



Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Efectividad de bacterias aisladas de cultivos de camarón *Penaeus vannamei* mediante pruebas *in vitro* con *Vibrio parahaemolyticus*.

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Kleber David Arcentales Huayamabe

Erick Leonel Peña Mosquera

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a mis padres Azucena y Luis quien desde el cielo está orgulloso y quienes han sido el pilar fundamental en todos los años de mi etapa universitaria y de mi vida. A mis hermanos Nicole y Luis quienes me motivaron a mejorar cada día y no desistir. A mis compañeros de la ESPOL con quienes compartí mis mejores momentos y CENAIM por abrirme las puertas y permitirme aprender de cada área; y a mis profesores que con su dedicación y conocimiento contribuyeron a mi formación personal y profesional.

Erick Peña

“Dedico esta tesis a todos aquellos que compartieron mi arduo viaje académico, lleno de desafíos y sacrificios, sobre sobre todo cargado de aprendizajes y crecimiento.”

Este logro no es solo mío, sino también de mis padres, que desde el primer aliento de vida fueron mi luz, mi guía y mi fuente inagotable de inspiración. Cada página de este trabajo es un tributo a su tiempo y el amor incondicional que siento por ustedes.

Esta tesis también es un testimonio de nuestra unión, a ti, mi inspiración, mi guía, mi pasión. Tu compañía fue la brújula que dirigió cada uno de mis pasos durante estos últimos años. En cada desvelo, encontré en ti el consuelo y el estímulo para siempre seguir adelante. Tu amor constante y tus palabras de aliento resuenan en cada una de las letras de este trabajo, que no solo es un logro académico, sino también un reflejo de la conexión que existe entre los dos Dayanna Zambrano.

Kleber Arcentales

Agradecimientos

Nuestro sincero agradecimiento a Bonny Bayot, PhD que con su confianza depositada y guía fueron clave para el desarrollo exitoso de este proyecto. Al departamento de Salud animal y microbiología de CENAIM con quienes forjamos una bonita amistad Rosa Malavé, Karina Reyes, Ana Ayong, Irma Betancourt, Martha Borbor, Ramiro Solorzano, Juan Muñoz, Cristhian Preciado que con sus guías y opiniones contribuyeron para el desarrollo de este proyecto y a nuestra compañera Yumi Medina por su contribución. A nuestros profesores por impartirnos conocimientos de carrera y de vida y a nuestras familias por siempre estar al pendiente de nosotros y ser un pilar en nuestras formaciones profesionales. Finalmente, a ESPOL por abrirnos sus puertas y formarnos íntegramente en conocimientos y valores que la caracterizan.

Declaración Expresa

Nosotros Kleber David Arcentales Huayamabe y Erick Leonel Peña Mosquera acordamos y reconocemos que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 14 de septiembre del 2023.



Kleber David Arcentales
Huayamabe



Erick Leonel Peña
Mosquera

Evaluadores



firmado electrónicamente por
BONNY NARCISA BAYOT
ARROYO

Jose Jerry Landivar Zambrano

Profesor de Materia

Bonny Narcisa Bayot Arroyo, Ph.D.

Tutor de proyecto

Resumen

Las enfermedades bacterianas provocan pérdidas económicas en la producción de camarón. El uso de antibióticos ha provocado la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Los probióticos son unas de las principales herramientas para poder combatir a las enfermedades bacterianas. Dentro de este contexto, se evaluó la efectividad antimicrobiana de 11 cepas bacterianas aisladas de cultivos exitosos de varias etapas de producción de camarón. Se determinó la susceptibilidad de una cepa *Vibrio parahaemolyticus*, patógena para camarón *Penaeus vannamei*, frente a las cepas bacterianas mediante pruebas *in vitro* de antagonismo (antibiograma: métodos de difusión de tapón de agar y cúmulos). Las bacterias que mostraron mayor efectividad contra la cepa patógena *V. parahaemolyticus* en la prueba *in vitro* de antagonismo fueron seleccionadas para la prueba *in vitro* de competencia con la cepa patógena *V. parahaemolyticus*, con el objetivo de determinar la aptitud de crecimiento de las cepas bacterianas frente al patógeno mediante un co-cultivo de un grupo de bacterias (cepa bacteriana *versus* patógeno). Se realizó además una prueba de desafío de 48 horas con larvas de camarón *P. vannamei*, administrándoles por 7 días (en estadio larvario entre PL2 – PL8) en forma individual las cepas que presentaron mejor desempeño en las pruebas *in vitro*, para luego infectarlas (PL9) con la cepa patógena *V. parahaemolyticus*. Los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* fueron consistentes, encontrándose que la cepa ICA-29 es potencialmente probiótica. La información obtenida en este estudio será de vital importancia para continuar con las investigaciones sobre el potencial probiótico de esta cepa bacteriana.

Palabras Clave: probióticos, antibiogramas, pruebas de competencia entre pares de bacterias, prueba de desafío.

Abstract

Bacterial diseases cause economic losses in shrimp production. The use of antibiotics has led to the appearance of bacterial strains resistant to antibiotics. Probiotics are one of the main tools to control bacterial diseases. The antimicrobial effectiveness of 11 bacterial strains isolated from successful cultures of various stages of shrimp production was evaluated. The susceptibility of a *Vibrio parahaemolyticus* strain pathogenic to *Penaeus vannamei* shrimp was determined by *in vitro* antagonism tests (antibiograms: agar plug and cluster diffusion methods). The bacteria that showed the greatest effectiveness against the pathogenic *V. parahaemolyticus* strain in the *in vitro* antagonism tests were selected for the *in vitro* competition test with the pathogenic *V. parahaemolyticus* strain, with the objective of determining the growth aptitude of the bacterial strains against the pathogen by means of a co-culture of a group of bacteria (bacterial strain *versus* pathogen). A 48-hour challenge test was also carried out with *P. vannamei* shrimp larvae, administering them for 7 days (in larval stage between PL2 - PL8) individually the strains that presented the best performance in the *in vitro* tests, and then infecting them (PL9) with the pathogenic strain *V. parahaemolyticus*. The results of the *in vitro* and *in vivo* tests were consistent, showing that the strain ICA-29 is potentially a probiotic against *V. parahaemolyticus*. The information obtained in this study will be of vital importance for further research on the probiotic potential of this bacterial strain.

Keywords: probiotics, antibiograms, competition test between pairs of bacteria, challenge test.

Índice general

Resumen.....	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general.....	III
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VIII
CAPITULO I.....	1
1. Introducción.....	1
1.1. Descripción del problema.....	2
1.2. Justificación del problema.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	5
1.4. Marco teórico.....	5
1.4.1. Probióticos.....	5
1.4.2. Probióticos en el cultivo de camarón.....	5
1.4.3. Producción de compuestos antagónicos.....	7
1.4.4. Inmunomodulación.....	7
1.4.5. Exclusión competitiva.....	7
1.4.6. Mejora en la calidad de agua, supervivencia y crecimiento de los camarones.....	8
CAPÍTULO II.....	9
2. Metodología.....	9
2.1. Prueba <i>in vitro</i> de antagonismo de las cepas bacterianas.....	9
2.2. Pruebas <i>in vitro</i> de competencia entre grupos de bacteria.....	12
CAPITULO III.....	15
3. Resultados y análisis.....	15
3.1. Pruebas de antagonismo de las cepas bacterianas.....	15
3.2. Pruebas <i>in vitro</i> de competencia entre grupo de bacteria.....	16
CAPITULO IV.....	22

4. Conclusiones y recomendaciones	27
4.1 Conclusiones	27
4.2. Recomendaciones.....	28
Agradecimientos	29
Apéndice	35

Abreviaturas

AHPND	Necrosis hepatopancreática aguda
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
OD	Densidad óptica
OIE	Organización Internacional de Epizootias
OMS	Organización Mundial de la Salud
RAM	Resistencia a los antimicrobianos -
TSA	Agar de soya tríptico
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFC	Unidades formadoras de colonia
QS	Quorum sensing
WSSV	Virus de síndrome de la mancha blanca

Simbología

μL	Microlitro
g	Gramos
L	Litro
Mg	Miligramo
mL	Mililitros
nm	Nanómetros

Índice de figuras

AHPND Necrosis hepatopancreática aguda	V
Figura 1 Probióticos en la acuicultura, modos de acción para el mejoramiento de la salud, crecimiento y calidad de agua en cultivos de camarón. [12]	6
Figura 2. Vía inmunitaria intracelular probiótica en camarones. [13]	7
Figura 3. Probióticos: Mecanismos de promoción de crecimiento animal [14]	8
Figura 4. Siembra de cepas probióticas y patógenas. Creado en BioRender.com (2023).	10
Figura 5. Activación de cepa patógena. Creado en BioRender.com (2023).	11
Figura 6. Pruebas de antagonismo por difusión de tapón de agar y por cúmulos. Creado en BioRender.com (2023).	12
Figura 7. Preparación de las cepas bacterianas. Creado en BioRender.com (2023).	13
Figura 8. Crecimiento bacteriano por 24 horas. Lectura de OD (600 nm) cada 2 horas y siembra para conteo de UFC cada 4 horas. Creado en BioRender.com (2023).	14
Figura 9. Curvas de crecimiento individuales (UFC/mL) de cinco cepas bacterianas observadas cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 24 horas.	16
Figura 10. Curvas de crecimiento individuales de cinco cepas bacterianas registradas con un lector de placas espectrofotómetro Varioskan LUX a una longitud de onda de 600 nm, durante 24 horas.	17
Figura 11.- Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de la cepa bacteriana ICA-29 y la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.	18
Figura 12. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de la cepa bacteriana MRS-57 y la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.	18
Figura 13. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de las cepas bacterianas ICA-29, y MRS-57, y la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.	19
Figura 14. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de las cepas bacterianas ICA-29, ICA-67 y MRS-57, y la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.	20
Figura 15. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de la cepa bacterianas ICA-29, bacteria probiótica <i>Vibrio diabolicus</i> cepa ILI (control), y la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.	21
Figura 16.- Supervivencia promedio (\pm desviación estándar) de postlarvas de camarón (PL11) que recibieron administración de seis de las cepas bacterianas del estudio (D19, ICA-67, NB84, MRS-57, ICA-29 e ICA-73) durante 7 días (PL2-PL8) y que fueron infectadas con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cuando llegaron al estadio PL9.	24

Índice de tablas

Tabla 1.- Susceptibilidad de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> BA94C2 frente a 11 cepas bacterianas aisladas de cultivos de camarón <i>P.vannamei</i> , determinada con pruebas in vitro de antagonismo (antibiograma) mediante los métodos de difusión de tapón de agar y cúmulos.....	15
Tabla 2. Cuadro comparativo de los costos requeridos para realizar una prueba de antibiograma vs prueba de competencia entre grupos de bacterias, asumiendo gastos indirectos del 10% y utilidad del 30%.....	25
Tabla 3. Cuadro comparativo de las características de las pruebas in vitro de antibiograma y prueba de competencia entre grupo de bacterias.....	26

CAPITULO I

1. Introducción

El cultivo de camarón es el primer producto de exportación no petrolero del Ecuador. En el 2022 Ecuador superó el millón de toneladas de exportación de camarón, generando divisas por más de \$7 mil millones [1]; lo cual representó el 25,53% de las exportaciones no petroleras del país y, el 18,9% de las exportaciones totales del Ecuador [1]. Además, en el hemisferio occidental el Ecuador es el mayor productor de camarón, y unos de los mayores productores a escala mundial [1].

Según la Organización Internacional de Epizootias (OIE), las enfermedades bacterianas son uno de los principales obstáculos para el cultivo de camarón [2]. Las enfermedades bacterianas, y entre ellas las comúnmente conocidas como vibriosis provocadas por bacterias del género *Vibrio*, han provocado devastadoras pérdidas económicas en todo el mundo [2,3]. Se estima una pérdida del 20% de las producciones totales mundiales por infecciones bacterianas en los años recientes [4].

La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una vibriosis ocasionada generalmente por bacterias de la especie *Vibrio parahaemolyticus* [5]. AHPND puede generar altas mortalidades en postlarvas o juveniles de camarón durante los primeros días de cultivo [5,6,7]. Los impactos económicos de la enfermedad son importantes, así desde la década del 2010 se ha reportado pérdidas por más de \$10 mil millones, lo que representa pérdidas anuales de aproximadamente \$1 mil millones anuales [1].

Una de las alternativas más utilizadas como tratamientos y profilaxis para combatir las enfermedades bacterianas son los antibióticos [6]. Las sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol y nitrofuranos son usadas en la acuicultura [8,9] y existen reportes de uso de amoxicilina, florfenicol, sulfadiazina, y eritromicina en cultivo de camarón [9]. El uso desmedido y malas prácticas de estos antimicrobianos han provocado la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Resistencia a los antimicrobianos - RAM) [6]. En consecuencia, países como Estados Unidos, y los de la Unión Europea han implementado medidas estrictas para el control de antibióticos [10].

Dado que estos países son importantes mercados para el camarón ecuatoriano es necesario cumplir sus regulaciones en materia de antibióticos. Las Agencias Federales de Estados Unidos de Protección Ambiental (EPA) y de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) permiten el uso de oxitetraciclina, florfenicol, sulfadiazina y sulfadimetoxina para un limitado número de especies acuícolas [11]. Mientras que en el Ecuador se encuentra prohibido la importación y comercialización de enrofloxacin [12].

Los probióticos han demostrado ser uno de los mejores sustitutos para los antibióticos en el control de enfermedades bacterianas en camarón de cultivo [9,13], ya que además de ser una alternativa natural ayudan a mejorar la respuesta del sistema inmune [14], el crecimiento de los camarones [9] y la calidad del agua de cultivo de camarón [15]. Por lo tanto, el uso de probióticos se ha convertido en una de las mejores alternativas para el control de enfermedades bacterianas en la producción de camarón.

1.1. Descripción del problema

Las altas producciones de camarón conllevan a la intensificación de los cultivos, lo que puede provocar situaciones de estrés para los animales [16], deterioro de la calidad de agua por alta carga

de materia orgánica, y consecuentemente cambios en los parámetros de calidad de agua [16]. Esto conlleva a que bacterias primarias y oportunistas tengan medios favorables para su crecimiento, lo que puede generar brotes de infecciones bacterianas en el ambiente de cultivo. Si estas infecciones bacterianas no son tratadas a tiempo y adecuadamente pueden provocar altas mortalidades y mermar la producción de camarón [17].

Dentro de las enfermedades bacterianas la vibriosis es la más frecuente, y se presenta tanto en la fase larvaria del camarón como en la de engorde, siendo la principal causa de mortalidad en las etapas iniciales de cultivo [17]. Los antibióticos han sido usados como antibacterianos para el control de vibriosis. Sin embargo, el uso prolongado de los antibióticos puede inducir el desarrollo de bacterias resistentes a estos antimicrobianos [18]. Además, pueden permanecer residuos de antibióticos en el medio ambiente, convirtiéndose en un problema de salud pública y ambiental [18]. En consecuencia, los mercados internacionales han limitado el uso de antibióticos en los cultivos de camarón [10].

Por lo tanto, es indispensable buscar soluciones basada en la naturaleza para el manejo de las enfermedades bacterianas y evitar las mortalidades masivas [16]. Ante esta necesidad surgen los probióticos como una alternativa natural para controlar eficazmente los agentes patógenos de manera sostenible [19]. Adicionalmente, dado que en el mercado circulan una gran variedad de probióticos comerciales es importante incrementar la versatilidad de metodologías con las que se pueda evaluar la efectividad de los probióticos [20].

1.2. Justificación del problema

Si bien actualmente la producción de camarón en el país está en continuo crecimiento, no siempre fue así, habiendo pasado por crisis sanitarias graves. Por ejemplo, la epidemia provocada por el síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV) entre 2000 y 2003 provocó una crisis en la

industria acuícola. Este problema refleja la susceptibilidad que tiene el país ante la aparición de patógenos letales, si no son tratados a tiempo y debidamente. [21].

Los probióticos son una promesa para el tratamiento de la vibriosis debido a la diversidad de mecanismos de acción, tales como antagonismo, exclusión competitiva por sitios de adhesión, competencia de nutrientes e interrupción del *quorum sensing* de las bacterias patógenas [22]. Es importante que los productores utilicen correctamente los probióticos ya que algunas veces se utilizan ciertos productos en forma empírica, por esta razón debe primero determinarse mediante la efectividad de los probióticos a nivel experimental, tales como pruebas *in vitro* y pruebas *in vivo* de desafío [20].

La industria del cultivo de camarón es un sector productivo clave para Ecuador. La industria genera numerosas plazas de empleo directas e indirectas promoviendo un avance en la comunidad [23]. Las exportaciones de camarones sumaron \$5.323 millones en 2021, lo que representó un crecimiento del 39% frente al 2020. Mientras que las exportaciones de camarón para los primeros 4 meses del 2022 ascendieron a \$2.387 millones, con un crecimiento aproximado del 79% frente al mismo periodo del 2021 [23]. En consecuencia, es imperativo la búsqueda de probióticos eficaces que puedan combatir enfermedades bacterianas emergentes y remergentes para contribuir a la sostenibilidad de la industria de cultivo de camarón.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la efectividad de bacterias aisladas de cultivos exitosos de camarón *Penaeus vannamei* mediante pruebas *in vitro* contra *Vibrio parahaemolyticus*

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la efectividad de cepas bacterianas aisladas de cultivos exitosos de camarón *Penaeus vannamei* mediante pruebas *in vitro* de antagonismo contra *Vibrio parahaemolyticus*.
- Evaluar la efectividad de cepas bacterianas potencialmente probióticas mediante pruebas *in vitro* de competencia contra *Vibrio parahaemolyticus*.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Probióticos

La palabra probiótico proviene del griego *pro*, que significa “para”, y *bios*, que implica “vida” [21,24]. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la salud (OMS), los probióticos son aquellos microorganismos vivos capaces de proporcionar beneficios en la salud del hospedero [25] cuando se suministra en concentraciones adecuadas. En resumen, los probióticos son productos a base de bacterias beneficiosas que ayudan a promover la salud animal, prevenir múltiples enfermedades y evitar el crecimiento de patógenos.

1.4.2. Probióticos en el cultivo de camarón

Debido al riesgo por la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, los efectos ambientales producidos por los residuos de antibióticos y al incremento de la demanda de la producción de los alimentos, se ha vuelto crucial la búsqueda de alternativas naturales que reemplacen los antimicrobianos y promuevan beneficios con respecto a la salud animal [26,27].

Los probióticos son unas de las principales alternativas naturales para el control de enfermedades provocados por cepas bacterianas patógenas [28,29]. Los probióticos pueden administrarse en el

agua o como complemento en el alimento [30], induciendo efectos potencialmente beneficiosos a la salud del animal a través de la modulación directa de la salud del huésped, o mejorando de forma indirecta la calidad ambiental del sistema de cultivo [25,30,31].

En la acuicultura, los probióticos han ayudado a combatir y suprimir microorganismos dañinos [32]. Entre los géneros más utilizados en la acuicultura se encuentran: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus spp*, entre otros [13,26]. Además, es indispensable encontrar cepas probióticas que no produzcan sustancias tóxicas para el hospedero, y que se encuentren equipadas con varios mecanismos de acción tales como la producción de compuestos antagónicos, inmunomodulación y exclusión competitiva, con los cuales se prevenga el desarrollo y proliferación de patógenos. El mejoramiento de una mejor respuesta inmune del camarón repercute en mejores desempeños productivo, tales como incremento de la supervivencia y de las tasas de crecimientos de los camarones [13,33] (Figura 1).

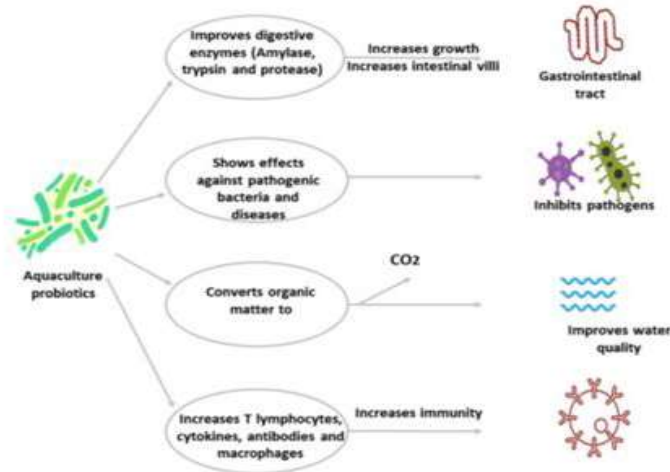


Figura 1 Probióticos en la acuicultura, modos de acción para el mejoramiento de la salud, crecimiento y calidad de agua en cultivos de camarón. [12]

1.4.3. Producción de compuestos antagónicos

Los probióticos producen metabolitos antimicrobianos como antibióticos, bacteriocina, enzimas líticas y ácidos orgánicos que son capaces de proteger al hospedero por sus efectos antagonistas contra los patógenos y por la modulación de la respuesta inmunitaria de los camarones [27,30].

1.4.4. Inmunomodulación

Los camarones poseen tres tipos de células hemocitarias (Figura 2), los cuales desempeñan las funciones de respuestas inmunitarias innatas en los camarones [34]. Los probióticos mejoran la respuesta inmune y reducen la susceptibilidad a enfermedades de carácter microbiano mediante la estimulación de la actividad antimicrobiana y mejorando las células hemolíticas [30,35,36].

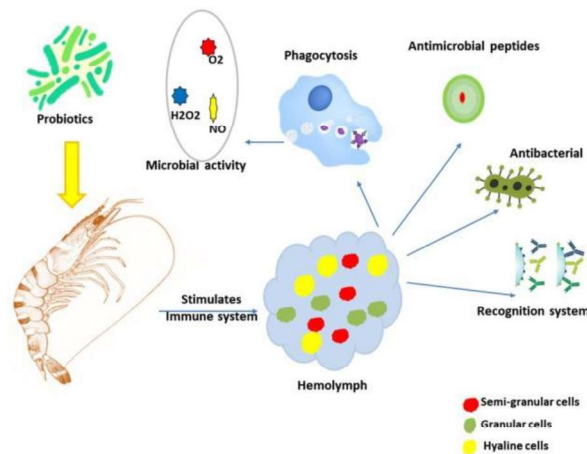


Figura 2. Vía inmunitaria intracelular probiótica en camarones. [13]

1.4.5. Exclusión competitiva

Muchas bacterias patógenas en las primeras etapas de infección se caracterizan por la colonización de los tractos gastrointestinales del hospedero [37]. Por consiguiente, el probiótico candidato para emplearse no solo debe tener una fase de latencia corta, también debe tener la capacidad de adherirse y colonizar las membranas mucosas del hospedador, excluyendo competitivamente a los

patógenos [32,36,37] y compitiendo contra microorganismos, especialmente patógenos, por los nutrientes [32].

1.4.6. Mejora en la calidad de agua, supervivencia y crecimiento de los camarones

Las cepas probióticas Grampositivas del género *Bacillus*, han demostrado mejorar la calidad de agua promoviendo la descomposición de la materia orgánica [38]. En tal sentido, cepas *B. licheniformis* y *B. subtilis* disminuyen las concentraciones de nitrato y amoníaco dentro de los sistemas acuícolas [39]. Además, las cepas probióticas tienen la capacidad de aumentar la supervivencia en camarones [31]. Los probióticos también promueven el crecimiento de los animales, aunque el efecto puede variar según la cepa que se esté utilizando o la especie del animal [37]. Finalmente, es importante destacar que los probióticos efectivos promueven cambios en la composición del microbiota intestinal, aumento en las actividades enzimáticas y/o modificación de la morfología del intestino y del hepatopáncreas [39,40] (Figura 3).

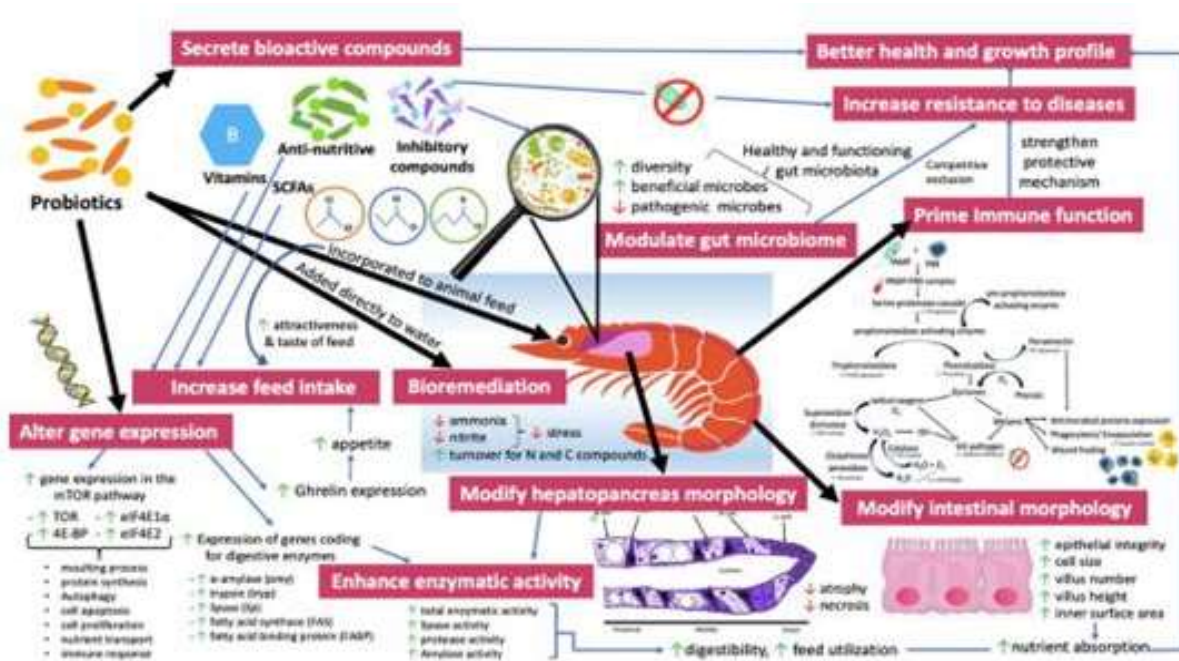


Figura 3. Probióticos: Mecanismos de promoción de crecimiento animal [14]

CAPÍTULO II

2. Metodología

Se seleccionaron 11 cepas bacterianas aisladas de cultivos exitosos de varias etapas de producción de camarón, y se evaluó la efectividad antimicrobiana de estas cepas en términos de susceptibilidad a la bacteria patógena de camarón *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 causante del síndrome de necrosis hepatopancreática aguda AHPND. La efectividad antimicrobiana se evaluó mediante pruebas *in vitro* de antagonismo (antibiograma) utilizando los métodos de difusión de tapón de agar y cúmulos. Las bacterias que mostraron mayor efectividad contra la cepa patógena *V. parahaemolyticus* en la prueba *in vitro* de antagonismo fueron seleccionadas para la prueba *in vitro* de competencia con la cepa patógena *V. parahaemolyticus*, con el objetivo de determinar la aptitud de crecimiento de las cepas bacterianas frente al patógeno mediante un co-cultivo de pares de bacterias (cepa bacteriana *versus* patógeno). Se utilizó como control la bacteria probiótica comercial *Vibrio diabolicus* cepa ILI (CENAIM-ESPOL) que ha demostrado ser un probiótico efectivo en el cultivo de camarón debido a su modo de acción antagónico contra bacterias patógenas *V. parahaemolyticus*. Los análisis se realizaron en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (CENAIM-ESPOL).

2.1. Prueba *in vitro* de antagonismo de las cepas bacterianas

Las once cepas bacterianas y la cepa patógena fueron activadas en agar tripticasa soya (TSA, Difco, Le Pont de Claix, Francia) suplementadas con 2% de NaCl (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos) y 2% de bacto agar (Difco, Le Pont de Claix, France), e incubadas por 24 horas a 30 °C (Figura 4).

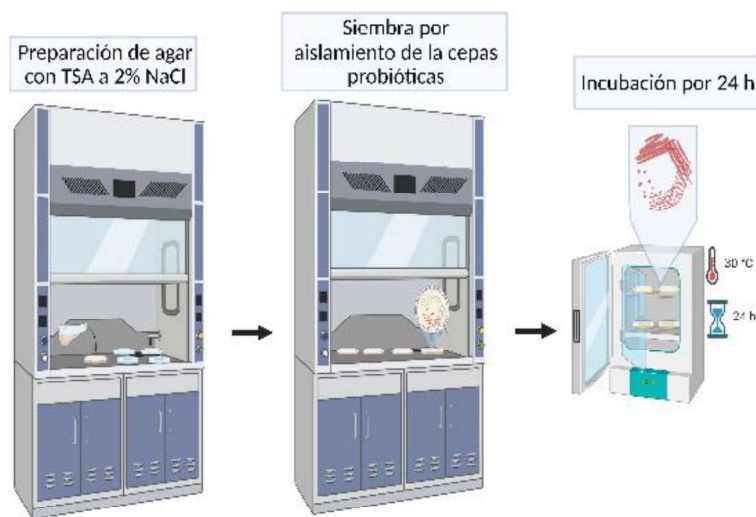


Figura 4. Siembra de cepas probióticas y patógenas. Creado en BioRender.com (2023).

Para el proceso de formación de los biofilms se procedió a evaluar la pureza de las cepas bacterianas inoculando nuevamente las cepas en las placas TSA e incubando para la formación de los respectivos biofilms. Para el proceso de pruebas de antagonismo se transfirió una colonia de la cepa patógena BA94C2 en medio TSB suplementado con 2% de NaCl. Se incubó en un agitador de tubos rotador por 2 horas. Posteriormente, se midió el crecimiento microbiano en un lector de placas espectrofotómetro Varioskan LUX, a una densidad óptica de 0.225 ± 0.01 unidades ($OD_{600\text{ nm}}$), equivalente a una concentración de 10^8 UFC/mL. Se realizaron diluciones seriadas con solución salina hasta alcanzar la concentración de 10^6 UFC/mL. Posteriormente, se inoculó 100 μl de la suspensión bacteriana en medio Mueller-Hinton suplementado con 2% de NaCl para formar una capa uniforme de césped bacteriano (Figura 5).

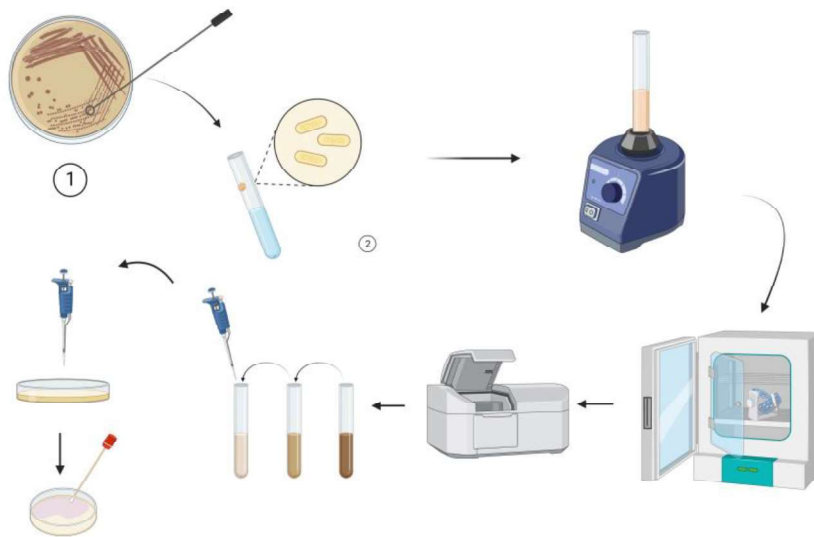


Figura 5. Activación de cepa patógena. Creado en BioRender.com (2023).

Se realizaron pruebas de antagonismo por cúmulos y por difusión de tapón de agar. Para el método de antagonismo por cúmulos se extrajo los cúmulos del biofilm formado de cada una de las cepas probióticas mediante un ligero raspado en la superficie de la placa con un asa estéril (Figura 6). Una vez formado el cúmulo se procedió a inocularlo en el centro de las placas de Mueller-Hinton que fueron previamente inoculadas con la cepa patógena mediante un hisopo estéril. Para el método de antagonismo por difusión de tapón de agar o disco, se procedió a cortar círculos con la punta de una pipeta estéril en el biofilm bacteriano formado. Una vez realizado este proceso se transfirieron los discos en las placas Mueller-Hinton que fueron previamente inoculadas con la cepa patógena. Las placas se incubaron por 24 y 48 horas a 30 °C en condiciones aeróbicas, para posteriormente efectuar la medición de inhibición (diámetros de halos de inhibición). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

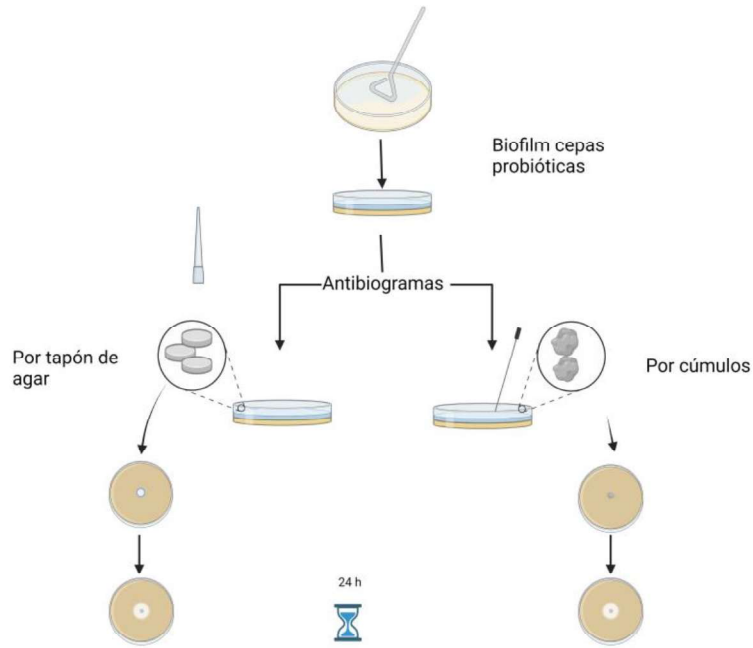


Figura 6. Pruebas de antagonismo por difusión de tapón de agar y por cúmulos. Creado en BioRender.com (2023).

2.2. Pruebas *in vitro* de competencia entre grupos de bacteria

Las cepas bacterianas seleccionadas para la prueba *in vitro* de competencia entre grupo de bacterias fueron aquellas que mostraron diámetros de inhibición más altos. Previamente, se realizaron las curvas de crecimiento individuales de las 11 cepas bacterianas (Figura 7).

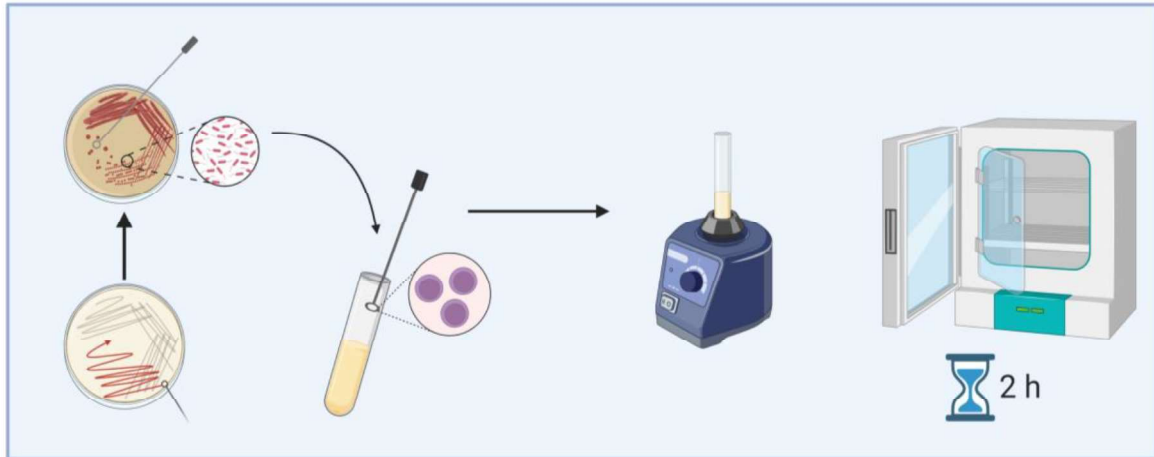


Figura 7. Preparación de las cepas bacterianas. Creado en BioRender.com (2023).

Para obtener el crecimiento individual de cada cepa bacteriana se midió la turbidez en un lector de placas espectrofotómetro Varioskan LUX, a una densidad óptica de 0.225 ± 0.01 unidades ($OD_{600\text{ nm}}$). Brevemente se realizó un inóculo bacteriano de 1×10^4 UFC/mL obtenido mediante diluciones seriadas (1:10) con solución salina. Posteriormente, se inoculó $100\ \mu\text{l}$ del inóculo a 1×10^4 UFC en un frasco con 100 mL de TSB suplementado con 2% de NaCl, el cual se sometió a lecturas periódicas de 2 horas en el espectrofotómetro Varioskan (Figura 8). Paralelamente, se realizó una siembra por superficie en placas de agar TSA al 2% de NaCl, mediante diluciones seriadas de la suspensión al 2% de NaCl cada 4 horas (Figura 8). El crecimiento de las cepas bacterianas fue observado durante un periodo de 12 horas. Culminado el tiempo se realizó el conteo de cada una de las placas Petri sembradas.

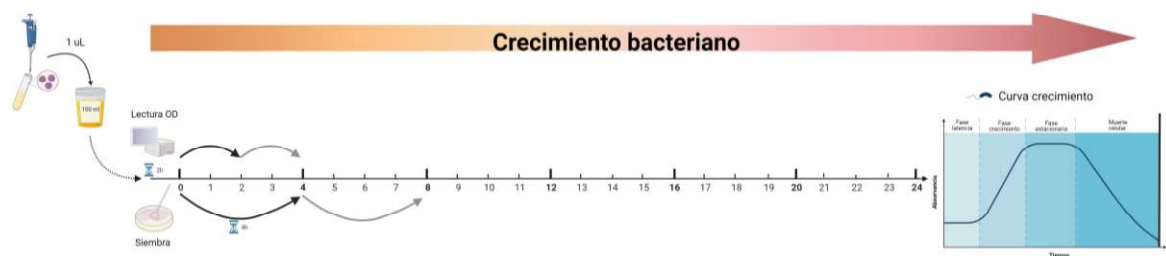


Figura 8. Crecimiento bacteriano por 24 horas. Lectura de OD (600 nm) cada 2 horas y siembra para conteo de UFC cada 4 horas. Creado en BioRender.com (2023).

En las pruebas de competencia entre pares de bacterias se evaluó las bacterias seleccionadas en las pruebas de antagonismo contra la cepa patógena BA94C2. Se incubó individualmente cada una de estas cepas bacterianas y la patógena toda la noche a 30 °C en cajas TSA suplementadas con 2% de NaCl. Posteriormente, se inoculó una sola colonia en tubos de 10 mL de TSB al 2% de NaCl. Para cada prueba de competencia entre pares de bacterias se inoculó el par de bacterias (cepa bacteriana *versus* Cepa patógena) en un frasco plásticos estéril con 100 mL de TSB al 2% de NaCl. Las cepas bacterianas analizadas iniciaron con una concentración de 10^6 UFC/mL. Mientras que la patógena inició con una concentración de 10^4 UFC/mL. Para el efecto, se inoculó 1 mL del cultivo bacteriano de los tubos de TSB que contenía las cepas bacterianas en frascos plásticos estériles con 100 mL de TSB al 2% de NaCl. Se realizaron siembras cada 2 horas durante un periodo de 12 horas para los conteos de UFC/mL en placas de TSA al 2% de NaCl identificando las bacterias por morfología. Al mismo tiempo se realizaron lecturas de turbidez cada 2 horas por un periodo de 12 horas en el equipo espectrofotómetro Varioskan LUX, a una longitud de onda de 600 nm. Esta última observación, aunque no podía desglosar el crecimiento de las cepas bacterianas analizadas y la patógena, sirvió como control de las observaciones de crecimiento realizadas en las placas de TSA.

CAPITULO III

3. Resultados y análisis

3.1. Pruebas de antagonismo de las cepas bacterianas

Todas las once cepas bacterianas provocaron antagonismo contra la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* utilizada en el estudio (Tabla 1). Las cepas ICA-29 y MRS-57 destacaron de entre el grupo por exhibir mayores actividades inhibitorias contra la cepa patógena, formando halos de 85 mm en las placas tratadas, tanto con el método de antagonismo de difusión de tapón de agar, como con el de cúmulos (Tabla 1). La cepa ICA-73 también generó halos de inhibición de 85 mm en la prueba de antagonismo por cúmulos, sin embargo, en la prueba de antagonismo de difusión de tapón de agar se observó una menor inhibición (50 mm, Tabla 1). La cepa con menor actividad inhibitoria fue ICA-47, con diámetros de halos de inhibición de entre 10 y 16 mm (Tabla 1). Estos resultados determinaron que las cepas bacterianas con mejor desempeño en las pruebas de antagonismo fueron ICA-29 y MRS-57.

Tabla 1.- Susceptibilidad de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* BA94C2 frente a 11 cepas bacterianas aisladas de cultivos de camarón *P.vannamei*, determinada con pruebas *in vitro* de antagonismo (antibiograma) mediante los métodos de difusión de tapón de agar y cúmulos.

Cepas bacterianas	Crecimiento inhibitorio 24 horas		Crecimiento inhibitorio 48 horas	
	Difusión de tapón de agar (mm)	Cúmulos (mm)	Difusión de tapón de agar (mm)	Cúmulos (mm)
19	30	28	38	35
ICA-67	20	28	25	41
TSB-24	28	31	33	35
TSA-29	22	34	28	44
ICA-29	85	85	85	85
NB-84	28	34	28	42
AM31	29	33	34	41
ICA-73	50	85	50	85
NB-24	28	30	31	35

ICA-47	10	11	15	16
MRS-57	85	85	85	85

3.2 Pruebas *in vitro* de competencia entre grupo de bacteria

A pesar de que las cepas bacterianas con mejores desempeños en las pruebas *in vitro* de antagonismo fueron ICA-29 y MRS-57, el crecimiento individual de cada una de las 11 cepas fue evaluado a lo largo del periodo de cuantificación de 12 horas, mostrando similares comportamientos entre ellas, y con máximos crecimientos entre las 6 y 10 horas (Figura 9). Como un ejemplo, la figura 9 muestra el crecimiento de un grupo de cinco de las 11 cepas, incluyendo a las cepas ICA-29 y MRS-57, así como a otras tres cepas (D19, ICA-67 y NB-84) que tuvieron menor desempeño en la prueba *in vitro* de antagonismo (Figura 9). Destacó el rápido crecimiento de la cepa ICA-29, que mostró un máximo de crecimiento a las seis horas de cuantificación (Figura 9).

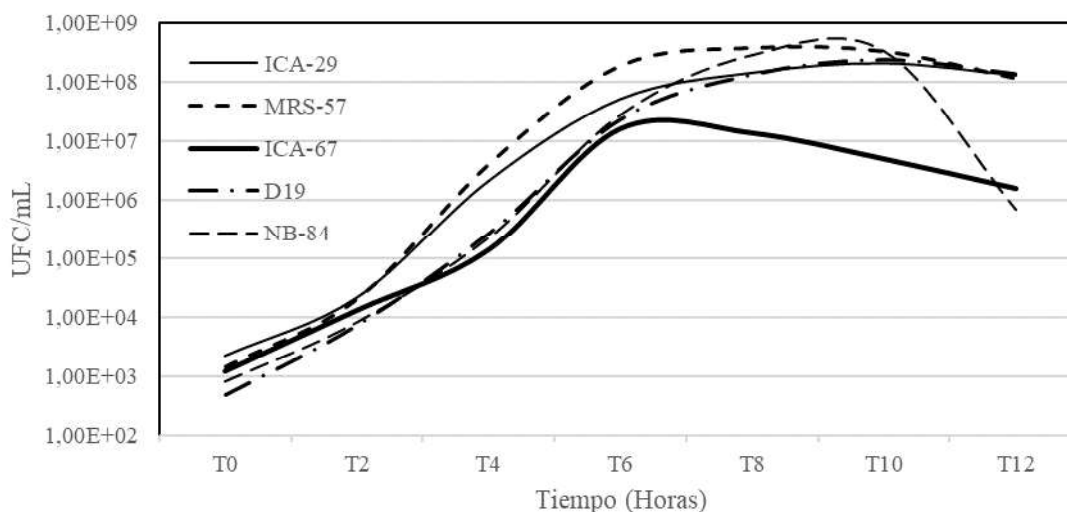


Figura 9. Curvas de crecimiento individuales (UFC/mL) de cinco cepas bacterianas observadas cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 24 horas.

Las curvas de crecimiento realizadas con el lector de placas espectrofotómetro Varioskan LUX mostró consistencia con los crecimientos de las bacterias obtenidas en las siembras de las placas de agar TSA, con crecimientos máximos entre las 10 y las 11 horas de medición (Figura 10).

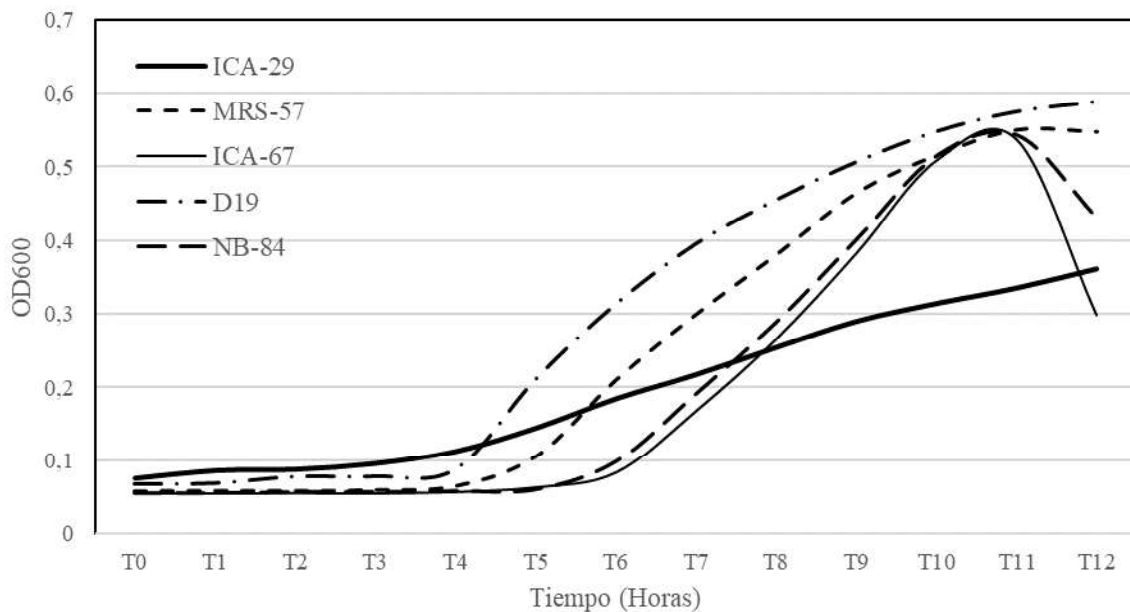


Figura 10. Curvas de crecimiento individuales de cinco cepas bacterianas registradas con un lector de placas espectrofotómetro Varioskan LUX a una longitud de onda de 600 nm, durante 24 horas.

Por otro lado, las pruebas de competencia entre pares de: cepa bacteriana y bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 mostró que la única cepa bacteriana que consistentemente presentó una habilidad para competir con la cepa patógena fue la cepa ICA-29 (Figura 11). En tal sentido, aunque la cepa MRS-57 en la prueba *in vitro* de antagonismo mostró una habilidad para inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* (Tabla 1), en la prueba de

competencia de pares presentó un decaimiento en el crecimiento a las 6 horas de cuantificación (Figura 12).

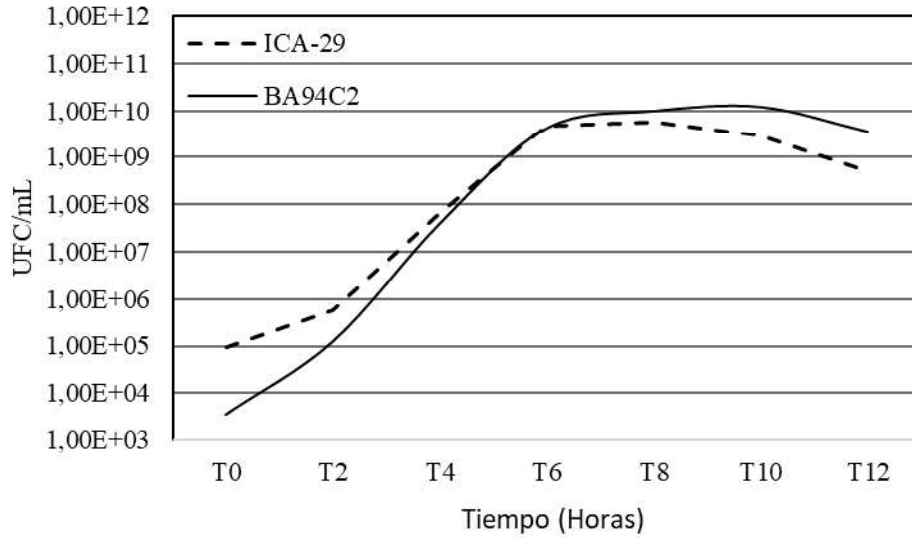


Figura 11.- Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de la cepa bacteriana ICA-29 y la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.

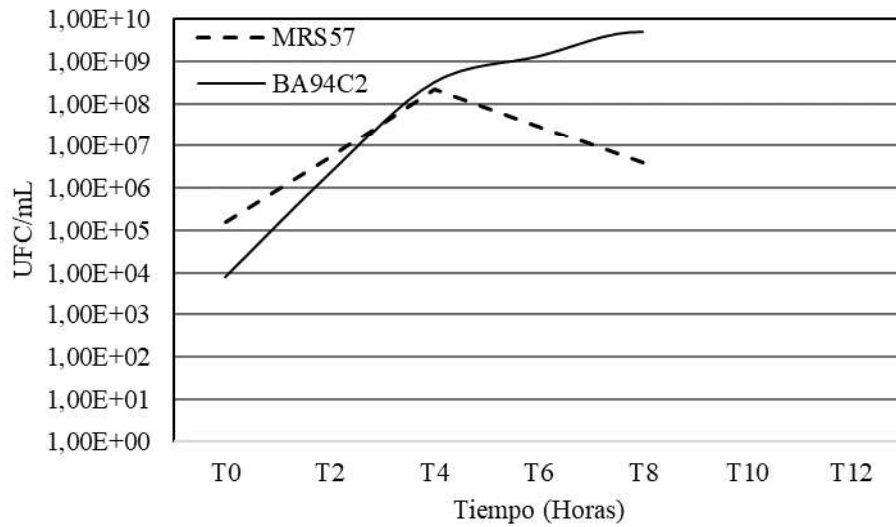


Figura 12. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de la cepa bacteriana MRS-57 y la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.

En forma consistente, cuando se colocó a crecer en forma conjunta las cepas ICA-29 y MRS-57 con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* también se observó que la cepa bacteriana ICA-29 lograba competir contra la bacteria patógena (Figura 13). En tanto que, la cepa MRS-57 inhibía su crecimiento a partir de las 4 horas de cuantificación (Figura 13).

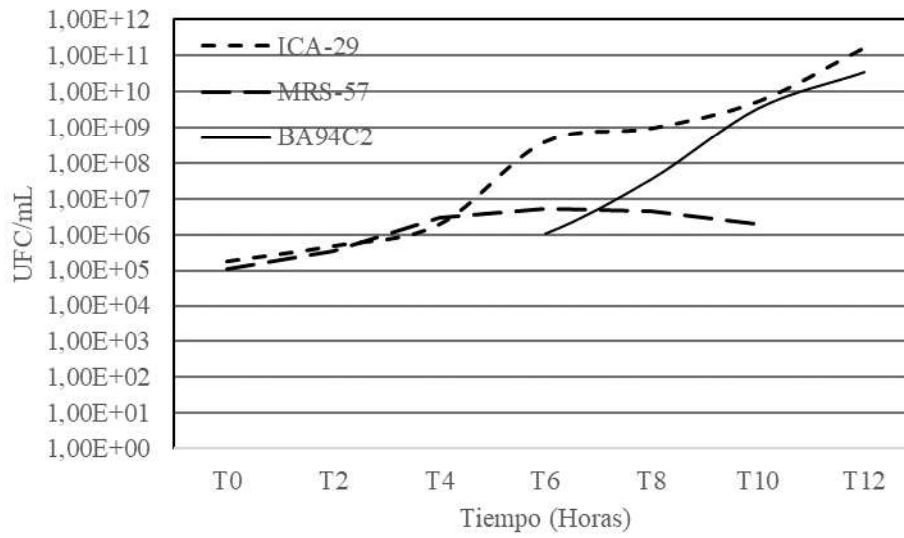


Figura 13. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de las cepas bacterianas ICA-29, y MRS-57, y la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.

De igual forma, cuando se incrementó el número de bacterias a tres cepas (ICA-29, MRS-57 e ICA-67) a competir con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* se volvió a observar el patrón consistente en que la cepa ICA-29 era la de mejor desempeño en términos de habilidad para competir contra la bacteria patógena (Figura 14). En tanto que las otras dos cepas (MRS-57 y ICA-67) dejaron de crecer a las 6 horas de cuantificación (Figura 14).

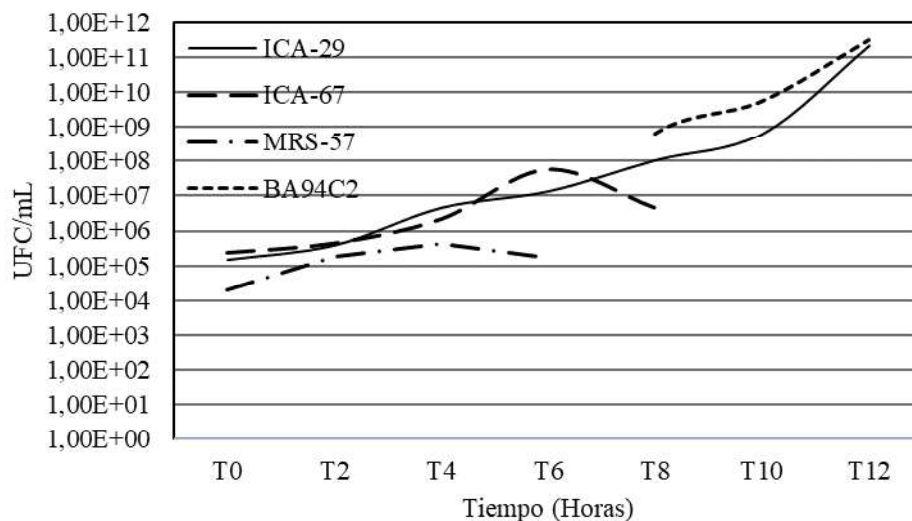


Figura 14. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de las cepas bacterianas ICA-29, ICA-67 y MRS-57, y la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.

Finalmente, cuando se colocó la cepa bacteriana ICA-29 en forma conjunta con la bacteria probiótica *V. diabolicus* cepa ILI y la bacteria patógena *V. parahaemolyticus*, se observó que, aunque a las 12 horas de cuantificación la concentración de la cepa bacteriana ICA-29 disminuyó comparado con el probiótico comercial de control, este se mantenía compitiendo con la bacteria patógena (Figura 15). Los resultados de este estudio muestran que la cepa ICA-29 es potencialmente probiótica, y que debe ser considerada para posteriores estudios para confirmar tal potencialidad.

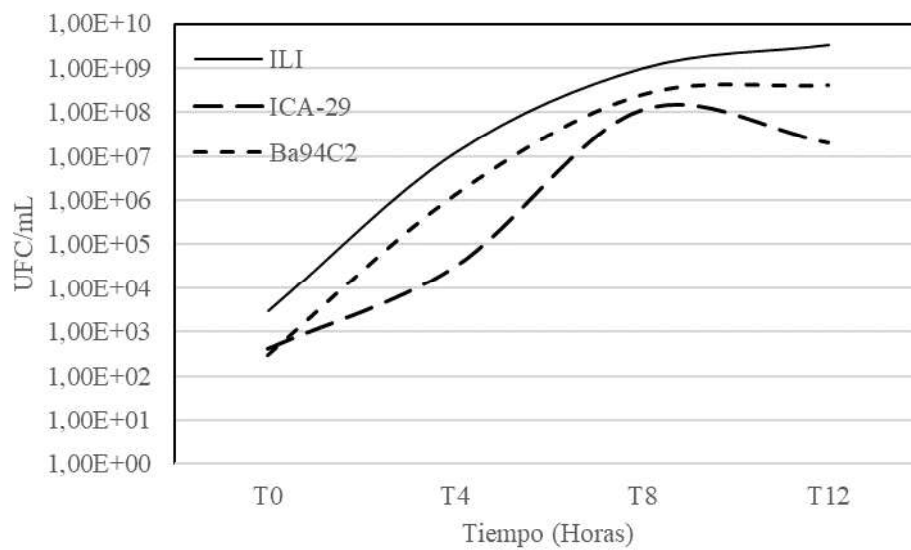


Figura 15. Curvas de crecimiento (UFC/mL) conjunto de la cepa bacterianas ICA-29, bacteria probiótica *Vibrio diabolicus* cepa ILI (control), y la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 registrada cada 2 horas durante un periodo de cuantificación de 12 horas.

CAPITULO IV

Prueba adicional *in vivo* de desafío de postlarvas de camarón *P. vannamei* con *V. parahaemolyticus*

Como una parte adicional a los objetivos de este estudio de evaluar la efectividad de las 11 bacterias aisladas de cultivos de camarón *P. vannamei* mediante pruebas *in vitro* con *V. parahaemolyticus* se realizó una prueba adicional consistente en una prueba de desafío con postlarvas de camarón *P. vannamei*. Así, postlarvas de camarón *P. vannamei* recibieron en forma individual la administración diaria de seis de las cepas bacterianas del estudio (D19, ICA-67, NB84, MRS-57, ICA-29 e ICA-73). La administración de las bacterias se realizó al agua de cultivo (concentración final en el agua de cultivo = 10^5 UFC/mL) entre los estadios PL2 a PL8. Cuando las postlarvas de camarón alcanzaron el estadio PL9 se realizó un desafío con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa BA94C2 (concentración final en el agua de cultivo = 10^4 UFC/mL), inoculando la cepa patógena al agua de cultivo. Esta prueba se realizó en vasos plásticos de capacidad de 300 mL (4 réplicas), a una densidad de 30 postlarvas de camarón por unidad experimental. La inoculación de la bacteria patógena se realizó por una sola vez. El experimento continuó por otras 48 horas, luego de lo cual se contaron las postlarvas supervivientes, cuando llegaron al estadio PL11. Se incluyeron dos tratamientos adicionales para el análisis estadístico: postlarvas de camarón que recibieron la administración diaria de la bacteria probiótica comercial *V. diabolicus* cepa ILI, y que fueron infectadas con la cepa patógena, y un control positivo de postlarvas de camarón que no recibieron la administración de ninguna cepa bacteriana, pero que fueron infectadas con la cepa patógena. Además, se incluyó un control no infectado (postlarvas que no recibieron ninguna de las cepas bacterianas y que tampoco fueron infectadas con la cepa patógena). Adicional a estos tratamientos y controles, se incluyeron unidades experimentales

donde las postlarvas de camarón recibieron la administración de cada una de las cepas bacterianas utilizadas en el desafío, pero que luego no fueron infectadas con la bacteria patógena (controles para observar un potencial efecto tóxico de las cepas bacterianas). Las postlarvas de todas las unidades experimentales de los tratamientos y controles recibieron una alimentación cada dos horas con una misma dieta seca comercial. La temperatura de cultivo fue aproximadamente 31 °C. Todas las unidades experimentales de los tratamientos y controles recibieron aireación continua y tuvieron el mismo manejo de alimentación y administración de las bacterias potencialmente probióticas.

Cuando las larvas fueron cosechadas en PL11 no se observó diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$ según ANOVA de una vía, Figura 16). A pesar de que no hubo diferencias significativas, se observó un buen desempeño de algunas de las cepas bacterianas, destacando otra vez las cepas ICA-29 y MRS-57 (Figura 16). Además, se observó que las cepas bacterianas no mostraron un efecto de toxicidad dado que no hubo diferencias significativas entre las supervivencias de las postlarvas que recibieron los tratamientos de las cepas bacterianas y que no fueron infectadas comparadas con el control no infectado (postlarvas que no recibieron ninguna de las cepas bacterianas y tampoco fueron infectadas con la cepa patógena).

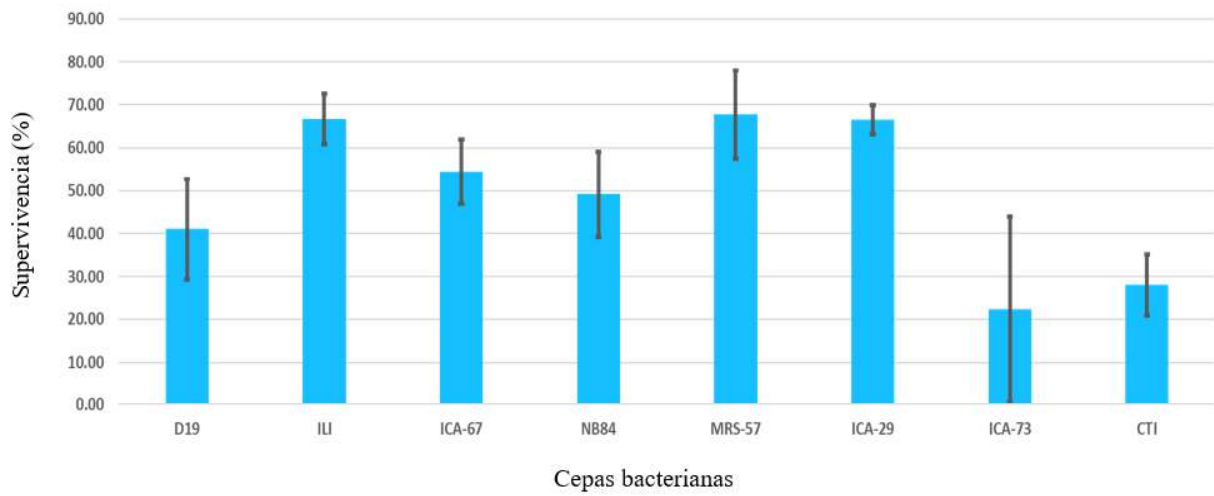


Figura 16.- Supervivencia promedio (\pm desviación estándar) de postlarvas de camarón (PL11) que recibieron administración de seis de las cepas bacterianas del estudio (D19, ICA-67, NB84, MRS-57, ICA-29 e ICA-73) durante 7 días (PL2-PL8) y que fueron infectadas con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cuando llegaron al estadio PL9.

Comparación de las pruebas *in vitro* de antagonismo (antibiogramas) y de competencia entre grupo de bacterias

La tabla 2 muestra el resumen del análisis de costos de las pruebas *in vitro* de antagonismo (antibiogramas) y de competencia entre grupos de bacterias. Para este análisis se consideró el costo de los materiales, equipos (considerando el costo del equipo y la depreciación) y personal (considerando solamente el salario correspondiente al tiempo que un técnico utiliza para realizar el análisis). Además, se asumió un 10% de gastos indirectos y una utilidad del 30%. El costo final de la prueba *in vitro* de antagonismo fue de \$39.18. En tanto que, el costo de la prueba *in vitro* de competencia entre grupos de bacterias fue \$63.78.

Tabla 2. Cuadro comparativo de los costos requeridos para realizar una prueba de antibiograma vs prueba de competencia entre grupos de bacterias, asumiendo gastos indirectos del 10% y utilidad del 30%.

	Costo (\$) de la prueba <i>in vitro</i> de antagonismo (antibiogramas)	Costo (\$) de la prueba <i>in vitro</i> de competencia entre grupo de bacterias
Materiales	7.00	23.20
Equipo	4.30	8.50
Personal	16.10	12.90
Gastos indirectos 10%	2.74	4.46
Utilidad 30%	9.04	14.72
Precio final por muestra	39.18	63.78

Se considera que las dos pruebas *in vitro* son complementarias y se sugiere que la prueba de competencia entre grupos de bacterias debería realizarse en forma complementaria a la de antibiogramas, a pesar de que esta última presenta un mayor costo. El objetivo de la prueba *in vitro* de antagonismo (antibiogramas) es evaluar la capacidad de un antimicrobiano para inhibir o impedir el crecimiento de una bacteria patógena (Tabla 3). Por su lado, el objetivo de la prueba *in vitro* de competencia entre grupos de bacterias evalúa el crecimiento de un par, o más de dos bacterias, durante un periodo de tiempo (Tabla 3). Aunque ambas pruebas *in vitro* evalúan la habilidad del antimicrobiano para competir con la bacteria patógena, la prueba de competencia

entre pares muestra una versatilidad que debe ser considerada a la hora de evaluar consorcios de bacterias potencialmente probióticas (Tabla 3). Así, con esta última prueba se puede analizar el crecimiento de un consorcio de bacterias a la vez en distintas combinaciones, lo que puede ser una herramienta útil si se desea estudiar el efecto de un coctel de bacterias para competir contra una bacteria patógena (Tabla 3). Sin embargo, dado que la metodología usada en este trabajo consistió en la cuantificación de las colonias mediante siembra, resulta limitado el número de bacterias que se pueden colocar en una caja, ya que el conteo se realiza en función de la morfología de las cepas bacterianas (Tabla 3). La prueba *in vitro* de competencia entre grupo de bacterias presenta además la ventaja de que se puede evaluar la cinética del crecimiento del consorcio de bacterias durante un periodo de tiempo determinado, lo cual ofrece ventajas para profundizar en las interacciones (sinergia/competencia) que se establezcan entre las bacterias analizadas (Tabla 3). Por su lado, la prueba *in vitro* de antagonismo tiene un menor costo y presenta la ventaja que se puede analizar algunos antimicrobianos en una misma corrida de análisis (siempre entre par: antimicrobiano *versus* patógeno), pero está limitada a estudiar la inhibición entre un par de bacterias a un mismo tiempo (antimicrobiano *versus* patógeno) (Tabla 3).

Tabla 3. Cuadro comparativo de las características de las pruebas *in vitro* de antibiograma y prueba de competencia entre grupo de bacterias.

Criterio de análisis	Prueba <i>in vitro</i> de antagonismo (antibiogramas)	Prueba <i>in vitro</i> de competencia entre grupo de bacterias
Objetivo de la prueba	Evalúa la capacidad de un antimicrobiano para inhibir o impedir el crecimiento de una bacteria patógena.	Evalúa el crecimiento de un par, o más de dos bacterias durante un periodo de tiempo.
Tipo de resultado	Inhibición de la bacteria patógena por efecto del antimicrobiano (diámetro del halo de inhibición).	Carga bacteriana (UFC) en el tiempo de todas las bacterias que están creciendo al mismo tiempo.
Costo	\$39.18/muestra	\$63.78/muestra
Tiempo de análisis	24 horas	24 horas

	Limitada a estudiar la inhibición entre un par de bacterias a un mismo tiempo: antimicrobiano <i>versus</i> patógeno.	Posibilidad de analizar el crecimiento de un consorcio de bacterias a la vez en distintas combinaciones. Ejemplo: Antimicrobiano 1 + Patógeno 1 Antimicrobiano 1 + Antimicrobiano 2 + Patógeno 1, entre otras combinaciones posibles.
Versatilidad	Se puede analizar algunos antimicrobianos en una misma corrida de análisis, pero siempre entre par: antimicrobiano <i>versus</i> patógeno	El número de bacterias que se ponen a crecer al mismo tiempo (consorcio) es limitado.
	Un solo resultado en el tiempo (al finalizar las 24 horas de observación).	Análisis en el tiempo de la cinética del crecimiento del consorcio de bacterias.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se concluye que la cepa ICA-29 es una cepa potencialmente probiótica. La información obtenida en este estudio será de vital importancia para continuar con las investigaciones sobre el potencial probiótico de esta cepa bacteriana.

Se estandarizó la prueba de competencia entre grupo de bacterias, la cual constituye una prueba *in vitro* versátil que tiene una alta potencialidad de ser ofertada como una herramienta de análisis para evaluar la efectividad y cinética en el tiempo de un consorcio de bacterias. El investigador podría customizar el flujo de análisis de las pruebas *in vitro*. Por ejemplo, si se cuenta con un conjunto grande de cepas posiblemente probióticas, se puede realizar un primer filtro usando las pruebas de antibiogramas para seleccionar las cepas bacterianas con mayor capacidad de inhibir a la bacteria patógena. Una vez identificadas las bacterias con mayor antagonismo, estas pueden ser usadas en una prueba de competencia entre grupos de bacterias en donde se evalúa la dinámica de ese consorcio de bacterias a través del tiempo. Este flujo de análisis puede constituirse en una herramienta útil para el desarrollo de un coctel de probióticos que actúen en sinergia con el objetivo de reducir las mortalidades en los cultivos de camarón y mejorar la rentabilidad.

4.2. Recomendaciones

Los resultados de este estudio muestran que la cepa ICA-29 es potencialmente probiótica, y que debe ser considerada para posteriores estudios para confirmar tal potencialidad.

Se recomienda para todos los procesos de análisis seguir las normas de bioseguridad para evitar una posible contaminación de las placas o lectura de datos erróneos. Utilizar correctamente las proporciones de agar a utilizar dependiendo del medio que se vaya a utilizar, así como también el correcto uso del autoclave y correcta configuración para evitar sobre cocinar el agar o que le falte cocción. Utilizar guantes todo el tiempo que se manipule muestras en la cámara de seguridad, así como un correcto uso del alcohol y evitar el uso de accesorios como anillos, pulseras; etc. Para un correcto uso de las placas primero se recomienda que el agar se enfríe quedando solamente tibio ligeramente y de ahí empezar a plaquear, caso contrario se empañan las placas y éstas pueden contaminarse. Antes de plaquear es recomendable dejar las placas en la cámara a luz ultravioleta alrededor de 10 a 15 minutos y una vez plaqueado dejarlas igualmente de 10 a 15 minutos. Otras de las recomendaciones de vital importancia para una correcta obtención de datos es ser preciso con las mediciones y no dejar pasar el tiempo ya que las bacterias van creciendo. Recomendamos para una correcta medición en el equipo espectrofotómetro manipular correctamente la placa micro Elisa, de lo contrario al momento de medir la densidad óptica se puede generar datos erróneos. Finalmente recomendamos verificar la pureza de las cepas bacterianas cuando se realizan estos tipos de análisis.

Agradecimientos

El presente proyecto estuvo enmarcado en el proyecto de Investigación Inédita “Biotecnología Azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando Vibrios patógenos código PIC-21-INE-ESPOL-004” en el marco del programa INEDITA financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

Bibliografía

- [1] Zeonatec (año 2023), ficha sectorial camarón en exportación. Obtenido de <https://www.zeonatec.com/post/ecuador-camaronero-en-2022>
- [2] Yu, Y.-B., Choi, J.-H., Kang, J.-C., Kim, H. J., & Kim, J.-H. (2022). Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review. *Microbial Pathogenesis*, 166(105545), 105545. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105545>
- [3] Hossain, M. M. M., Uddin, M. I., Islam, H., Fardoush, J., Rupom, M. A. H., Hossain, M. M., Farjana, N., Afroz, R., Hasan-Uj-Jaman, Roy, H. S., Shehab, M. A. S., & Rahman, M. A. (2020). Diagnosis, genetic variations, virulence, and toxicity of AHPND-positive *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon*. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 28(6), 2531–2546. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00607-z>
- [4] Banco Central del Ecuador. (año 2020). Ficha Sectorial Camarón. Obtenido de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/fichas-sectoriales-1-trimestre/Ficha-Sectorial-Camaron.p>
- [5] Letchumanan, V., Chan, K., & Lee, L. (2017). *Vibrio parahaemolyticus*: revisión de la patogenicidad, prevalencia y técnicas avanzadas de identificación molecular. *Microbiol Frontal* 5, 1 - 10.
- [6] Aranguen, L, Hung N & Noble, B (año 2020), enfermedad crónica AHPND. Obtenido de <https://www.globalseafood.org/advocate/ahpnd-es-una-enfermedad-cronica-del-camaron-blanco-del-pacifico-de-america-latina/>
- [7] Amatul-Samahah MA, Wan Omar WHH, Mohd Ikhsan NF, Azmai MNA, Zamri-Saad M, Ina-Salwany MY (2020) Ensayos de vacunación contra la vibriosis en camarones: una revisión. *Aquac Rep* 18:100471. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- [8] Khan, M., & Lively, J. A. (2020). Determination of sulfite and antimicrobial residue in imported shrimp to the USA. *Aquaculture Reports*, 18(100529), 100529. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100529>
- [9] Goh, J. X. H., Tan, L. T. H., Law, J. W. F., Khaw, K. Y., Zengin, G., Chan, K. G., ... & Goh, B. H. (2023). Probiotics: Comprehensive Exploration of the Growth Promotion Mechanisms in Shrimps. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 6(1).

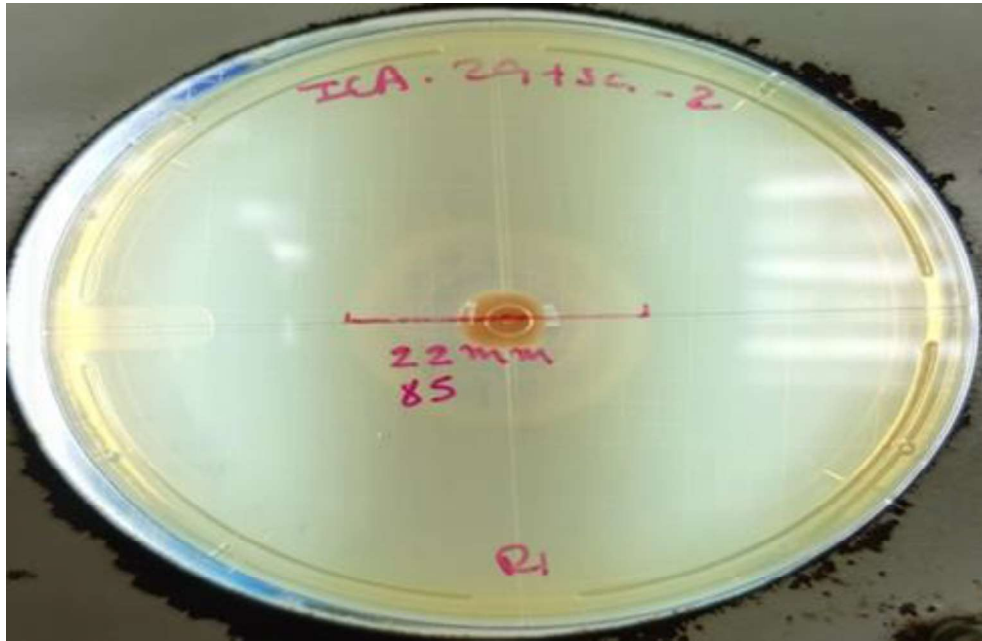
- [10] Cluster Camarón JM (año 2020), reglamentación europea de antibióticos en camarón. Obtenido de <https://camaron.ebizaro.com/las-reglamentaciones-europeas-sobre-el-uso-de-antibioticos-en-el-camaron-importado/>
- [11] Chen, J., Sun, R., Pan, C., Sun, Y., Mai, B., & Li, Q. X. (2020). Antibiotics and food safety in aquaculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 11908-11919.
- [12] Velez, C. C. C. (2018). ACUERDO Nro. MAP-SCI-2018-0001-A.
- [13] El-Saadony, M. T., Swelum, A. A., Abo Ghanima, M. M., Shukry, M., Omar, A. A., Taha, A. E., Salem, H. M., El-Tahan, A. M., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2022). Shrimp production, the most important diseases that threaten it, and the role of probiotics in confronting these diseases: A review. *Research in Veterinary Science*, 144, 126-140. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.01.009>
- [14] Butt, U. D., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S., & Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 114, 263–281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.003>
- [15] Zuo, Z. H., Shang, B. J., Shao, Y. C., Li, W. Y., & Sun, J. S. (2019). Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 86, 160-168.
- [16] Otero Gonzalez, J. P. (2018) Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y sus métodos de control (Examen complejo). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador
- [17] S. Fernandes and S. Kerkar, *Bacterial probiotics over antibiotics*. Elsevier Inc., 2019.
- [18] N. Aich, N. Ahmed, and A. Paul, “Issues of Antibiotic Resistance in Aquaculture Industry and Its Way Forward,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 08, pp. 26–41, 2018.
- [19] Chauhan and R. Singh, “Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach,” *Symbiosis*, vol. 77, no. 2, pp. 99–113, 2019.
- [20] P. Pandiyan et al., “Probiotics in aquaculture,” *Drug Invent. Today*, vol. 5, no. 1, pp. 55–59, 2013.

- [21] Maldonado M, Rodriguez J. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/494/49402110.pdf>
- [22] Probiotics as alternative control measures in shrimp aquaculture: A review. (2019). Journal of applied biology & biotechnology, 7(3), 69-77. <https://doi.org/10.7324/jabb.2019.70313>
- [23] Banco Central del Ecuador. (año 2021). Ficha Sectorial Camarón . Obtenido de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2021/fichas-sectoriales-1-trimestre/Ficha-Sectorial-Camaron.pdf>
- [24] ENGPIPAT, S., RUKPRATANPOM, S., & PIYATIRATIVORAKUL, S. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp by a probiont bacterium. Aquaculture, 191(4), 271-288.
- [25] FAO, food safety and probiotics. Obtenido de <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/es/>
- [26] Cheng, A.-C., Yeh, S.-P., Hu, S.-Y., Lin, H.-L., & Liu, C.-H. (2020). Intestinal microbiota of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets containing *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal (FSBM) or an antimicrobial peptide derived from *B. subtilis* E20-FSBM. Aquaculture Research, 51(1), 41-50. <https://doi.org/10.1111/are.14345>
- [27] Joanna Xuan Hui Goh, Loh Teng-Hern Tan, Jodi Woan-Fedi Law, Kooi-Yeong Khaw, Gokhan Zengin, Kok-Han Chan, Vengadesh Letchumanan, Learn-Han Lee, Bey-Hig Goh. (2022, diciembre 30). View of probiotics: Comprehensive exploration of the growth promotion mechanisms in shrimps. Hh-publisher.com. <https://doi.org/10.36877/pmmb.0000324>.
- [28] Liu H, Li Z, Tan B, et al. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 2014;41(2):300-307.
- [29] Peñalosa-Martinell D, Araneda-Padilla M, Dumas S, Martinez-Díaz S, Vela-Magaña M. The use of probiotics in larval whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production: A marginal analysis of bioeconomic feasibility. Aquac Res. 2021;52(3):943-951.
- [30] Goh, J. X. H., Tan, L. T.-H., Law, J. W.-F., Ser, H.-L., Khaw, K.-Y., Letchumanan, V., Lee, L.-H., & Goh, B.-H. (2022). Harnessing the potentialities of probiotics, prebiotics, synbiotics, paraprobiotics, and postbiotics for shrimp farming. Reviews in Aquaculture, 14(3), 1478-1557. <https://doi.org/10.1111/raq.12659>.

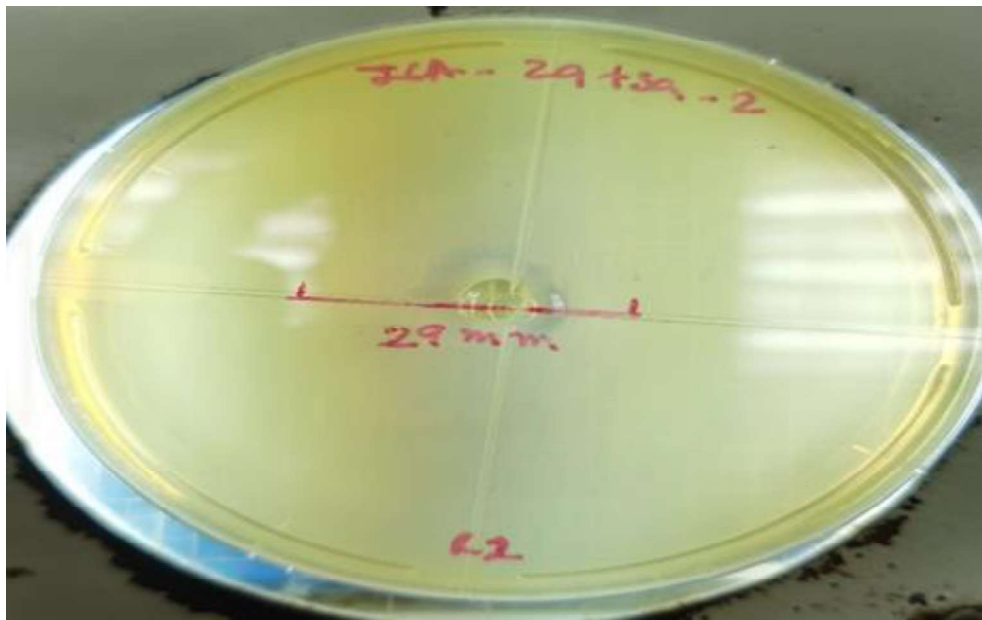
- [31] Seenivasan C, Radhakrishnan S, Muralisankar T, et al. Effects of probiotics on survival, growth and digestive enzymes activities in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). in Proceedings of the Zoological Society. 2016. Springer.
- [32] Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2021). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 324-352.
- [33] Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *The Veterinary Quarterly*, 36(4), 228-241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>
- [34] Bianchi, M. B., Jerônimo, G. T., Pádua, S. B., Satake, F., Ishikawa, M. M., Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2014). The hematological profile of farmed Sorubim lima: reference intervals, cell morphology and cytochemistry. *Veterinarski Arhiv*, 84(6), 677-690. <https://hrcak.srce.hr/130431>
- [35] Golder, H. M., Séon Simon, A. A., Santigosa, E., de Ondarza, M.-B., & Lean, I. J. (2022). Effects of probiotic interventions on production efficiency, survival rate, and immune responses of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) prawns: A meta-analysis and meta-regression. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 555(738213), 738213. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738213>
- [36] Xia, Z., Zhu, M., & Zhang, Y. (2014). Effects of the probiotic *Arthrobacter sp.* CW9 on the survival and immune status of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Letters in applied microbiology*, 58(1), 60-64.
- [37] Jayaprakash, V., & Chinnasamy, A. (2023). effect of probiotic and supplemented feed on growth, survival and disease resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 12(4), e4096-e4096.
- [38] Ramirez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizuite, K., Sonnenholzner, S., Alexis, F., & Rodríguez, J. (2022). The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus sensu stricto* (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 549(737826), 737826. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826>
- [39] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):655-671.

- [40] Goh JXH, Tan LTH, Law JWF, et al. Harnessing the potentialities of probiotics, prebiotics, synbiotics, paraprobiotics, and postbiotics for shrimp farming. *Reviews in Aquaculture* 2021

Apéndice



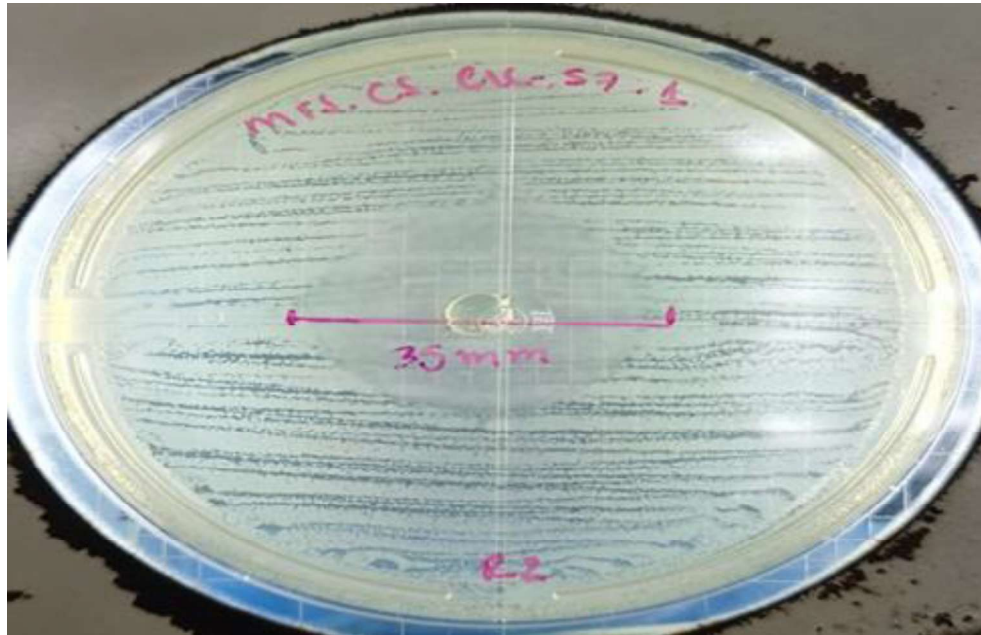
Apéndice A.- Halo de inhibición de la cepa ICA-29 en la réplica 1



Apéndice B.- Halo de inhibición de la cepa ICA-29 en la réplica 2



Apéndice C.- Halo de inhibición de la cepa MRS-57 en la réplica 1



Apéndice D.- Halo de inhibición de la cepa MRS-57 en la réplica 2

