



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

EXCLUSIÓN COMPETITIVA FRENTE A *VIBRIOS* EN LARVAS DE
LITOPENAEUS VANNAMEI MEDIANTE APLICACIÓN DE BACTERIAS
BENÉFICAS AISLADAS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS*

GUERRERO GARCIA JAIME ANDRES
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

Exclusión competitiva frente a *Vibrios* en larvas de *Litopenaeus vannamei* mediante aplicación de bacterias benéficas aisladas de *Oreochromis niloticus*

**GUERRERO GARCIA JAIME ANDRES
INGENIERO ACUÍCULTOR**

**MACHALA
2020**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

Exclusión competitiva frente a *Vibrios* en larvas de *Litopenaeus vannamei* mediante aplicación de bacterias benéficas aisladas de *Oreochromis niloticus*

GUERRERO GARCIA JAIME ANDRES
INGENIERO ACUÍCULTOR

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

MACHALA, 29 DE ABRIL DE 2020

MACHALA
2020

Revision Turnitin Guerrero

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE
INTERNET

0%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

1%

★ www.yumpu.com

Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, GUERRERO GARCIA JAIME ANDRES, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Exclusión competitiva frente a ***Vibrios*** en larvas de ***Litopenaeus vannamei*** mediante aplicación de bacterias benéficas aisladas de ***Oreochromis niloticus***, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 29 de abril de 2020


GUERRERO GARCIA JAIME ANDRES
0706451622

RESUMEN

En la actualidad el campo acuícola se va intensificando a gran medida y esto a su vez contrae una serie de factores que debemos tomar en cuenta para el correcto desarrollo de la producción. Uno de los puntos clave es el tema de las enfermedades, las cuales tienden a manifestarse en mayor proporción cuando el sistema comienza a intensificarse; una de las medidas que se han utilizado para el control de enfermedades es el uso de antibióticos, los cuales presentaron un alto grado de eficacia en sus inicios, pero luego su accionar se ha visto disminuido debido a la alta resistencia que han contraído las bacterias del medio a dichos fármacos. Ahora bien, el campo productivo se ha visto obligado a buscar alternativas que funcionen para el control de esta problemática, entre los más usados tenemos a los ácidos orgánicos y los probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que ayudan a mejorar las condiciones de cultivo del estanque de producción y también trabajan dentro del organismo colonizando la flora intestinal del animal permitiéndole así una mejor salud intestinal y posterior mejor desempeño; la eficiencia de estos microorganismos dependerá estrictamente de la dosificación de los mismos al igual que de las condiciones que dichos microorganismos tengan para cumplir con su proceso de replicación y posterior accionar benéfico.

En este trabajo se procedió a aislar bacterias del tracto intestinal de la Tilapia con miras a elaborar un probiótico que sirva para el control de *Vibrios* en larvas y juveniles de *Litopenaeus vannamei*, de las 13 cepas aisladas que se obtuvieron tan solo 2 presentaron un efecto inhibitorio considerable para hacerle frente a los *Vibrios*, estas cepas las identificamos como M6 y M7 pertenecientes al Agar Marino; cabe recalcar que las cepas aisladas se sembraron tanto en Agar Marino como en Agar MRS.

A las cepas con potencial probiótico se les realizó pruebas de inocuidad y viabilidad, dando como resultado ser inocuas ante larvas de *Litopenaeus vannamei* al igual que presentaron la característica de mantenerse en el agua luego de un proceso de congelación; para el ensayo desafío se utilizó acuarios con 1 litro de agua junto con 5 post-larvas, aireación constante, alimentación 2 veces al día, una temperatura de 28 a 30°C, recambio diario del 10 % y limpieza de fondo. Existieron 2 tratamientos y un testigo con sus respectivas replicas, el T1 (tratamiento 1) corresponde a cepa M7 y el

T2 (tratamiento 2) corresponde a la mezcla de las cepas M6 y M7; el ensayo duro 7 días: en el día 1 se infectó a los tratamientos con una dosis de 10^6 de *Vibrios sp.* al igual que se adiciono las cepas probioticas con una dosis de 10^6 , en los días 2,3 y 4 solo se adiciono las cepas con potencial probiotico con la dosis antes mencionada, mientras que en el día 5 se repitió el proceso del día 1, el día 6 no se adiciono nada mientras que el día 7 se procedió a realizar los cultivos en placa de los diferentes tratamientos para contabilizar colonias de *Vibrios* y determinar la incidencia de los tratamientos en la concentración de estos organismos patógenos.

Los resultados obtenidos demostraron que las cepas presentan un control sobre la proliferación de *Vibrios* y establece que, si hay exclusión competitiva sobre los mismos, al igual que el T2 demostró tener mayor sobrevivencia (86%) en comparación al T1 (66%).

Palabras claves: *Litopenaeus vannamei*, cepas probioticas, control de *Vibrios*, tilapia, potencial probiotico

ABSTRACT

At present, the aquaculture field is intensifying greatly and this in turn contracts a series of factors that we must take into account for the correct development of production. One of the key points is the issue of diseases, which tend to manifest in greater proportion when the system begins to intensify; One of the measures that have been used for disease control is the use of antibiotics, which presented a high degree of efficacy at the beginning but then their action has been reduced due to the high resistance that the bacteria in the environment have contracted. to these drugs. However, the productive field has been forced to look for alternatives that work for the control of this problem, among the most used we have organic acids and probiotics. Probiotics are live microorganisms that help to improve the conditions of culture of the production pond and also work within the organism colonizing the intestinal flora of the animal thus allowing better intestinal health and subsequent better performance; The efficiency of these microorganisms will depend strictly on their dosage, as well as on the conditions that these microorganisms have to comply with their replication process and subsequent beneficial action.

In this work we proceeded to isolate bacteria from the intestinal tract of Tilapia with a view to developing a probiotic that serves to control *Vibrios* in larvae and juveniles of *Litopenaeus vannamei*, of the 13 isolated strains that were obtained only 2 presented an inhibitory effect considerable to deal with the *Vibrios*, these strains we identify as M6 and M7 belonging to the Marine Agar; It should be noted that the isolated strains were sown in both Marine Agar and MRS. Agar. The strains with probiotic potential were tested for safety and viability, resulting in being harmless against larvae of *Litopenaeus vannamei* as well as having the characteristic of staying in the water after a freezing process; For the challenge test, aquariums with 1 liter of water were used together with 5 post-larvae, constant aeration, feeding 2 times a day, a temperature of 28 to 30 ° C, daily replacement of 10% and deep cleaning. There were 2 treatments and one control with their respective replicas, T1 (treatment 1) corresponds to strain M7 and T2

(treatment 2) corresponds to the mixture of strains M6 and M7; The trial lasted 7 days: on day 1 the treatments were infected with a dose of 10^6 of *Vibrios* sp. just as the probiotic strains were added with a dose of 10^6 , on days 2,3 and 4 only the strains with probiotic potential were added with the aforementioned dose, while on day 5 the process of day 1 was repeated, on day 6 nothing was added while on day 7 the plate cultures of the different treatments were carried out to count *Vibrios* colonies and determine the incidence of the treatments in the concentration of these pathogenic organisms.

The results obtained showed that the strains with probiotic potential have a control over the proliferation of *Vibrios* and establish that if there is competitive exclusion on them, just as T2 proved to have greater survival (86%) compared to T1 (66%).

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, probiotic strains, *Vibrios* control, tilapia, probiotic potential

Dedicatoria

El presente Trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios, por haberme dado la sabiduría para culminar mi proceso universitario.

A mi familia que siempre estuvo apoyándome e incentivándome a cumplir con mis objetivos, a mi madre Leonor García y mi padre Jaime Guerrero.

De igual manera a mis amigos, compañeros y docentes que aportaron en lo largo de la carrera universitaria

Agradecimiento

Agradezco a Dios por permitirme terminar mi carrera Universitaria, de igual manera a cada uno de mis tutores de tesis, que ayudaron a que el trabajo se desarrolle de una manera correcta, en especial a la PhD. Lita Sorroza.

Agradezco también a todas las personas como Familia, amigos y compañeros que confiaron en mí y me apoyaron, no dejándome desfallecer en ningún momento para poder alcanzar mis metas.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	10
2.	Formulación del problema.....	11
3.	Justificación	12
4.	Objetivos.....	13
4.1	Objetivo General	13
4.2	Objetivos específicos.....	13
5.	Revisión Bibliográfica	14
5.1	Factores influyentes en la presencia de <i>Vibrios</i>	15
5.2	Mecanismos de acción de las bacterias probióticas	15
5.3	Alternativas sobre control de <i>Vibrios</i>	16
5.4	Microorganismos con Potencial probiótico	17
6.	Materiales y métodos.....	20
6.1	Obtención de <i>Vibrios</i>	20
6.2	Pruebas Inhibitorias	20
6.3	Conservación de Cepas aisladas.....	21
6.4	Prueba <i>in vivo</i>	21
6.4.1	Pruebas de Inocuidad	21
6.4.2	Ensayo de Desafío	21
6.4.2.1	Preparación de Inóculos para el desafío.....	21
6.5	Diseño Experimental	22
7.	Resultados	23
7.1	Aislamiento de las cepas probióticas.....	23
7.2	Pruebas de inhibición en <i>in vitro</i>	23
7.3	Viabilidad de cepas aisladas	23
7.4	Pruebas <i>in vivo</i>	23
7.4.1	Prueba de inocuidad	23
7.4.2	Ensayo desafío.....	23
8.	Discusión.....	25
9.	Conclusión.....	26
10.	Recomendaciones.....	27
11.	Bibliografía	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultado de sobrevivencia del ensayo.....	24
Tabla 2. Resultado del conteo bacteriano.....	24

1. Introducción

La industria acuícola tiende a crecer cada vez más, debido a la alta demanda de alimentos que existe a nivel mundial, así como también por los réditos que esta nos ofrece. Los sistemas de producción que existen se han tecnificado a tal grado que sus producciones han sido más que satisfactorias, recalcando además de los cuidados y requerimientos para que dicho proceso se manifieste de la mejor manera provocando excelentes resultados; pero a pesar de aquello uno de los grandes factores que limitan o disminuyen la producción son las enfermedades que se presentan en los cultivos, se ha trabajado mucho en la profilaxis y se han encontrado resultados a favor que nos permiten disminuir en gran parte a dicho factor (Parraga, 2018).

En la actualidad el termino probioticos es comúnmente mencionado a la hora de hablar sobre el manejo de un sistema de producción, el empleo de estos organismos han ayudado a mejorar las condiciones de cultivo, en todos los sistemas de producción tanto en la fase larvaria como en engorde; estos organismos vivos son eficaces en todos los sistemas, pero su dosificación dependerá de las condiciones del cultivo que haya que mejorar (Rodriguez, 2017).

El empleo de estos organismos ha incentivado al estudio sobre el campo de acción de los mismo, en los cuales se han podido determinar su uso específico para cada campo, así tenemos organismos que trabajan en la columna de agua, en la degradación de materia orgánica y otros que trabajan a nivel intestinal de los organismos de cultivos; la combinación de todos estos microorganismos en la fase de cultivo resulta eficaz y mejora la salud-desempeño de los organismos de cultivo. Cabe destacar que la aplicación de dichos consorcios bacterianos va a depender de la intensidad del cultivo, y la forma de mantenerlos dentro del sistema se logra con adición de nutrientes que facilita su multiplicación u manteniendo las condiciones óptimas para su desarrollo.

2. Formulación del problema

La presencia bacterias del género *Vibrios* en Larvicultura de *Litopenaeus vannamei* al igual que en su fase juvenil, resulta un gran problema en su fase de cultivo, los aumentos de densidades provocan un estrés en los organismos, permitiendo así el ataque de estos patógenos oportunistas dando como resultado una alta tasa de mortalidad, afectando en gran medida a la producción final.

3. Justificación

Para el control de *Vibrios* en los cultivos de *Litopenaeus vannamei* el común denominador ha sido utilizar antibióticos, pero estos a su vez en el transcurso del tiempo presentaron resistencia bacteriana, es por esto que se han implementado medidas amigables con el medio ambiente que puedan controlar el ataque de estos patógenos oportunistas (Gomez, 2020).

El uso de probióticos resulta interesante para el sector puesto que ha reducido en gran porcentaje el crecimiento de estos patógenos, el principio aplicado es la exclusión competitiva la cual limita los espacios o zonas de adhesión, impidiendo el crecimiento de *Vibrios* (Sotomayor & Balcazar, 2016).

La adición de estos probióticos en dosis adecuadas permite al hospedero desarrollar una mayor protección frente a estos patógenos oportunistas como son los *Vibrios*, debido a esto los probióticos comerciales vienen en altas concentraciones buscando garantizar una función adecuada de estos microorganismos beneficios (Gomez, 2020).

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

- ✓ Aislar del tracto intestinal de *Oreochromis niloticus* cepas bacterianas con potencial probiotico, que ayuden a controlar la carga microbiana en su fase de Larvicultura y fase juvenil para aumentar la sobrevivencia en *Litopenaeus vannamei*

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtención de cepas probioticas aisladas del tracto intestinal de *Oreochromis niloticus*
- ✓ Establecer la inocuidad de las cepas bacterias frente a larvas de *Litopenaeus vannamei*
- ✓ Evaluación *in vitro* e *in vivo* de las cepas probioticas seleccionadas

5. Revisión Bibliográfica

En el campo acuícola especialmente en la camaronicultura las producciones se han visto afectadas en gran parte por un sinnúmero de enfermedades de origen bacteriano y viral, siendo una de las enfermedades más comunes dentro del cultivo camarones la llamada “Vibriosis”, causada o generada por organismos bacterianos del género *Vibrio*, los mismos que pueden expresar su patogenicidad en la fase larvaria así como también en la fase de engorde o Precria (Rosado, 2018).

Los *Vibrios* son comúnmente asociados a las infecciones presentes en los camarones de cultivo, todo esto debido a la facilidad que tienen para proliferarse en aguas de mala calidad o que han tenido un mal manejo, así también se acumulan en el sedimento deteriorándolo aún más e invadiendo el tracto intestinal de los organismos de cultivo provocando un estrés y posterior infección de los mismos; cabe recalcar que estos patógenos oportunistas atacan tanto en la fase larvaria como en la fase de engorde (Suarez, Medina, Montiel, Ibarra, & Salcedo, 2015).

Una de las medidas que se ha utilizado para combatir este problema es el uso de antibióticos, pero la mala utilización de los mismos tiende a convertirse a posterior en otro problema; el uso indiscriminado de los antibióticos genera una resistencia considerable de parte de patógenos oportunistas frente a los fármacos utilizados, provocando así que dichos fármacos antibacterianos pierdan o disminuyan su efectividad antagónica contra los organismos patógenos a tratar (Rosado, 2018).

La administración de organismos vivos los cuales trabajan para aumentar la resistencia a enfermedades, mejorar el estado nutricional de los animales y optimizar las condiciones de cultivo, es una opción amigable para los sistemas de producción de mediana y gran escala. En la actualidad existen muchos productos comerciales que se emplean como probióticos, pero a su vez es importante que siga habiendo investigación generando aislamiento de nuevas cepas bacterianas, permitiendo así una mayor diversidad de dichas soluciones acuícolas (Toledo, Castillo, Carrillo, & Arenal, 2018).

Las concentraciones de *Vibrios* en los estanques de cultivo son mucho mayores en los sedimentos que en la columna de agua, esto se atribuye a un mal manejo del cultivo alterando sus condiciones óptimas para un correcto desarrollo del organismo afectando

la producción y la sobrevivencia de cultivo; las concentraciones de *Vibrios* se presentan en mayor proporción a la salida de agua del estanque en comparación al resto (Suarez, Medina, Montiel, Ibarra, & Salcedo, 2015).

5.1 Factores influyentes en la presencia de *Vibrios*

La proliferación de *Vibrios* está relacionado con el aumento de la temperatura ya que se han detectado mayores concentraciones en estas condiciones, mientras que en las estaciones frías presentan menos problemas de infecciones por estos patógenos (Ardila, 2017).

Otro factor influyente es la densidad alta del cultivo provocando así un estrés sobre los organismos permitiendo que estos patógenos oportunistas logren afectar, así también otro factor es el mal manejo de la calidad de agua; todo esto interactúa debilitando el sistema inmunológico del animal y los vuelve más vulnerables para estos patógenos (Del Angel, 2015).

El género *Vibrio* tiende a proliferar en menor cantidad en aguas de baja salinidad, es por esto que los cultivos de agua dulce presentan mejores resultados en cuanto se refiere a la carga de *Vibrios*, lo que conlleva a una mejor sobrevivencia debido a la poca infección por estos patógenos, pese a eso si la calidad del agua se altera, estos mismos microorganismos podrán desarrollarse en mayor magnitud (Sanchez A. , 2018).

Si bien estos microorganismos no deseados están presentes en la mayoría de los ecosistemas acuáticos, se ha determinado que los suelos potencialmente ácidos tienden a presentar una mayor proliferación de bacterias del género *Vibrio* (Orellana & Ayala, 2017).

5.2 Mecanismos de acción de las bacterias probióticas

La exclusión competitiva que realiza el probiótico para combatir las enfermedades bacterianas tiene como principio competir por espacio y fuentes de carbono, además de liberar sustancias químicas con efectos bactericidas como bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, proteasas, peróxido de hidrogeno, ácidos orgánicos que influirán en el crecimiento de las poblaciones microbianas (Rodríguez et al., 2015).

Los mecanismos de acción de los organismos bacterianos son diversos, entre las cuales destaca el poder adherirse al mucus entérico promoviendo así una mayor microbiota

intestinal de dichas cepas, cabe recalcar que esta misma característica presentan los organismos patógenos, por lo tanto se recomienda aislar organismos bacterianos que provengan de animales del mismo medio acuáticos ya que presentan una mayor fijación, mientras que si son de animales ajenos a su hábitat (organismos terrestres) la fijación o adhesión no presentara la misma eficacia (Toledo, Castillo, Carrillo, & Arenal, 2018).

El proceso de colonización que realizan las bacterias probióticas es acorde a la afinidad que presente con la mucosa intestinal o a su vez a las células epiteliales, este proceso resulta primordial para la competencia por espacio y nutrientes entre los organismos probióticos versus patógenos. Otro punto clave es la persistencia en un periodo de tiempo ya que se necesita que su tasa de replicación sea mayor a la tasa de expulsión del hospedero (Ardila, 2017).

La actividad antagónica que de ciertos grupos bacterianos se debe a producción de sustancias con efectos bactericidas o bacteriostáticos, proteasas, peróxido de hidrogeno, dichas sustancias inhiben el crecimiento de bacterias Gram Negativas que son potenciales patógenos (Castañeda, y otros, 2018).

La transformación genética natural es un ejemplo del método de acción de contagio de las bacterias, este asimila el ADN extracelular e incorpora material genético al receptor por lo que se expresa en transferencia de genes horizontalmente, lo cual le permite mantenerse intra o inter especie, además de adquirir nuevas características que ayudan a su mayor propagación (Carrillo, 2017).

5.3 Alternativas sobre control de *Vibrios*

Los probióticos pueden mezclarse con organismos inhibidores del quorum-sensing bacteriano potenciando así el beneficio de dicho probiótico permitiéndole trabajar o mantenerse por mucho más tiempo en el organismo. Si bien las alternativas que se muestran para el control de estos organismos oportunistas llamados *Vibrios* son potencialmente buenas, la efectividad del tratamiento dependerá del manejo o protocolo de aplicación que se halla establecido (Rodríguez et al., 2015).

Otra de las alternativas para el control de *Vibrios* es el uso de extractos de aceites esenciales entre los cuales tenemos al orégano *Lippia verlandieri* el cual representa una solución viable al control de estos patógenos, este extracto a su vez puede actuar por si

solo o ser un complemento de los antibióticos utilizados para tener un mejor resultado. (Gracia, Orozco, & Molina, 2012).

El uso de la tecnología también ha sido aplicada al control de *Vibrios*, básicamente las nanopartículas, que gracias a sus dimensiones pueden actuar dentro del animal causando efectos positivos por tomar como ejemplo que podemos citar el uso de nanopartículas de oro mezcladas con el alimento y suministradas a los camarones; este ensayo presento resultados favorables en los cuales se obtuvo una tasa de sobrevivencia mayor a 80%, considerándose así una alternativa viable para el control de *Vibrios* (Tello, 2018).

Los medicamentos homeopáticos han sido utilizados en el control de *Vibrios* debido a que intervienen en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) la cual inhibe el crecimiento de estos patógenos oportunistas, ensayos realizados han determinado un aumento de la sobrevivencia cuando se aplica estos productos, por lo que se muestran como una alternativa confiable para el control de *Vibrios* (Mazon, y otros, 2018).

Los microorganismos utilizados como probióticos tienen la particularidad de influenciar en la asimilación correcta de los alimentos al igual que inhiben el crecimiento de los patógenos presentes lo que conlleva a minorar la tasa de mortalidad por enfermedades infecciosas. De igual manera estos organismos influyen en la calidad de agua debido a que cumplen un proceso de desintoxicación en la columna de agua, eliminando altas concentraciones de Amonio, Nitritos y nitratos (Alvarado & Aveiga, 2016).

5.4 Microorganismos con Potencial probiotico

El uso de *Bacillus subtilis* en el campo acuícola se ha determinado como un agente con potencial probiotico que es aplicado en todas las fases de la camaronicultura, dando como resultado una serie de características, como mejorar la sobrevivencia del cultivo, la ganancia de peso y la disminución del índice de factor de conversión alimenticia; además se ha determinado que el *Bacillus subtilis* no afecta la calidad de agua de los estanques y que su eficacia es directamente proporcional a la dosis aplicada, mostrando así concentraciones altas con mejores resultados (Alvarado & Aveiga, 2016).

La adición de organismos vivos que puedan inhibir el crecimiento de bacterias patógenas puede considerarse sustentable en consideración a uso indiscriminado de

antibióticos, muchos de estos son extraídos de ambientes marinos lo cual repercute en la fijación de los mismo en las paredes intestinales del hospedero, Ahora bien, es importante tener una variedad de estos organismos probióticos para poder diversificar el medio y disminuir la resistencia a antibióticos (Leyton, Pohl, & Riquelme, 2014).

Una de las cepas que presenta mayores réditos en cuanto se refiere a la inhibición de *Vibrios* son los *Bacillus pumilus*, esta actividad o característica se le atribuye gracias al péptido dicetopiperacina. Las bacterias del género *Bacillus* se han determinado que producen metabolitos secundarios parecidos a los antibióticos, existen cepas que presentan susceptibilidad ante la temperatura, debido a esto se las clasifico acorde a la densidad de cultivo; la temperatura óptima para el desarrollo de estos organismos fue de 30 a 37°C (Leyton, Pohl, & Riquelme, 2014).

El género *Bacillus* es considerado de buen potencial probiótico, otro de los microorganismos utilizados como probiótico para mejorar las condiciones de cultivo es *Bacillus amyloliquefaciens*, este se puso a prueba mediante un experimento en el cual se controlaba el porcentaje de granulocitos en los camarones que se les adiciono el probiótico versus el que no se le adicionaba el probiótico, dando como resultado un aumento de los granulocitos de la hemolinfa favoreciendo el sistema inmune del animal, al mismo tiempo se verifico la que no deteriora la calidad del agua del cultivo (Prentu, 2016).

La gran mayoría de las cepas denominadas probióticas son BAL (Bacterias Acido Lácticas) entre las cuales destacan: *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium*; estas producen sustancias que provocan la lisis celular de organismos patógenos. La investigación de organismos microbianos autóctonos del tracto intestinal de animales acuícolas ha sido muy poca, pero han presentado grandes resultados, reduciendo en su totalidad el uso de antibióticos en los sistemas de cultivo de las especies que se han sometido a este proceso (Ardila, 2017).

Las bacterias Acido lácticas trabajan dentro del tracto intestinal de los camarones por lo tanto se necesita un vector de transporte que sería el alimento, entonces al adicionar dichas bacterias actuaran específicamente en esa zona en la cual competirá por desplazar los patógenos que estén adheridos a estas paredes intestinales, provocando así una mejor salud intestinal de los organismos de cultivo repercutiendo en la sobrevivencia de los mismos (Delgado, 2019).

En la actualidad se trabaja para garantizar que el probiotico adicionado llegue vivo a su lugar de acción y una de los métodos que se ha implementado es la micro-encapsulacion de probioticos asegurándonos así la viabilidad del mismo, pero de la misma forma es necesario que el alimento que servirá de vía de transmisión disponga de los prebióticos necesarios para que el probiotico pueda mantenerse disponible hasta ser consumido (Ardila, 2017).

Existen trabajos con actinomicetos en los cuales se han utilizado *Streptomyces* bio-encapsuladas en *artemia salina* para posterior ser consumidas por larvas de *Litopenaeus vannamei*, la adición de estos microorganismos han dado resultados de sobrevivencia mayor al 85 % en comparación al testigo (57%) sin adición de *Streptomyces*, por lo que se considera una alternativa viable para el control de estos organismos patógenos (Ossorio, 2017).

6. Materiales y métodos

El trabajo expuesto tuvo como referencia al ya realizado por (Noguera, 2009).

Para el aislamiento de bacterias benéficas se utilizaron ejemplares de tilapia de alrededor de 1200 g, para su selección se observó que estén en perfectas condiciones. Los ejemplares fueron capturados en un brazo de mar junto a la zona de “La puntilla” en horas de la mañana para posterior traslado a la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, cabe recalcar que los organismos tenían que llevarse vivos para luego realizar la disección de los mismos.

Las siembras se realizaron a partir del intestino y del contenido estomacal de cada ejemplar con el fin de un posterior análisis, para ello se hizo un frotis del mismo, mientras que del contenido estomacal se hicieron diluciones sucesivas en solución salina al 1%, las siembras de las diluciones 1/10 y 1/100 fueron hechas tanto en Agar MRS. como en Agar Marino y se dejó incubar por 48 horas a 72 horas. A 25°C.

Luego mediante el uso de un estereoscopio se procedió a clasificarlas las cepas bacterianas por su color, tamaño y forma, con el fin de probar cada una su efecto antagónico sobre *Vibrios*.

6.1 Obtención de *Vibrios*

La obtención de cepas de *Vibrios sp.* Se la realizó mediante la utilización de camarones que se encontraban en cultivo en la estación piscícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA); cabe recalcar que el cultivo ya estaba descuidado y los organismos presentaban signos de enfermedad, luego se realizó la siembra y se esperó alrededor de 24 horas que se incuben las bacterias para luego proceder a purificarlas con el fin de tenerlas listas para la posterior prueba de inhibición de las bacterias aisladas ya mencionadas.

6.2 Pruebas Inhibitorias

La prueba se la realizó en cajas Petri sembrando 100 ul de *Vibrios* con una concentración de 10^7 , la siembra fue hecha utilizando el asa de Drigalsky, para luego colocar con el asa de platino las cepas aisladas de la tilapia.

Con las bacterias que presentaron efecto inhibitorio frente a *Vibrios* se procedió a realizarles tinción de Gram y determinar a qué grupo pertenecen.

6.3 Conservación de Cepas aisladas

Para conservar las cepas que presentaron un potencial probiótico se utilizó un medio de cultivo líquido (Caldo Marino), al cual luego se le adiciono glicerol un 20 % en consideración al volumen del Medio de cultivo, y fueron mantenidas en congelación a -80°C . Este glicerol establece un efecto crioprotector, permitiendo así una mejor conservación de las bacterias evitando su cristalización y daño de la pared celular. Esta solución se autoclavo por 15 minutos a 19 libras de presión y 250°F .

6.4 Prueba *in vivo*

6.4.1 Pruebas de Inocuidad

A las cepas que presentaron efecto inhibitorio ante *Vibrios* se les realizo una prueba de inocuidad, en el cual se preparó caldo marino y se adiciono 1 ml de las bacterias que se habían congelado en los tubos eppendorf, luego a las 18 horas de haberse realizado la siembra procedimos a centrifugar la solución a 4500 rpm y 10°C durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante para luego realizar un lavado con solución salina al 1% a las bacterias que se precipitaron, para obtener una concentración de 10^9 utilizábamos el fotómetro previamente calibrado con 600 nanómetros y 1 de Absorbancia. Con este resultado se colocó al acuario una concentración de 10^7 de dichas bacterias, y al mismo 50 post-larvas cada uno con un volumen 1 litro y esperamos los resultados tras 72 horas; cabe recalcar que se alimentó 2 veces al día y a diario se realizó un recambio del 30 %.

6.4.2 Ensayo de Desafío

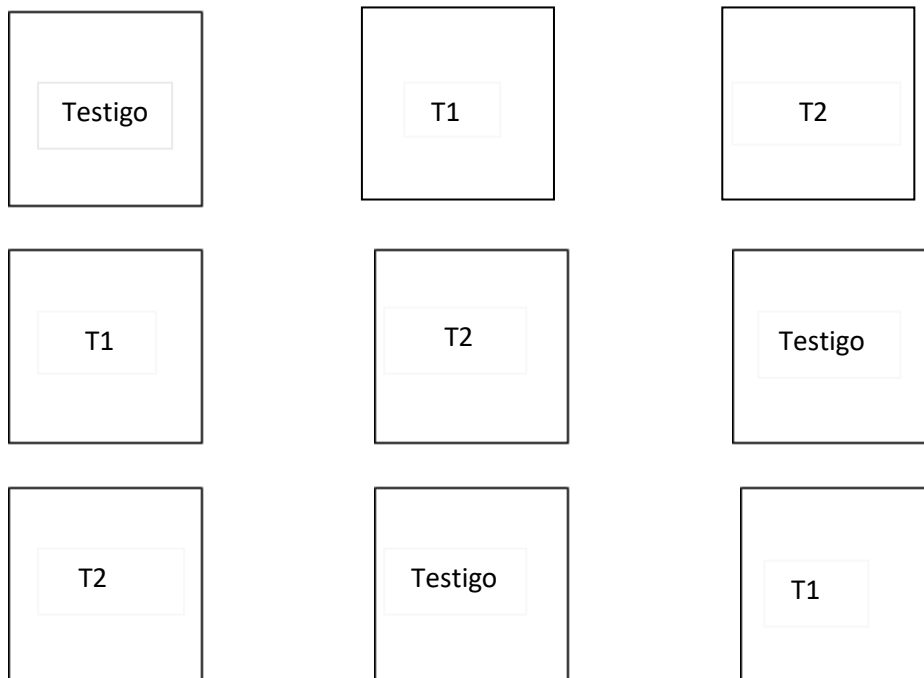
Para comprobar la eficacia del probiótico obtenido se necesitó realizar pruebas *in vivo* en donde se colocaron 5 animales por acuario con un peso promedio de 0,3 gr/L cada uno, con salinidad de 28 ppt, y se realizaron 2 tratamientos y un testigo, todos estos por triplicado, se probó las bacterias que presentaron halo de inhibición y la prueba tenía una duración de 7 días de los cuales los primeros 5 días se adicionaba bacterias probióticas y patógenas dejando descansar el 6to día para posterior realizar la siembra en placa en el 7mo día, se alimentó con una dieta comercial dos veces al día y un recambio de agua del 10 % conjuntamente con la limpieza del fondo, la temperatura permaneció entre $25-28^{\circ}\text{C}$ con una aireación constante.

6.4.2.1 Preparación de Inóculos para el desafío

Se utilizó el caldo marino previamente sembrado con las bacterias con potencial probiótico este se lo centrifugo durante 10 minutos a 4500 rpm con una temperatura de 10°C, de igual manera se utilizó el fotómetro para llegar a una concentración de 10^9 , luego de eso calculamos el volumen necesario para obtener una concentración de 10^6 en los acuarios.

6.5 Diseño Experimental

Este fue dado en un diseño experimental simple con 2 variables, en este caso cepas probióticas.



T1 = M7 (concentración de 10^6) Los *Vibrios* se colocaron durante el primer y 5to día, mientras que la bacteria probiótica se la adiciono a lo largo de los 5 días

T2 = M6 + M7 (concentración 10^6) Los *Vibrios* se colocaron durante el primer y 5to día, mientras que las bacterias probióticas se las adiciono a lo largo de los 5 días

Testigo = No se le adiciona nada

7. Resultados

7.1 Aislamiento de las cepas probióticas

El crecimiento bacteriano en el Agar marino fue a las 48 horas de la siembra mientras que las placas de Agar MRS. se contabilizo a las 72 horas; luego de la siembra se pudo observar un total de 63 cepas bacterianas del intestino como del contenido estomacal, de las cuales se aislaron 13 según su morfología las mismas que fueron nombras como (M1,M2,M3,M4,M5,M6,M7), mientras que las cepas obtenidas del Agar MRS se codificaron como (A1,A2,A3,A4,A5,A6).

7.2 Pruebas de inhibición *in vitro*

Luego de las 24 horas de la siembra se determinaron que tan solo 2 de las 13 cepas presentaron un efecto inhibitorio frente a *Vibrios*, las mismas fueron:

- M6 presento un halo de 3 mm
- M7 presento un halo de 15 mm

Mediante la prueba de Tinción de Gram se determinó que tanto M6 como M7 son bacterias Gram Positivas.

7.3 Viabilidad de cepas aisladas

Luego de permanecer congeladas a -80°C durante 52 días, se realizó una siembra en placa dando como resultado crecimiento de las bacterias M6 y M7 sin perder su efecto inhibitorio frente a *Vibrios*.

7.4 Pruebas *in vivo*

7.4.1 Prueba de inocuidad

En el presente estudio se determinó que las cepas M6 y M7 fueron inocuas para larvas de *Litopenaeus vannamei*

7.4.2 Ensayo desafío

Los resultados en este trabajo se analizan en base a la sobrevivencia y carga de *Vibrios* obtenida en cada uno de los tratamientos al igual que en el testigo, primero debemos establecer los resultados del testigo el cual presento una sobrevivencia del 93% y su carga de *Vibrios* fue de 5×10^3 , partiendo de allí podemos decir que el T1 si bien presento una sobrevivencia menor (66%) en comparación al T2 y el testigo, este fue el

que menor carga de *Vibrios* presento (7×10^5 UFC) de los 2 tratamientos, mientras que el T2 consiguió el 86% de sobrevivencia, su carga de *Vibrios* fue de 1×10^6 , es decir, un poco más elevado que el T1.

Una vez terminado el tiempo del ensayo se procedió a contar los organismos que tuvimos por cada tratamiento al igual que el testigo, resultando lo siguiente:

Tabla 1. Resultados de sobrevivencia del ensayo

Tratamientos	Sobrevivencia
T1	66%
T2	86%
Testigo	93%

Así mismo luego de la siembra en placa se procedió a contabilizar UFC /g hp de *Vibrios* dando como resultado:

Tabla 2. Resultado de conteo bacteriano

CromAgar	
Tratamientos	Concentración
T1	7×10^5 UFC
T2	1×10^6 UFC
Testigo	5×10^3 UFC

8. Discusión

El uso de probióticos está ampliamente documentado en el cultivo de camarón y de otros organismos acuáticos como lo menciona (Kumar, Roy, Kumar, & Kumar, 2016) donde muestra una amplia variedad de cepas con características probióticas, ayudando al cultivo en cuanto a la sobrevivencia frente a patógenos oportunistas como los *Vibrios*.

Del análisis de los resultados podemos decir que la mezcla de 2 bacterias (T2) nos ofrecen una mejor sobrevivencia de las larvas como lo menciona (Garcia, 2016) donde obtuvo una sobrevivencia del 95% al mezclar *Streptomyces sp.* junto con un mix de *Bacillus*, los mismos que fueron sometidos a un ensayo desafío contra *Vibrios*.

Así mismo se puede observar que en el T1 disminuye la carga de *Vibrios*, pero tiene un aumento de mortalidad significativo, cabe recalcar que la infección con *Vibrios* se aplicó 2 veces durante el ensayo, dando así una mayor exposición de los animales ante estos patógenos. Ahora bien, se podría decir que el T1 podría ser muchos más eficaz utilizando concentraciones más altas a las ya establecidas en el ensayo. Como lo menciona (Sanchez R. , 2018) donde utiliza concentraciones elevadas del probiótico de 7×10^9 para ejercer un mayor efecto protector mejorando así la sobrevivencia.

Otros autores como (Barreno & Martinez, 2018) recomiendan utilizar mezcla de cepas probióticas para garantizar una mayor sobrevivencia, en consideración a los demás tratamientos realizados en los ensayos pertinentes.

9. Conclusión

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de las cepas probióticas seleccionadas

Se lograron aislar un total de 13 cepas del tracto intestinal de *Oreochromis niloticus* identificadas por su forma, tamaño y color de las cuales tan solo 2 tuvieron un potencial probiótico inhibiendo el crecimiento de *Vibrios*.

Las cepas con potencial probiótico fueron sometidas a una prueba de inocuidad frente a larvas de *Litopenaeus vannamei* dando como resultado la sobrevivencia absoluta de los organismos en un periodo de tiempo de 7 días.

Se logró evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* a las cepas con potencial probiótico, las mismas que se expusieron a 2 tratamientos en el cual el T1 presento una sobrevivencia del 66% mientras que el T2 presento una sobrevivencia del 86 %.

10. Recomendaciones

Se recomienda utilizar mezclas de cepas probióticas debido a que presentan una mayor sobrevivencia, mejorando así la salud intestinal de los organismos de cultivo.

De igual manera se recomienda aislar más bacterias del tracto intestinal de la Tilapia con el fin de conseguir más cepas probióticas con un efecto antagónico frente a *Vibrios sp.* para luego poder crear consorcios bacterianos y aplicarlos a larvas de *Litopenaeus vannamei* tratando de minimizar al máximo la incidencia de estos microorganismos patógenos.

11. Bibliografía

- Alvarado, K., & Aveiga, S. (Noviembre de 2016). *Evaluación de Bacillus subtilis como potencial probiótico en camarón blanco (Penaeus vannamei) en etapa de post-larva en Choluteca, Honduras*. Zamorano, Honduras.
- Ardila, M. (2017). *Evaluación del carácter probiótico de Bacillus sp y Bacterias ácido lácticas aisladas de intestinos de tilapia (Oreochromis) en estado de preceba*. Antioquia, Colombia.
- Barreno, J., & Martínez, J. (Noviembre de 2018). *Biblioteca Digital Zamorano*. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6439/1/CPA-2018-T010.pdf>
- Carrillo, G. (Septiembre de 2017). *Transformación Genética Natural del Vibrio*. Baja California, Mexico.
- Castañeda, A., Aguilar, J., Zatan, A., Toledo, O., Feria, M., & Castillo, D. (2018). Identificación molecular de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas aisladas del intestino posterior de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 429-438.
- Del Angel, A. (2015). FACTORES RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE VIBRIOS. En *El Agro Veracruzano* (págs. 59-76). Veracruz: Vol II.
- Delgado, L. (23 de Septiembre de 2019). *Repositorio Institucional de la Universidad de El Salvador*. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20079>
- García, M. (2016). *Obtención de actinomicetos marinos con acción probiótica en ostiones y camarones*. Santa Clara, Cuba.
- Gómez, P. (30 de Enero de 2020). *Universidad Politécnica de Valencia*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/handle/10251/136915>
- Gracia, M., Orozco, C., & Molina, C. (2012). Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*. *SCIELO*, Vol.22 .
- Kumar, V., Roy, S., Kumar, D., & Kumar, U. (2016). Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 342-368.
- Leyton, Y., Pohl, K., & Riquelme, C. (2014). Inhibición de la cepa patógena de *Vibrio cholerae* (tor1) por *Bacillus pumilus* aislados del ambiente marino. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 595-600.
- Mazon, J., García, M., Aviles, M., Campa, A., Salas, J., & Abasolo, F. (2018). Evaluación de medicamentos homeopáticos en la supervivencia y respuesta antioxidante del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista MVZ Cordova*, Volumen(23)(3).
- Noguera, C. (2009). *Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano*. Obtenido de <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/1260/T911.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Orellana, C., & Ayala, O. (2017). INCIDENCIA DE PARÁSITOS Y BACTERIAS DEL GENERO VIBRIO EN EL CULTIVO DE CAMARÓN MARINO DESARROLLADOS EN COOPERATIVAS CAMARONERAS DEL MUNICIPIO DE JIQUILISCO, DEPARTAMENTO DE USULUTÁN. *Revista Tecnológica* Nº 10, 27-29.
- Ossorio, P. (2017). *Bioencapsulacion de Streptomyces sp. RL8 en nauplios de Artemia franciscana y estudio de su resistencia contra Vibrios patogenos*. Santa Clara, Cuba.
- Parraga, C. (2018). *Selección y evaluación de cepas bacterianas probióticas tipo Bacillus con actividad antagónica sobre cepas bacterianas patógenas aisladas en Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Libertad, Santa Elena, Ecuador .
- Prentu, B. (2016). *“Aplicación de un probiótico compuesto por Bacillus amyloliquefaciens para mejorar el sistema inmunológico del camarón blanco Litopenaeus vannamei en sistemas de bioflóculos.”*. Gandia, Valencia, España.
- Rodriguez, A. (Octubre de 2017). *Probiticos en la produccion piscicola*. Huila. Obtenido de <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/13466/1075539267.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, J., Domínguez, C., Chalén, B., Agurto, G., Betancourt, I., Panchana, F., ... Bayot, B. (2015). *Probióticos, parte de la solución: alternativas de uso en el cultivo de camarón*. *Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui. , VII*(August 2015), 9–22.
- Rosado, A. (2018). *Resistencia antimicrobiana de bacterias del genero Vibrio en langostino blanco (Litopenaeus vannamei) en centros de cultivo de la region de Tumbes*. Lima, Peru.
- Sanchez, A. (2018). *Identificación y cuantificación de Vibrio spp en camarón de rio (Cryphiops caementarius) procedente de Mercado pesquero Villa María del Triunfo*. Lima, Peru.
- Sanchez, R. (Mayo de 2018). *Evaluacion de Bacterias marinas y su potencial uso como aditivo en alimento y/o agente probiotico contra Vibrio parahaemolyticus, agente causal de la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreatica aguda en camaron blanco*. Nueva Leon, Mexico.
- Sotomayor, M., & Balcazar, J. (2016). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas. *AquaTic*, 9-16.
- Suarez, M., Medina, Z., Montiel, M., Ibarra, J., & Salcedo, A. (2015). DISTRIBUCION DE Vibrio spp. EN AGUA Y SEDIMENTO DE ESTANQUES PRODUCTORES DE CAMARON Litopenaeus vannamei CULTIVADOS CON AGUA DEL LAGO DE MARACAIBO (VENEZUELA). *Revista Científica*, 293-299.
- Tello, M. (Febrero de 2018). *Actividad inmunoestimulante de nanoparticulas de oro en camaron blanco (Litopenaeus vannamei) contra Vibrio parahaemolyticus*. La Paz, Baja California sur, Mexico.
- Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. *ACUICULTURA*, 57-71.

ANEXOS



Anexo 1. Ejemplares de Tilapia



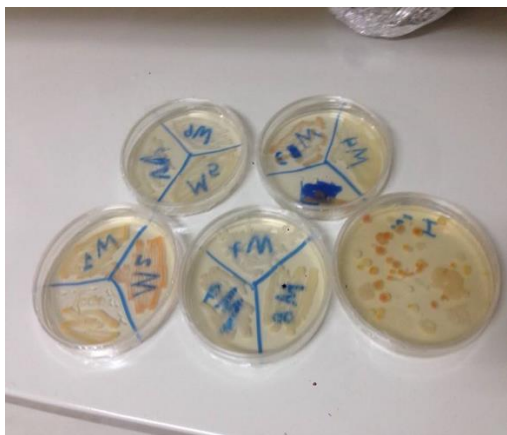
Anexo 2. Inóculos de TGI de la tilapia



Anexo 3. Resultado cepas en Agar Marino



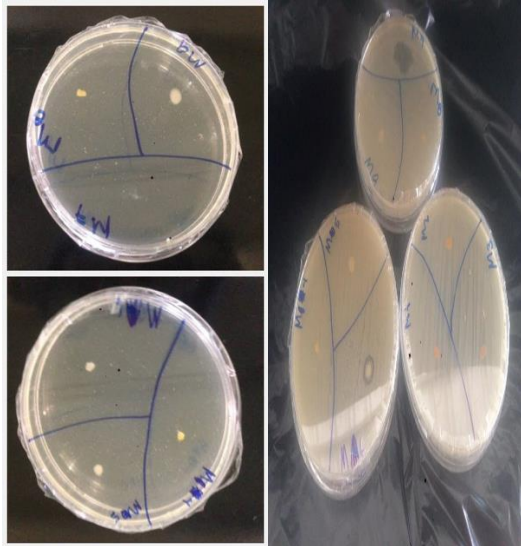
Anexo 4. Resultado cepas en Agar MRS.



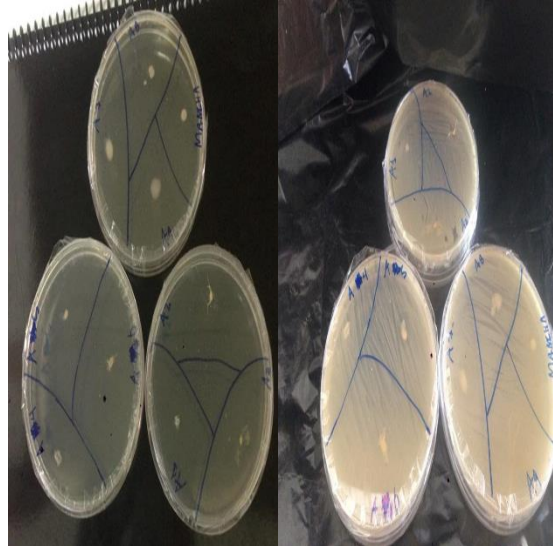
Anexo 5. Purificación de cepas aisladas (Agar M.)



Anexo 6. Purificación de cepas aisladas (Agar MRS.)



Anexo7. Resultados de Prueba de Inhibición de las cepas de Agar Marino Frente a *Vibrios*



Anexo8. Resultados de Prueba de Inhibición de las cepas de Agar MRS. Frente a *Vibrios*



Anexo9. Conserva de cepas con potencial probiótico



Anexo10. Preparación de Inóculos de Bioensayo



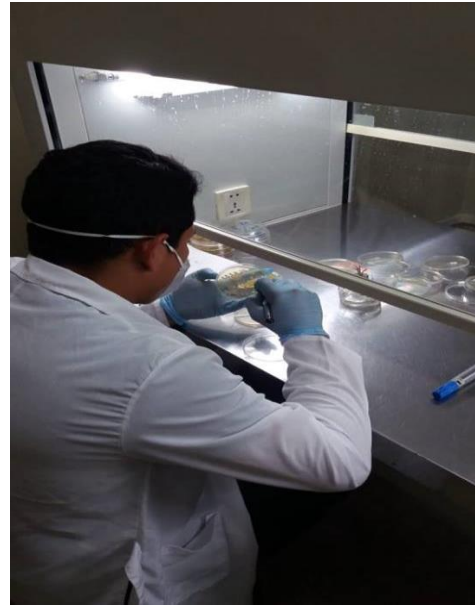
Anexo11. Estación de Bioensayo



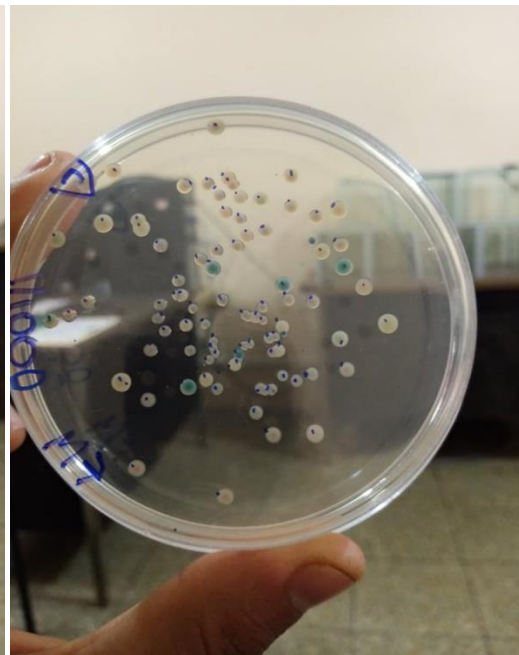
Anexo12. Adición de dosis de Cepas Probioticas



Anexo13. Preparación de diluciones de hepatopáncreas para siembras en placa



Anexo14. Siembras en placa de las diluciones de hepatopáncreas



Anexo15. Resultados de las siembras en placa del Bioensayo.

