



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



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

Autores: C. Tamayo ⁽¹⁾, J.C. Mullo ⁽²⁾ & Coautor: * F. Burgos ⁽³⁾

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

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, km 30,5 Vía Perimetral,

Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador

*fburgo@espol.edu.ec; cafetama@espol.edu.ec ⁽¹⁾; juank_2387@hotmail.com ⁽²⁾

Resumen

*Este proyecto fue ejecutado con el fin de establecer el espectro de acción de dos probióticos comerciales (denominados A y B) midiendo de forma cuantitativa el diámetro del halo de inhibición provocado por dichos probióticos en cepas domesticadas de *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Los probióticos A y B fueron activados 24 horas antes de realizar la experimentación por medio de la aplicación de oxígeno a través de blowers, mientras que la reactivación de las cepas patógenas domesticadas (*Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*) fue ejecutada por medio de aislamiento por agotamiento en placas con Agar Marino como medio de cultivo. El principal objetivo del proyecto fue la determinación del potencial inhibitorio de cada uno de los probióticos en las distintas placas que contenían las cepas patógenas. Una vez finalizada la experimentación se concluyó que el probiótico comercial B provocó halos de inhibición cuyos diámetros fueron mayores que los del probiótico A en las tres diferentes cepas domesticadas.*

Palabras Claves: Probiótico, *Vibrio*, patógeno, halo de inhibición.

Abstract

*This project was undertaken to establish the spectrum of action of two commercial probiotics (called A and B) measuring quantitatively the diameter of inhibition zone caused by these probiotic strains domesticated *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Probiotics A and B were activated 24 hours prior to experimentation through the application of oxygen through blowers, while the reactivation of pathogenic domesticated (*Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*) was executed by depletion isolation plates with marine agar culture medium. The main project objective was to determine the inhibitory potential of each of probiotics in different plates containing pathogenic strains. Once the experiment was concluded that the commercial probiotic B causes inhibition halos whose diameters were greater than those of probiotic strains in the three different domesticated.*

Keywords: Probiotic, *Vibrio*, pathogen, halo of inhibition.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



1. Introducción

Los Probióticos son microorganismos no patógenos que ayudan equilibrar la flora bacteriana intestinal del huésped y a potenciar el sistema inmunitario, siendo estos una alternativa para la reducción parcial o total de la aplicación de antibióticos. En Ecuador, el uso de probióticos ha recibido una gran acogida en los últimos años, por parte de la industria camaronera como herramienta de control de enfermedades en los cultivos, lo que les permite mejorar los niveles de producción.

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

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

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

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

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

El contenido de altas cantidades de *V. paraahaemolyticus* o *V. harveyi* induce a la unión y separación de las células epiteliales de la lámina basal del Tronco medio. Las células epiteliales separadas no

se presentan cuando hay bacterias no patógenas (probióticos).⁵

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

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

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

2. Objetivos

General

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

Objetivos Específicos

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

3. Materiales y Métodos

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

- 2) Se preparó los materiales
 - Medios de Cultivo (Agar marino 200 ml)
 - Agua de peptona más NaCl al 2% (200ml)
 - Auto clavar materiales
- 3) Se preparó los probióticos a una razón de 10g. en 40 ml de agua de peptona en los frascos de vidrio (250 ml.) por 24 horas con suministro de aire a través de blower.
- 4) Se elaboró las diferentes soluciones Mc.Farlan, haciendo soluciones con una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^8$.
- 5) Se realizó siembra de los Vibrios (10 ml.) en las placas con agar marino como medio de cultivo por superficie usando esparcidoras de cristal hasta agotar la muestra.
- 6) Se efectuar hoyos de forma circular en las placas con el reverso de las puntas de vidrio.
- 7) Se Colocó 50 μ l de probiótico en los hoyos que se realizaron en las placas y colocar en la incubadora por 48 horas.
- 8) Se midieron los halos en el caso de haber presencia de inhibición.

4. Resultados y Discusión

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

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

- En el ensayo realizado para el *v. vulnificus*, con los probióticos **A** y **B** la variación de los diámetros de los halos es de 0.35 mm.

Tabla 1. Probióticos vs. *V. vulnificus*

	<i>V. vulnificus</i>		
Probiótico A	0.8	0.8	0.7
Probiótico B	1.15	1.16	1.16

En las aplicaciones realizadas para el *v. harveyi* entre el probiótico **A** y **B**, los halos de inhibición varían notoriamente en su tamaño, el probiótico **A** es más pequeño en comparación con el probiótico **B**. La diferencia representa 0.9 cm.

Tabla 2. Probióticos vs. *V. harveyi*

	<i>V. harveyi</i>		
Probiótico A	0.7	0.8	0.7
Probiótico B	1.7	1.75	1.75

En las aplicaciones de los probióticos al *V. parahaemolyticus* los resultados fueron similares a los de las aplicaciones realizadas al *V. harveyi*, con una variación considerable del diámetro del halo del probiótico **B** en comparación al diámetro del halo perteneciente al probiótico **A**, que fue de 0.74 cm.

Tabla 3. Probióticos vs. *V. parahaemolyticus*

	<i>V. parahaemolyticus</i>		
Probiótico A	0.86	0.8	0.85
Probiótico B	1.6	1.59	1.62

5. Conclusiones

1. Entre los dos probióticos comerciales estudiados el que tiene mayor espectro de acción contra los microorganismos probados es el probiótico **B**.
2. Entre los microorganismos probados el orden de susceptibilidad de mayor variación se dio en el probiótico **B**, el *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, teniendo rangos de acción diferentes de mayor a menor diámetro respectivamente.
3. Ambos probióticos cumplen con las funciones específicas para las cuales fueron utilizados, independientemente del tamaño del diámetro del halo de inhibición los dos probióticos son eficaces para impedir el crecimiento bacteriano.

11. Agradecimientos

Los autores dejamos constancia de nuestro agradecimiento al apoyo realizado por parte del Laboratorio del Centro de Servicio para la Acuicultura (CSA) y a su director, el Dr. Marcelo Muñoz.

De igual manera nuestro agradecimiento a nuestra directora de proyecto de graduación, la Dra. Francisca Burgos.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



12. Referencias

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