAPÍTULO 3

En este capítulo se describirá la metodología y los resultados *in vitro* en la inhibición de crecimiento bacteriano con sulfato ácido de calcio, siendo esta la mejor alternativa de las tres alternativas propuestas para mitigar el uso de antibióticos en los sistemas de producción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Las cepas seleccionadas para este ensayo fueron *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Pseudomonas sp.* Las cuatro cepas demostraron ser patógenos de camarones juveniles según.

3.2 Siembra de Bacterias en medio sólido

Se preparó Plate Count Agar, agregando 23,5 gr de medio de cultivo por litro de agua destilada, y una concentración final de 2% de cloruro de sodio. El medio fue sometido a esterilización en húmedo a 121°C durante 15 minutos. Luego de este proceso el medio de cultivo fue enfriado hasta aproximadamente unos 40°C y 20 ml de medio de cultivo fue depositado en platos de Petri.

3.3 Siembra de Bacterias en medio Líquido

Se preparó Agua de peptona agregando 15 gr por litro de agua destilada y se suplementó con cloruro de sodio al 2%. El medio fue sometido a esterilización en húmedo bajo condiciones estándar, según recomendaciones del fabricante.

3.4 Domesticación de cepas bacterianas

Con el propósito de estandarizar un mecanismo de inoculación y utilizar en este proceso un sistema cuantificable del número de bacterias con el cual se realizará el ensayo de inhibición, se procedió a establecer el número de microorganismos al cual corresponde una densidad óptica predeterminada a una longitud de onda de 650 nm. Para este efecto una colonia de las cepas identificadas como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Pseudomonas sp.* fueron sembradas en agua de peptona. Luego de 18 horas de crecimiento, 1 ml de diluciones seriadas de 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} de las cuatro cepas bacterianas fueron sembradas en el medio sólido Plate Count Agar, por triplicado. En paralelo, se determinó el valor de densidad óptica a 650 nm obtenida para cada uno

de los cultivos de bacterias de las cuatro cepas bacterianas utilizando un espectrofotómetro (Multiscan). Los platos de Petri de la siembra de las diluciones fueron incubados por 48 horas a temperatura ambiente, antes de determinar el número de Unidades formadoras de colonia UFC/ml para cada plato de Petri

3.5 Ensayo antibacteriano

Las diferentes cepas bacterianas fueron sembradas en medio líquido (agua de peptona), por 18 horas. Luego de ese tiempo se inoculó una concentración correspondiente a 1×10^{-7} bacterias de cada una de las cepas bacterianas en medio de cultivo líquido enriquecido con 0.4%, 0.8% y 1% de sulfato de calcio acidificado en distintos tubos para cada cepa. Este proceso se repitió inoculando una concentración correspondiente a 1×10^{-6} , 1×10^{-5} y 1×10^{-4} . Los tubos con agua de peptona y los inóculos a diferentes densidades de bacterias con diferentes concentraciones de sulfato de calcio acidificado fueron incubados a temperatura ambiente por 24 horas, antes de sembrar 1 ml de cada tubo en el medio plate count agar (PCA) por triplicado. Luego de 48 horas de incubación a temperatura ambiente, el número de UFC fue determinado. Para efecto de llevar un control de crecimiento se repitió el proceso en agua de peptona sin sulfato de calcio.

3.6 Resultados

Ensayos turbidométricos de crecimiento bacteriano fueron realizados a fin de estandarizar la concentración de bacterias por unidad de volumen de acuerdo a los valores obtenidos de densidad óptica. A partir de las lecturas y la siembra en placas de agar de diferentes diluciones del crecimiento en medio líquido se pudo determinar que el valor de Densidad óptica DO corresponde a 1 para cada una de las bacterias utilizadas en este trabajo. Así, valores DO de 1 corresponden a 3.01×10^8 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *V. harveyi*, $2,9 \times 10^9$ UFC de *V. parahaemolyticus*, 1.3×10^9 UFC de *V. vulnificus* y 1.4×10^9 UFC de *Pseudomona sp.* Una vez realizada la determinación cuantitativa de la concentración de bacterias utilizando la Densidad óptica, se realizó la estimación del efecto del sulfato de calcio sobre el crecimiento de las distintas cepas.

Los resultados obtenidos mostraron que para la cepa de *V. harveyi* no se detectó crecimiento alguno, según las condiciones del experimento en ninguna de las diluciones obtenidas de los diferentes tratamientos con sulfato de calcio, **Tabla 11.**

Tabla 11: Número promedio de UFC/ml obtenido de *Vibrio harveyi* en los diferentes tratamientos con sulfato de calcio, para cada una de las diluciones de cada tratamiento

	CONCENTRACIONES		
Dilución Bacteriana	1%	0.8%	0.4%
1,00E+07	0	0	0
1,00E+06	0	0	0
1,00E+05	0	0	0
1,00E+04	0	0	0

Los conteos de las placas de PCA para la cepa de *V. parahaemolyticus* muestran que no se pudo determinar crecimiento según las condiciones del experimento en ninguna de las diluciones obtenidas de los diferentes tratamientos con sulfato de calcio. **Tabla 11.**

	CONCENTRACIONES		
Dilución Bacteriana	1%	0.8%	0.4%
1,00E+07	0	0	0
1,00E+06	0	0	0
1,00E+05	0	0	0
1,00E+04	0	0	0

Tabla 12: Número promedio de UFC/ml obtenido de *Vibrio parahaemolyticus* en cada uno de los diferentes tratamientos con sulfato de calcio en cada una de las diferentes diluciones de cada tratamiento.

Los análisis de los resultados obtenidos con la cepa de *V. vulnificus* muestran que el sulfato de calcio a una concentración del 1% impide el crecimiento de esta cepa. Sin embargo, a una concentración de 0,8% de sulfato de calcio permitió un ligero crecimiento bacteriano, el cual pudo ser detectado bajo las condiciones de este experimento, sin embargo, no fue cuantificable, dado que las lecturas de los platos de Petri presentaron 4 UFC por placa. Del mismo modo con una concentración de 0,4% pudo ser detectado crecimiento bacteriano el cual es cuantificable, obteniéndose 191 UFC promedio por caja de Petri en la dilución de 1×10^{-4} y de 17 UFC por caja de Petri en la dilución de 10^{-5} UFC. **Tabla 3.**

	CONCENTRACIONES		
Dilución Bacteriana	1%	0.8%	0.4%
1,00E+07	0	0	0
1,00E+06	0	0	0
1,00E+05	0	0	17
1,00E+04	0	0	191

Tabla 13: Número promedio de UFC/ml obtenido de *Vibrio vulnificus* en cada uno de los diferentes tratamientos con sulfato de calcio en cada una de las diferentes diluciones. Concentración de sulfato de calcio

Los resultados obtenidos muestran que para la cepa de *Pseudomona sp.* No se detectó crecimiento de bacterias, según las condiciones del experimento, en ninguna de las diluciones obtenidas para los diferentes tratamientos con sulfato de calcio, **Tabla 14.**

	CONCENTRACIONES		
Dilución Bacteriana	1%	0.8%	0.4%
1,00E+07	0	0	0
1,00E+06	0	0	0
1,00E+05	0	0	17
1,00E+04	0	0	191

Tabla 14: Número promedio de UFC/ml obtenido de *Pseudomona sp* para los diferentes tratamientos con sulfato de calcio, en las diluciones de cada tratamiento.

Previo al inicio de los ensayos antibacterianos se verificó la tasa de crecimiento de cada una de las cepas bacterianas y la estandarización de la concentración de las mismas de acuerdo a su turbidez. Nuestras observaciones nos permiten concluir que las distintas cepas tienen tasas de crecimiento relativamente parecidas excepto la cepa identificada como *V. harveyi*. Así, se pudo determinar que luego de 18 horas de incubación la cepa identificada como *V. vulnificus* alcanzó la densidad de $1,3 \times 10^9$ UFC/ml, la cepa identificada como *V. parahaemolyticus* presentó una densidad de $2,9 \times 10^9$ UFC/ml y la cepa identificada como *Pseudomonas sp*. Alcanzó una densidad $1,44 \times 10^9$ UFC/ml. Sin embargo, la cepa identificada como *V. harveyi* presentó una densidad óptica con un orden de magnitud inferior de $3,1 \times 10^8$ UFC/ml.

Los resultados obtenidos en el presente están en acuerdo con lo descrito por, sobre el efecto de 1,2 % de sulfato de calcio acidificado en ensayos in vivo. Así, una concentración de 1,2 % de sulfato de calcio acidificado produce una exclusión específica

de bacterias Gram negativas del intestino de los camarones mediante ensayos de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, por sus siglas en inglés) De este modo con las cuatro cepas Gram negativas utilizadas bajo las condiciones de este ensayo, se demostró que una concentración de 1,2 % es suficiente para inhibir su crecimiento. Mientras el tratamiento de 0,8 % de sulfato produjo un ligero crecimiento no cuantificable solo para la cepa identificada como *V. vulnificus*. Del mismo modo el tratamiento con 0,4% de sulfato de calcio acidificado provoca un crecimiento de dicha cepa en la dilución de 10^{-5} y 10^{-4} , estos resultados demuestran que el sulfato de calcio acidificado tiene un efecto bacteriostático sobre *V. vulnificus*. Este hecho, nos permite plantear la hipótesis de que el sulfato de calcio acidificado tiene un efecto bacterioestático sobre diferentes bacterias Gram negativas.

Capítulo 4

4. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados demuestran un efecto inhibitorio sobre las cuatro cepas utilizadas en este estudio a una concentración de 1,0% de sulfato de calcio acidificado teniendo una actividad bactericida. Finalmente, se demostró sulfato de calcio acidificado al 0,8 % y 0,4 % tiene un efecto bacteriostático sobre la cepa de *V. vulnificus*.
- Es un compuesto que ha demostrado incrementar el número de hemocitos, las proteínas presentes en la hemolinfa y el número de células fagocíticas en los camarones, lo cual favorece al sistema inmunitario.
- Además, el sulfato de calcio tiene la propiedad de favorecer el dominio de bacterias Gram positivas y excluye a las bacterias Gram negativas.

4.1 Recomendaciones

- La implementación del sulfato ácido de calcio es una alternativa que disminuye las bacterias patógenas en los sistemas de producción, pero su aplicación debe estar basada en protocolos de aplicación y utilización de las dosis correspondientes, para demostrar su efectividad.
- La mejor forma de incorporar el sulfato ácido de calcio al sistema es incorporarlo en el alimento balanceado para aumentar el efecto bactericida e inmunoestimulante, además promueve mejor la proliferación de bacterias Gram positivas las cuales son probióticos naturales.

5. BIBLIOGRAFÍA

(s.f.).

Alarcon, P. (2016). *Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune*. Chile: Scielo.

Alcayna, M. R. (2017). *Identificación de dos islas genómicas implicadas en la resistencia a los antibióticos*. Madrid: Hospital Ramón y Cajal.

Angel, J. C. (2013). *Enefermedad de la mancha blanca* . Estados Unidos : The center for food security and public health .

Ardoino. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento en alimentos balanceados: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. *Ciencias Veterinarias* , 3-10.

Avdalov, J. T. (2014). *Beneficios del consumo de pescado* . Montevideo, Dinamarca, INFOPECA : Lagomarsino S.A.

Cueller, J. (2013). *Vibriosis*. EEUU: Colegio de medicina veterinaria.

Diáz, E. (Enero de 2016). *Monografías.com*. Obtenido de <https://www.monografias.com/trabajos88/vibriosis-camaron/vibriosis-camaron.shtml>

Eugenia, C. (2007). *La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación*. Colombia: Corporacion Medicina del Valle .

FAO. (2016). *Crecimiento mundial de la acuicultura* . Roma: Montes.

FAO. (2016). Residuos de antibióticos en productos de acuicultura . En FAO, *FAO para América Latina y el Caribe*. Roma: FAO.

FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura* . Roma : CCBY-NC-SA.

FAO. (2018). *Visión general del sector acuícola del sector nacional, Ecuador*. Obtenido de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_ecuador/es

Gatesoupe, F. (2015). *Uso de Probióticos en Acuicultura*. Unité Mixte de Nutrition des Poissons INRA-IFREMER, Ifremer, Centre de Brest, BP .

GOAL. (2018). *Revision y pronostico de la produccion mundial de camaron: crecimiento constante por adelante* . Guayaquil.

María Luisa Santiago. (2009). Sonora: Laboratorio de Análisis Biológicos. Coord. de Ciencia de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Martínez, D. C. (2006). *Investigaciones Biomedicas*. Habana -Cuba : Scielo.

- OIAPES. (2017). *Pescal mundial y crecimiento en México*. Sonora : Subsecretaria de Pesca y Acuicultura del estado de Sonora .
- Rojas, R. (2016). *Avances biotecnológicos sobre maricultura en Costa Rica*. Costa Rica : Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional .
- Santiago, M. L. (2008). Uso de antibioticos en la camaronicultura . *FARMECÉUTICAS*, 3-4.
- Santiago, M. L. (2009). *Uso de antibióticos en la camaronicultura*. Sonora: Laboratorio de Análisis Biológicos. Coord. de Ciencia de los Alimento, Centro de investigaciones en alimentación y desarrollo.
- Serra, M. (2017). *La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicacion en la política antimicrobiana* . Habana, Cuba : Scielo.