



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

APLICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO
AISLADAS DE CAMARONES SILVESTRES *LITOPENAEUS VANNAMEI*
COMO UNA MEDIDA PROFILÁCTICA PARA CONTROLAR LA
VIBRIOSIS.

LOPEZ RUIZ WILMER ISIDRO
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

APLICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO
AISLADAS DE CAMARONES SILVESTRES *Litopenaeus vannamei*
COMO UNA MEDIDA PROFILÁCTICA PARA CONTROLAR LA
VIBRIOSIS.

LOPEZ RUIZ WILMER ISIDRO
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

APLICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO AISLADAS DE
CAMARONES SILVESTRES *Litopenaeus vannamei* COMO UNA MEDIDA
PROFILÁCTICA PARA CONTROLAR LA VIBRIOSIS.

LOPEZ RUIZ WILMER ISIDRO
INGENIERO ACUÍCULTOR

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

MACHALA, 29 DE ABRIL DE 2020

MACHALA
2020

APLICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO AISLADAS DE CAMARONES SILVESTRES *Litopenaeus vannamei* COMO UNA MEDIDA PROFILÁCTICA PARA CONTROLAR LA VIBRIOSIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

INDICE DE SIMILITUD

1 %

FUENTES DE INTERNET

0 %

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

www.bioq.unizar.es

Fuente de Internet

<1 %

2

www.periodicojardinero.com

Fuente de Internet

<1 %

3

uvadoc.uva.es

Fuente de Internet

<1 %

4

db.doyma.es

Fuente de Internet

<1 %

5

www.alimentacion-sana.com.ar

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

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

El que suscribe, LOPEZ RUIZ WILMER ISIDRO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado APLICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO AISLADAS DE CAMARONES SILVESTRES *Litopenaeus vannamei* COMO UNA MEDIDA PROFILÁCTICA PARA CONTROLAR LA VIBRIOSIS., 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



LOPEZ RUIZ WILMER ISIDRO
0706390515

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por darme salud y vida, por ser mi guía y permitirme cumplir con esta meta tan anhelada.

A mi padre en paz descansa, a mi madre por inculcarme buenos hábitos y valores, siempre dispuesta a darme consejos, ánimo, confianza.

A mis hermanos, por apoyarme en todo momento y ser parte de esta felicidad y logro.

Agradezco infinitamente a mi directora de tesis Dra. Lita Sorroza Ochoa, quien me motivo, guio y compartió sus conocimientos para realizar la presente investigación.

A todos los docentes de la universidad quienes compartieron sus conocimientos.

Amigos y compañeros que con afecto especial siempre me dieron ánimos para llegar al término de esta carrera.

Muchas gracias.

DEDICATORIA

Está dedicado a Dios y a la memoria de mi padre Telmo Lopez Paqui (+), quien se esforzó por otorgarme el valioso regalo de la educación, quien desde el cielo me bendice y guía para lograr con éxito la culminación de esta carrera profesional, y cumplir uno de sus más grandes sueños.

A mi madre, mujer de nobles sentimientos, con su tierna sonrisa siempre ha sabido aconsejarme y guiarme y de quien he recibido apoyo para seguir adelante en mis objetivos propuestos.

Wilmer Isidro Lopez Ruiz

RESUMEN

El cultivo de camarón ha incrementado a gran escala en los últimos años debido a la intensificación, los sistemas de cultivo se han visto afectados por problemas bacterianos, causando pérdidas económicas, con la finalidad de contrarrestar estos problemas se ha tomado medidas equivocadas usando cantidades exageradas de antibióticos causando resistencia en las bacterias patógenas. Debido a todos estos problemas se optando por el uso de probióticos como una medida profiláctica, logrando con esto una acuicultura sostenible y sustentable, estos probióticos son suplementos microbianos vivos que benefician al huésped y al medio ambiente.

Las principales bacterias patógenas causantes de grandes mortalidades en larvicultura y en las piscinas de engorde son los *Vibrios sp*, estas bacterias extracelulares, se encuentran distribuidos en el agua y el fango de las piscinas tienen la particularidad de propagarse rápidamente durante las primeras seis horas en los camarones, esta enfermedad es conocida como vibriosis, el patógeno ingresa a través de las branquias, por vía oral, colonizan todo el intestino, posteriormente infectan los demás órganos y tejidos provocando daños en el hepatopáncreas, glándula antenal, órgano linfoide, hemolinfa y tejido muscular.

Debido a ello se debe controlar los ataques bacterianos y esto se logra gracias a los mecanismos de acción que tienen las bacterias probióticas, estos pueden ser por exclusión competitiva ya sea por sitios de adhesión o por nutrientes, otro mecanismo es interrumpir el Quorum Sensing, además ciertos probióticos presentan efectos bactericidas y bacteriostáticos, son capaces de producir diferentes compuestos inhibidores, ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, e incluso formar biopelículas y liberar autoinductores evitando que las bacterias patógenas puedan adherirse a la mucosa intestinal. Preferiblemente es mucho mejor usar mezclas de cepas probióticas con cantidades superiores a 10^8 , logrando múltiples beneficios, se incrementa el sistema inmune, se logra mejor crecimiento y mayor supervivencia en los organismos de cultivo, además mejora la calidad de agua reduciendo los niveles de amoníaco y nitrito.

El objetivo de la presente investigación fue demostrar que las bacterias probióticas aisladas de camarones silvestres pueden controlar la vibriosis, estas bacterias fueron aisladas del hepatopáncreas y del intestino de camarones silvestres por separado, logrando aislar 9 cepas distintas, las mismas que fueron diferenciadas por su color y tamaño,

posteriormente se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* e *in vivo* frente a *Vibrios sp.* En la primera prueba realizada dos cepas mostraron un halo de inhibición y esas cepas fueron congeladas a -80 °C luego se realizaron pruebas de viabilidad de las cepas congeladas, y por ultimo pruebas *in vivo* con postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, para evaluar el efecto protector de las bacterias probióticas, aquí se utilizó una mezcla de las dos bacterias y de los productos extracelulares, antes de realizar las pruebas *in vivo* se realizaron pruebas de inocuidad utilizando una concentración de 10^7 de bacteria esta prueba se realizó con postlarvas con un peso de 0.005 g, un total de 50 postlarvas en un litro de agua de mar tratada.

Al finalizar las pruebas de desafío los datos obtenidos fueron llevados al programa ANOVA demostrándose que hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos en función a la supervivencia de las larvas de camarón, lo que sugiere que estas cepas junto con los productos extracelulares podrían ser utilizadas para controlar la vibriosis.

Palabras claves: bacterias probióticas, bacterias patógenas, productos extracelulares, postlarvas, camarones.

ABSTRACT

Shrimp farming has increased on a large scale in recent years. Due to intensification, farming systems have been affected by bacterial problems, causing economic losses. In order to counteract these problems, wrong measures have been taken using exaggerated amounts of antibiotics causing resistance in pathogenic bacteria. Due to all these problems, the use of probiotics is chosen as a prophylactic measure, thus achieving sustainable and sustainable aquaculture. These probiotics are live microbial supplements that benefit the host and the environment. The main pathogenic bacteria that cause great mortality in larvae culture and in fattening pools are *Vibrios* sp. These extracellular bacteria are distributed in the water and the pool mud has the peculiarity of spreading rapidly during the first six hours in the shrimp. In this disease known as vibriosis, the pathogen enters through the gills, orally, colonize the entire intestine, then infect the other organs and tissues causing damage to the hepatopancreas, antennal gland, lymphoid organ, hemolymph and muscle tissue. Due to this, bacterial attacks must be controlled and this is achieved thanks to the mechanisms of action that probiotic bacteria have. These can be by competitive exclusion either by adhesion sites or by nutrients. Another mechanism is to interrupt the Quorum sensing. In addition, certain probiotics have bactericidal and bacteriostatic effects, are capable of producing different inhibitor compounds, organic acids, hydrogen peroxide, and even form biofilms and release auto-inductors preventing pathogenic bacteria from adhering to the intestinal mucosa. Preferably it is much better to use mixtures of probiotic strains with amounts greater than 10^8 , achieving multiple benefits, the immune system is increased, better growth and greater survival in culture organisms is achieved, and water quality is improved by reducing the levels of Ammonia and nitrite.

This work demonstrates the multiple benefits that can be obtained through the use of native bacteria as a prophylactic measure in culture systems. These native bacteria were isolated from the hepatopancreas and the intestine of wild shrimp separately, managing to isolate 10 different strains. Also, they were differentiated by their color and size, subsequent inhibition tests were performed in vitro and in vivo against *Vibrios* sp. In the first test performed, the two strains showed a halo of inhibition and those strains were frozen at -80°C . After, another test performed viability tests of frozen strains, gram stain, and finally in vivo tests with *Litopenaeus vannamei* shrimp postlarvae, to evaluate the protective effect of probiotic bacteria. Here, a mixture of the two bacterias and

supernatants was used. Before performing the tests in vivo, safety tests were performed using a concentration of 10^7 of this bacterium. The test was performed with post larvae of 180 per gram, in a total of 50 in a liter of treated seawater.

At the end of the challenge tests, the data obtained were taken to the Anova program showing that there is a significant statistical difference between the treatments based on the survival of the shrimp larvae, which suggests that these strains together with the extracellular products could be used to control vibriosis.

Keywords: probiotic bacteria, pathogenic bacteria, extracellular products, postlarvae, shrimp.

ÍNDICE DE CONTENIDO

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. Bacterias probióticas.....	14
5.1.1. Beneficios de las bacterias probióticas.....	14
5.1.2. Mecanismo de acción de bacterias probióticas.....	14
5.1.3. Actividad antagónica de las bacterias probióticas frente a <i>Vibrios sp.</i>	15
5.1.4. Mezclas de bacterias probióticas.....	16
5.1.5. Efectos duales de probióticos mixtos.....	16
5.2. Patógenos que afectan al cultivo de camarón.....	17
5.2.1. Tipos de Vibriosis.....	17
5.2.2. Colonización de Vibrios.....	17
5.2.3. Enfermedades ocasionadas por Vibrios.....	18
5.2.4. Distribución de los Vibrios en un estanque de producción.....	19
5.2.5. Cepas de Vibrios resistentes a los antibióticos.....	19
6. MATERIALES.....	19
6.1. Materiales de laboratorio.....	19
6.2. Material biológico.....	20
6.3. Equipos.....	20
7. METODOLOGÍA.....	21
7.1. Obtención de organismos.....	21
7.1.1. Extracción de hepatopáncreas y de intestino.....	21

7.1.2.	Siembra de las muestras en agar MRS y Marino.....	22
7.1.3.	Identificación por color y tamaño.....	22
7.2.	Obtención de Vibrios.....	22
7.3.	Prueba de inhibición.....	22
7.3.1.	Prueba con <i>Vibrios sp.</i>	22
7.4.	Conservación de cepas a -80°C.....	23
7.5.	Pruebas de viabilidad a – 80 °C.....	23
7.6.	Pruebas de viabilidad en el agua.	23
7.7.	Pruebas de inocuidad.....	23
7.8.	Obtención de postlarvas.	24
7.9.	Obtención del agua de cultivo.....	24
7.10.	Condición experimental.....	24
7.11.	Diseño experimental.....	24
7.11.1.	Descripción de cada tratamiento.....	25
7.11.2.	Preparación de los inóculos.	25
7.11.3.	Pruebas de desafío.	25
7.12.	Procedimiento estadístico.	26
8.	RESULTADOS.....	27
8.1.	Identificación por color y tamaño.	27
8.2.	Pruebas de inhibición <i>in vitro.</i>	27
8.3.	Viabilidad de las cepas aisladas.....	28
8.4.	Inocuidad de las cepas.	28
8.5.	Inhibición <i>in vivo.</i>	28
9.	DISCUSIÓN.....	33
10.	CONCLUSIÓN.....	34
11.	RECOMENDACIÓN.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de Vibrios sp por gramo de hepatopáncreas.	28
Tabla 2. Análisis ANOVA unidireccional realizado para la variable supervivencia.	29
Tabla 3. Prueba de rango múltiple de Duncan.....	29

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1. Análisis de las medias de supervivencia con relación a los diferentes tratamientos utilizados.....	30
Grafico 2. Supervivencia en relación con cada tratamiento y los días que duro el experimento.	31
Grafico 3. Supervivencia porcentual de cada tratamiento.	32

1. INTRODUCCIÓN.

La acuicultura ha ido aumentando a gran escala en Ecuador y en muchos otros países, la tecnología nos permite intensificar nuestros sistemas de producción utilizando altas densidades de siembra, volviéndose inestable por el mal manejo, proliferándose nuevos brotes bacterianos. Debido a esto Cai et al. (2018) recomiendan que se aplique bacterias probióticas en los cultivos como una medida profiláctica, ya que el mal uso de sustancias quimioterapéuticas y antibióticos han ocasionado un incremento de cepas patógenas con un genoma resistente a ciertos antibióticos.

Por eso se considera oportuno optar por otras alternativas como es el uso de probióticos en los cultivos desde larvicultura hasta los sistemas de engorde así lograremos beneficios para el huésped y para el medio ambiente, tal como explica Díaz y Martínez, (2009) preferiblemente que estas bacterias sean autóctonas, propias de nuestro ecosistema. Por otro lado Valdes et al. (2013) recomienda aplicar bacterias autóctonas en los cultivos debido a que si aplicamos bacterias exógenas es posible que estas presenten posibles efectos nocivos o no cumplan los requerimientos por el cual son inoculadas.

Los organismos acuáticos albergan una gran biodiversidad de asociaciones microbianas benéficas en su microbiota intestinal, identificados como futuros candidatos probióticos, los mismos que han ganado una gran popularidad ofreciéndonos muchos beneficios para la industria acuícola, el uso de probióticos como una alternativa sostenible y sustentable mejora la salud de los organismos de cultivo, mediante algunos factores como la producción de compuestos inhibitorios, la exclusión competitiva o elevando el sistema inmune del huésped, debido a la capacidad inmunomoduladora de las bacterias probióticas (Lazado et al. 2015).

Los probióticos son suplementos microbianos vivos, formados por cultivos simples o mixtos que afecta de manera beneficiosa al huésped. Se han identificado una gran población bacteriana que tienen un potencial probiótico en la acuicultura los cuales son aplicados mediante el alimento para que sea ingerido por los organismos de cultivo promoviendo la respuesta inmune innata o directamente al agua con el propósito de manipular las comunidades presentes en los sistemas de producción compitiendo con bacterias patógenas (Kumar et al. 2016).

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

El principal patógeno que ataca a los sistemas de producción en larvicultura y en las piscinas de engorde son las bacterias extracelulares específicamente los *Vibrios sp*, ocasionando una gran mortalidad en los tanques de cultivo debido a su gran patogenicidad, y la forma comúnmente de controlar los ataques bacterianos ha sido con el uso de cantidades exageradas de antibióticos provocando resistencia bacteriana, lo que ha promovido la búsqueda de alternativas biológicas y amigables al medio ambiente.

3. JUSTIFICACIÓN.

En la presente investigación se realizó una revisión sobre el uso de medidas profilácticas utilizando bacterias probióticas como una alternativa al uso de antibióticos, debido a que los usos excesivos de estos fármacos provocan una mutación en el genoma de las bacterias ocasionando resistencia, que a su vez es transferida mediante plásmidos a otras bacterias patógenas produciendo un daño al medio ambiente

Por lo antes expresado sería de gran beneficio promover el uso de bacterias probióticas en los sistemas de cultivo desde larvicultura hasta los sistemas de engorde, debido a ello se realizaron pruebas *in vitro* de sensibilidad para observar el efecto antagónico que poseen las bacterias aisladas de camarones silvestres frente a la presencia de una cepa de *Vibrios sp.*

Posteriormente se realizó una prueba *in vivo* en post larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* para determinar la supervivencia y el efecto protector de las bacterias y de sus respectivos productos extracelulares, frente a una cepa de *Vibrios sp.*

4. OBJETIVOS.

4.1.Objetivo general.

Evaluar el potencial probiótico de bacterias aisladas de camarones silvestres frente a *Vibrios sp.*

4.2.Objetivos específicos.

Aislar cepas de bacterias con potencial probióticas de camarones silvestre *Litopenaeus vannamei*.

Aislar cepas de *Vibrios sp* de camarones enfermos *Litopenaeus vannamei* cultivados en piscinas de engorde.

Evaluar el efecto antagónico de las bacterias probióticas aisladas de camarones silvestres frente a la presencia de *Vibrios sp.*

Determinar la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* usando mezclas de probióticos y post-bióticos frente a una infección experimental con *Vibrios sp.*

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

5.1. Bacterias probióticas.

5.1.1. Beneficios de las bacterias probióticas.

Con la aplicación de bacterias probióticas en los sistemas de cultivo, se está optando por una alternativa sostenible con el único fin de minimizar el uso de antibióticos, ya que ciertas bacterias probióticas presentan múltiples beneficios en el huésped (Zorriehzahra et al. 2016).

Según Vieco et al. (2019) dicen que estos beneficios se dan debido a la interacción de los microorganismos en el intestino, además estos microorganismos son amigables al medio ambiente y con el uso de estas bacterias probióticas se puede prevenir el uso de antibióticos.

Mediante una investigación realizada por Chai et al. (2016), demostraron que cepas de *Bacillus sp* aisladas del intestino de *Fenneropenaeus chinensis*, suministrado a través del alimento a camarones *Litopenaeus vannamei* presenta múltiples beneficios tales como, mejor supervivencia, peso, digestión, absorción de nutrientes y las actividades enzimáticas digestivas (amilasa, proteasa, lipasa) en el intestino medio, además se evidencio un incremento de la transcripción de hemocianina y profenoloxidasa (proPO), logrando aumentar el sistema inmune de los camarones.

5.1.2. Mecanismo de acción de bacterias probióticas.

Uno de los principales mecanismos de acción de las cepas probióticas es interrumpir el Quorum Sensing controlando así la patogenicidad de otras bacterias, además presentan efectos bactericidas y bacteriostáticos frente a las bacterias patógenas (Zorriehzahra et al. 2016).

Estas bacterias probióticas también son capaces de producir diferentes productos extracelulares (ECPS) inhibidores, denominados también bacteriocinas, ácidos orgánicos (ácido láctico), peróxido de hidrogeno, diacetilo, y dióxido de carbono, todas estas sustancias tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas además los probióticos excluyen a los patógenos compitiendo por sitios de adhesión y por nutrientes, son capaces de formar biopelículas y liberar autoinductores evitando que las bacterias patógenas puedan adherirse a la mucosa intestinal, asimismo están dotadas de funciones

enzimáticas específicas (amilasa, proteasa) mejorando el sistema inmunitario de los organismos de cultivo (Vieco et al. 2019).

5.1.3. Actividad antagónica de las bacterias probióticas frente a *Vibrios sp.*

En una investigación realizada por Zheng y Wang (2017), aislaron 18 cepas de bacterias del tracto digestivo de camarones *Litopenaeus vannamei*, de las cuales solo *Lactobacillus pentosus* tuvo la gran particularidad de producir tres enzimas extracelulares (proteasa, lipasa celulosa), demostrándose su actividad antagónica frente a tres patógenos (*V. vulnificus*, *V. rotiferianus*, *V. campbellii*), luego de la infección experimental a un grupo de camarones con los tres patógenos antes mencionados, al final del ensayo se obtuvo una mayor supervivencia, mayor actividad enzimática y mejor crecimiento.

En otro estudio realizado por Sha et al. (2016), usando microscopia de fluorescencia, demostraron que *L. pentosus* excluyó competitivamente a *V. parahaemolyticus* en el intestino de los camarones, además se observó una disminución en la densidad celular de *V. parahaemolyticus* después de 8 horas de realizar un cocultivo debido a los componentes intracelulares de *L. pentosus*.

Du et al. (2019), demostraron que las proteínas de la superficie de *L. pentosus*, son necesarias para la adhesión y colonización del probiótico en el intestino de los camarones, logrando mejorar el sistema inmune, desplazando a los patógenos por exclusión competitiva y promoviendo el crecimiento de más bacterias benéficas, logrando una mayor supervivencia que los demás tratamientos, por PCR se evidenció que los genes inmunes mejoraron (lisozima, proPO, LGBP, PEN-3 α , crustin) luego de tres días de desafío con *V. parahaemolyticus*.

Tepaamorndech et al. (2019), aislaron una cepa de *Bacillus aryabhatai* de un estanque acuícola, posteriormente demostraron que esta cepa presentaba actividad antimicrobiana frente *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* al ser aplicada como suplemento en la dieta de camarones, evidenciándose una reducción de *Vibrios sp* en el tracto gastrointestinal de *L. vannamei*, además se incrementaron los genes que codifican péptidos microbianos, las enzimas antioxidantes en el hepatopáncreas, la actividad fenoloxidasas en los hemocitos, y la actividad antioxidante en el plasma, mejorando el sistema inmune innato a nivel sistémico. Según Iwasaki y Medzhitov (2015), las infecciones ocasionada por bacterias patógenas son reconocidas por el sistema inmune innato provocando una barrera de defensa inmediata generando así una inmunidad adaptativa duradera.

5.1.4. Mezclas de bacterias probióticas.

Wang et al. (2019), al agregar una mezcla de varios probióticos por encima de 10^8 en las postlarvas mejoro la respuesta inmunológica, aumento la actividad de la fenoloxidasa, de la lisozima y de los hemocitos, mejoro el crecimiento y la supervivencia luego de una infección experimental con *V. alginolyticus*, también Vargas et al. (2017), dicen que al aplicar una mezcla de bacterias probióticas ya sea al agua o al alimento, actúa modificando la biota bacteriana beneficiando al huésped, pero deben agregare bacterias propias de ecosistemas marinos, ya que el uso de cepas probióticas no nativas pueden ocasionar un gran riesgo debido que estas tienen la capacidad de modificar su genoma, ocasionando un desequilibrio en el ambiente marino. Debido a esto Lazado et al. (2015), hacen un enfoque refiriendo que los organismos acuáticos albergan una gran diversidad microbiológica entre estos varias bacterias con potencial probiótico y capacidades inmunomoduladoras.

Al evaluar un cultivo mixto de dos cepas de *Bacillus sp* generadoras de poli- β -hidroxibutirato aisladas de camarones cultivados en estanques se observaron efectos benéficos debido a que el PHB genera una resistencia frente a la vibriosis además, se incrementó el sistema inmune, mejoro la supervivencia y el crecimiento de las postlarvas al ser desafiadas con *Vibrio campbelli*, Laranja et al. (2014). En otra investigación realizada por Laranja et al. (2017), demostraron que *Bacillus sp* generadora de PHB estimula los genes inmunes innatos (proPO y TGasa) en postlarvas, considerándose un potente inmunoestimulante.

5.1.5. Efectos duales de probióticos mixtos.

Según las investigaciones realizadas por Nimrat et al. (2012), el uso de cepas mixtas de *Bacillus sp* presenta efectos benéficos en el medio acuático y en las postlarvas, obteniéndose mejor crecimiento y supervivencia, también se incrementó el número de bacterias heterotróficas, además mediante la aplicación de cepas mixtas se redujo los niveles de amoniac y nitrito mejorando la calidad del agua. De la misma manera Cai et al. (2019), demostraron efectos positivos en postlarvas de camarón *L. vannamei* y en el agua de cultivo, con la aplicación de una mezcla de dos cepas de *Bacillus*, (*B. licheniformis* y *B. flexus*) mejoro el crecimiento, supervivencia, la actividad enzimática inmune innata, la actividad enzimática digestiva, la tolerancia al estrés, además se evidencio una reducción de metabolitos tóxicos logrando mejorar la calidad del agua.

5.2. Patógenos que afectan al cultivo de camarón.

Los principales patógenos que afectan los cultivos de larvicultura y engorde, son las bacterias Gram negativas, son oportunistas y atacan al huésped cuando su sistema inmune es desfavorable o presentan problemas de estrés, también atacan cuando la concentración de bacterias patógenas sobrepasa los límites máximos en UFC, estas bacterias predominan en los ambientes marinos (Cuéllar et al. 2008).

5.2.1. Tipos de Vibriosis.

La vibriosis es una enfermedad causada por bacterias extracelulares potencialmente patógenas, siendo la causa de mortalidades en larvicultura y sistemas de engorde de camarón *Litopenaeus vannamei*, puede presentarse de varias maneras como Vibriosis Oral, Vibriosis localizada en heridas, Vibriosis entérica, Vibriosis cuticular y de apéndices, Vibriosis sistémica, en larvicultura las postlarvas son afectadas por *V. campbellii* y por *V. harveyi* responsables de la Vibriosis luminiscente colonizando la zona oral, apéndices, intestino medio y hepatopáncreas provocando una septicemia causando una gran mortalidad de postlarvas, además el síndrome de Zoea II ocasionado por *V. harveyi* (Morales y Cuéllar, 2014).

5.2.2. Colonización de Vibrios.

Según Morales y Cuéllar (2014), los Vibrios pueden ingresar mediante vía oral, a través de las branquias debido que el exoesqueleto que las recubre es muy delgado, además a través de heridas, siendo la especie de *Vibrio sp* capaz de penetrar el exoesqueleto por considerarse una bacteria quitinoclastica. Además Cuéllar (2013), menciona que el intestino medio de los camarones es el lugar donde mayormente ingresan los patógenos que se encuentran presentes en el alimento agua y suelo para posterior colonizar todo el intestino y así infectar los demás órganos mediante la hemolinfa, provocando lesiones graves en el hepatopáncreas, baculización de células epiteliales ocasionando una vibriosis sistémica causando daño total en el hepatopáncreas, glándula antenal, órgano linfoide, corazón, hemolinfa y tejido muscular.

Luego de colonizar el huésped y si las concentraciones de *Vibrios sp* sobrepasan los límites establecidos de unidades formadoras de colonias estas se comunican y según indica Boyaci et al. (2016), lo hacen mediante el Quorum Sensing siendo este un medio de comunicación de las bacterias Gram negativas incluidos los *Vibrios sp*, es mediante la

señal de moléculas químicas denominados autoinductores, estos a la vez activan los genes responsables de la producción del factor de virulencia.

5.2.3. Enfermedades ocasionadas por Vibrios.

La necrosis del hepatopáncreas séptico (NHP-S) esta enfermedad bacteriana está asociada a dos bacterias patógenas *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* que han sido detectados en la hemolinfa de camarones adultos observándose mediante histopatología infiltración de hemocitos, formación de nódulos hemocíticos, hipertrofia de lumen, melanización, necrosis, atrofia de los túbulos del hepatopáncreas y desprendimiento celular Morales et al. (2011), además Varela (2016), mediante histopatología también observo cúmulos de bacterias extracelulares que se presentaron como masas basofílicas en los espacios intertubulares.

En los sistemas de engorde los más afectados son los juveniles, el mayor problema en la última década de vibriosis ha sido por los *V. parahaemolyticus*. Estos producen una toxina ocasionando grandes mortalidades, la enfermedad es denominada necrosis hepatopancreatica aguda (AHPND), esta cepa patógena es portador de un plásmido que produce toxinas virulentas PirA-B binario, estas toxinas se encontraron tanto en el intestino como en el hepatopáncreas Lai et al. (2015). Según Khimmakthong y Sukkarun (2017), los *V. parahaemolyticus* causante de (AHPND) usa el hepatopáncreas para propagarse rápidamente durante las primeras seis horas, infectando órganos, tejidos y la hemolinfa, sin embargo luego de las seis horas se observa una reducción de *V. parahaemolyticus* gracias al sistema inmunológico de los camarones, pero las toxinas que produce este patógeno siguen dañando los órganos y tejidos al punto de causar la mortalidad en los organismos de cultivo.

Mediante histopatología Ananda et al. (2017), observaron infiltración de nódulos en la epidermis, órgano excretor y túbulos del hepatopáncreas atrofiados, infiltración hemocítica, engrosamiento del espacio intertubular, desprendimiento del epitelio tubular del hepatopáncreas, colonias bacterianas, cuerpos apoptoticos, cambios hipoplásticos en los túbulos sin células B, R y F, formación de granulomas, concreción en los túbulos, necrosis, la degeneración de las células epiteliales tubulares va desde el extremo proximal al distal, además órgano linfoide presente con formación de esferoides, degeneración de la matriz estomacal y de las estructura glandulares en los apéndices, melanización,

perdida de la capa epitelial del esófago, en el estómago presento hinchazón con secreción mucinosa.

5.2.4. Distribución de los Vibrios en un estanque de producción.

En una investigación realizada por Suárez y Medina (2015), evaluaron la distribución de *Vibrios sp* de un estanque de cultivo de camarón, observándose que *V. parahaemolyticus* prevalece en el agua y sedimento en grandes cantidades a diferencia de *V. alginolyticus* debido a estos resultados se debe tomar medidas preventivas ya que el camarón busca el fango para realizar sus procesos de muda y es allí donde los organismos tienden a ser susceptibles a cualquier patógeno, ya que Khimmakthong y Sukkarun (2017), en una investigación demostraron que los *V. parahaemolyticus* tienen la gran particularidad de propagarse rápidamente durante las seis primeras horas.

5.2.5. Cepas de Vibrios resistentes a los antibióticos.

La cepa *V. parahaemolyticus* productores de toxinas virulentas PirA-B binario presenta resistencia a varios antibióticos Lai et al. (2015). Debido a eso Dash et al. (2017), mencionan que se debe usar alternativas y erradicar el mal uso de antibióticos, promoviendo el uso bacterias probióticas como medida profiláctica. Posterior a eso Junprung et al. (2017), confirman mediante un trabajo de investigación que el uso de bacterias probióticas son una alternativa a los antibióticos, con la aplicación de probióticos se puede tener una mejor supervivencia y tener una tolerancia a los *V. parahaemolyticus* por la activación del sistema proPO.

6. MATERIALES.

El presente trabajo se realizó en la Universidad Técnica De Machala, en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicada en la Av. Panamericana 5 ½ km Vía Machala – Pasaje.

Ubicada con las siguientes coordenadas geográficas:

Longitud: 79°54'47.2"W

Latitud: 3°17'25.7"S

6.1. Materiales de laboratorio.

Mechero

Estufa

Balanza gramera

Vaso de precipitación

Asa de Drigalsky

Equipo de disección

Acuarios

Aireadores

Micropipetas

Varilla de vidrio

Papel aluminio

Alcohol

Solución salina

Agua destilada

Mascarilla

Mandil

Guantes

Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa)

Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Agar Nutritivo

CHROMagar

6.2.Material biológico.

Postlarvas

6.3.Equipos.

Autoclave

Espectrofotómetro

Centrifuga

Cámara de flujo laminar

Ultra congelador

7. METODOLOGÍA.

La metodología para aislar bacterias de camarones silvestres y realizar las pruebas pertinentes, se desarrollara tal como indica (Sha et al. 2016).

7.1. Obtención de organismos.

Para la extracción de bacterias autóctonas, se capturaron dos camarones silvestres adultos (*Litopenaeus vannamei*) con un peso promedio de 58 gramos cada uno, a una milla del mar abierto frente a Jámbeli, se los mantuvo con aireación y sin alimento hasta el siguiente día, fueron transportados vivos con agua del mar desde el puerto bolívar hasta la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, allí fueron llevados hasta el laboratorio de Maricultura, se los mantuvo por una hora con abundante aireación hasta preparar el material de disección.

7.1.1. Extracción de hepatopáncreas y de intestino.

Los camarones fueron llevados hasta el laboratorio de sanidad vegetal allí con ayuda de pinzas, tijeras y bisturí se procedió a levantar el cefalotórax para extraer el hepatopáncreas y luego el intestino, las muestras se llevaron a la cámara de flujo laminar, el resto de procedimientos se lo realizo con total asepsia para evitar una contaminación.

Se separó el hepatopáncreas y el intestino de cada uno de los organismos, se colocó el hepatopáncreas en una funda estéril para pesar y luego se macero, el intestino también se pesó y se macero, el mismo procedimiento se lo realizo con los dos organismos.

Las muestras maceradas se las coloco en tubos de ensayo con solución salina preparada al 1% allí se homogenizo, se hicieron dos diluciones de la muestra del hepatopáncreas (1^{10} , 1^{100}), posterior las muestras del intestino se macero y se colocó en los tubos de ensayo teniendo una concentración de 1^{10} en estas muestras no se realizaron más diluciones.

7.1.2. Siembra de las muestras en agar MRS y Marino.

Se extrajo 1 μ l de cada tubo de ensayo y se sembró en agar selectivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) con la finalidad de obtener Bacterias Acido Lácticas, también se sembró 1 μ l de cada muestra en agar Marino con el fin de aislar bacterias con potencial probiótico, se las dejó incubar por 48 horas a 30°C.

Luego de 24 horas se observó crecimiento bacteriano en las placas con agar marino, estas fueron refrigeradas para retardar el metabolismo, mientras que en las placas con agar MRS se observó crecimiento bacteriano después de 48 horas.

7.1.3. Identificación por color y tamaño.

Con ayuda de un estereoscopio se procedió a identificar por color y tamaño las cepas obtenidas de los camarones silvestres.

Después de seleccionar las cepas, se sembraron en agar MRS y en agar Marino para obtener cepas más puras estas se incubaron por 24 horas en oscuridad a 30°C.

Luego de las 24 horas se observó crecimiento en todas las cajas Petri, se sembró nuevamente todas para purificar y obtener cepas frescas que no pasen de 20 horas para proceder a realizar las pruebas de inhibición frente a *Vibrios* sp.

7.2. Obtención de *Vibrios*.

Las cepas de *Vibrios* sp se obtuvieron de camarones *Litopenaeus vannamei* de un peso promedio de 9.35 g de un cultivo experimental que se realizó en la estación piscícola ubicada en la Facultad De Ciencias Agropecuarias.

7.3. Prueba de inhibición.

7.3.1. Prueba con *Vibrios* sp.

El efecto antagónico de las cepas aisladas frente a *Vibrios* totales se realizó mediante el método de difusión en agar, aquí las cepas del patógeno se diluyeron en solución salina al 1% y se ajustó a una absorbancia de uno con una longitud de onda de 600 nm en el espectrofotómetro (SPECTRONIC 21 D) para obtener una concentración 10^9 , luego se realizó otra dilución dejando a una concentración final de 10^8 ufc/l.

Esta concentración de 10^8 ufc/l de *Vibrios sp* se sembró 100 ul en tres placas con agar nutritivo y posterior se colocó las nueve cepas que se aislaron de los camarones silvestres, las placas se dejaron en oscuridad por 24 horas a temperatura ambiente.

7.4.Conservación de cepas a -80°C.

Para conservar las cepas MaH1 y MI1 con potencial probiótico se utilizó medio de cultivo líquido (Caldo Marino), luego de preparar el medio de cultivo se agregó glicerol (sustancia crioprotectora) el 20% del volumen total para evitar la cristalización de las bacterias y el daño de la pared celular, este medio de cultivo fue autoclavado por 15 min a 19 libras de presión y 250 °F.

Previamente, las cepas MaH1 y MI1 fueron sembradas en placa y luego de 18 horas con un hisopo se extrajo toda la cantidad de bacteria de cada placa y se la colocó por separado en el medio de cultivo líquido, para conservar se extrajo 1ml con una micropipeta y se depositó en tubos eppendorf de 2 ml para llevar las muestras a -80 grados.

7.5.Pruebas de viabilidad a – 80 °C.

Luego del transcurrir 52 días se procedió a la activación de las bacterias seleccionadas que se encontraban congeladas a -80 grados, sembrándolas en medio de cultivo sólido para comprobar la viabilidad.

7.6.Pruebas de viabilidad en el agua.

Para determinar la viabilidad de las bacterias MaH1 y MI1 se agregó 1 ml en dos acuarios con agua de mar tratada y autoclavada, se dejaron estos acuarios por 24 horas para posterior sacar una muestra de cada acuario y sembrar en medio de cultivo sólido y observar el crecimiento de las dos bacterias antes mencionadas.

7.7.Pruebas de inocuidad.

Al comprobarse la viabilidad de las bacterias congeladas en agua de mar se procedió a sembrar en medio de cultivo líquido (Caldo Marino) para realizar las pruebas de inocuidad.

Para saber si las bacterias son inocuas se agregó una concentración 10^7 UFC/L, previamente cultivadas en medio líquido por 20 horas y separada de los productos extracelulares. Luego en un acuario se colocaron un total de 15 postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei* por 1 litro de agua de mar tratada a 27 partes de salinidad, el agua

se mantuvo a 26 °C. Durante el transcurso del ensayo se aplicó por separado una concentración de 10⁷ de bacteria y 10 ml de sobrenadante, se alimentó dos veces al día con alimento balanceado y se realizó un recambio de fondo diario del 5 %, se observó si existía mortalidad luego de transcurrir las 72 horas.

7.8. Obtención de postlarvas.

Para la realización del trabajo experimental se obtuvieron un total de 100 postlarvas de un peso promedio de 0.33 g del precriadero de la camaronera ROCORMIN ubicada en el cantón Santa Rosa.

7.9. Obtención del agua de cultivo.

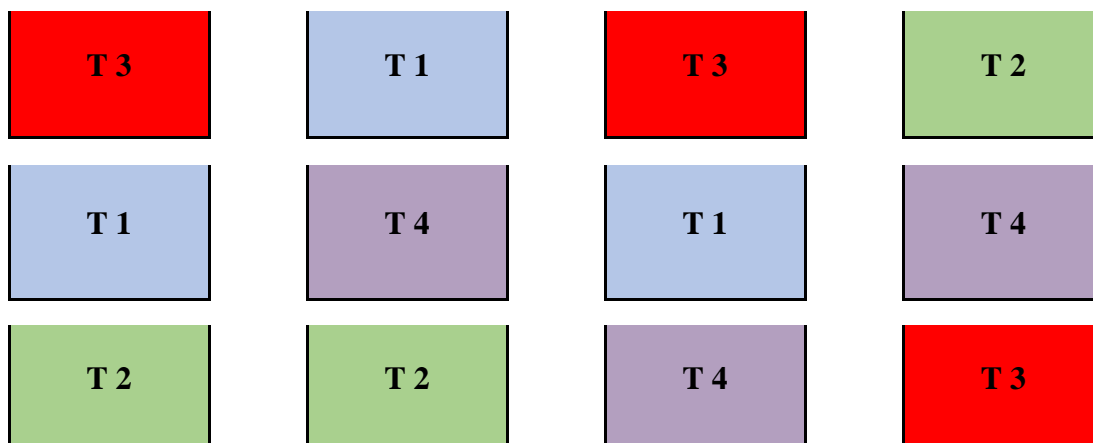
El agua de mar tratada a 28 ‰ se obtuvo de un laboratorio de larvicultura ubicado en el sector el coco.

7.10. Condición experimental.

La prueba experimental se la realizó por triplicado en la Facultad De Ciencias Agropecuarias aquí se dividió aleatoriamente 60 postlarvas en 12 acuarios con un litro de agua, conteniendo 5 postlarvas cada acuario, se los mantuvo por siete días alimentando con dieta comercial dos veces al día las heces se eliminaron con un recambio de fondo del 15 % diario, el agua se mantuvo a 28 ‰ y 24 – 25 °C con aireación continua, con un periodo previo de aclimatación.

7.11. Diseño experimental.

Para analizar el efecto protector, la supervivencia y efecto antagónico in vivo de las cepas aisladas y sus productos extracelulares frente a *Vibrios sp* se realizó el siguiente diseño completamente al azar que consta de cuatro tratamientos por triplicado cada uno.



7.11.1. Descripción de cada tratamiento.

T1.- Aplicación de mezcla de las dos bacterias MaH1 y MI1 en concentración 1×10^7 por tres días, al cuarto día 1×10^6 *Vibrios sp.*

T2.- Aplicación de mezcla de los productos extracelulares 10 ml de MaH1 y MI1 primer día, al cuarto día 1×10^6 *Vibrios sp.*

T3.- Aplicación de *Vibrios sp* 1×10^6 el cuarto día control negativo.

T4.- No se aplicó nada testigo absoluto.

El diseño tuvo una duración de siete días, en el transcurso las postlarvas eran alimentadas con dieta comercial 35 % de proteína dos veces al día, con recambio de fondo del 5 % diario para eliminar heces, el agua se mantuvo a 28 ‰ y 24 – 25 °C con aireación continua.

7.11.2. Preparación de los inóculos.

Los cultivos bacterianos de las cepas con actividad antagónica se centrifugaron durante 10 minutos a 4.500 rpm y 10 °C. Las células se lavaron dos veces con solución salina, posteriormente se resuspendieron en 40 ml de solución salina, esto se aplicó a los acuarios por tres días seguidos.

7.11.3. Pruebas de desafío.

Al cuarto día de aplicar las bacterias probióticas y su respectivo sobrenadante, en los tratamientos (1-2-3) se procedió a infectar con una cepa patógena de *Vibrios sp* en concentración de 1×10^6 , las condiciones fueron las mismas para los tres tratamientos, tal como se mencionó anteriormente, la tasa de supervivencia se registró todos los días después de la aplicación del patógeno hasta finalizar el experimento.

Para determinar la cantidad de *Vibrios sp* totales se procedió a extraer el hepatopáncreas de las postlarvas de cada tratamiento por separado dentro de la cámara de flujo laminar con el fin de evitar una contaminación, posterior se separó un gramo de cada muestra macerada y se las colocó en tubos de ensayo con 9 ml de solución salina preparada al 1% allí se homogenizó y se hicieron dos diluciones (1^{100} , $1^{1.000}$).

Estas muestras se sembraron en placas Petri con CHROMagar, se dejaron incubar a temperatura ambiente y luego de 24 h se procedió a realizar un conteo de los *Vibrios sp* en cada placa.

7.12. Procedimiento estadístico.

Para determinar la supervivencia de las post larvas luego de la prueba de desafío frente a *Vibrios sp*, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional con un nivel de confianza del 95% para verificar si existía diferencia estadística entre los tratamientos, los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferente. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22 para Windows.

8. RESULTADOS.

8.1. Identificación por color y tamaño.

Se clasifico un total de 9 cepas distintas.

De las cuales siete cepas se obtuvieron del intestino sembrado en agar MRS, y dos de agar Marino, las cepas tienen las siguientes características:

Cepa circular color crema y de tamaño pequeña (MI1).

Cepa circular color crema y de tamaño grande (MI2).

Cepa de forma irregular, color crema y de tamaño grande (MI3).

Cepa circular color amarillo y de tamaño pequeño (MI4).

Cepa de forma circular, color blanco y de tamaño grande (MI5).

Cepa circular color rojo y de tamaño grande (MI1C2).

Cepa circular color amarilla y de tamaño pequeña (MI2C2).

Solamente dos cepas se obtuvieron del hepatopáncreas de los camarones silvestres al sembrar en agar Marino.

Cepa circular color amarilla y de tamaño pequeña (MaH1).

Cepa circular color blanca y de tamaño pequeña (MabH1)

8.2. Pruebas de inhibición *in vitro*.

Luego de 24 horas de haber expuesto las cepas frente al *Vibrio sp* solo dos presentaron un efecto inhibitorio, estas cepas fueron identificadas como MaH1 y MI1

La cepa MaH1 presento un halo de 6 mm luego de 24 horas, mientras que la cepa MI1 presento un halo de 8 mm a las 32 horas.

Esta prueba se realizó dos veces y en la repetición con estas dos cepas MaH1 y MI1 volvieron a presentar un halo pero esta vez mucho mayor al que se observó anteriormente.

La cepa MaH1 presento un halo de 14 mm luego de 18 horas, mientras que la cepa MI1 presento un halo de 9 mm a las 32 horas.

8.3. Viabilidad de las cepas aisladas.

Luego del transcurso de 18 horas se pudo observar crecimiento de las dos bacterias MII y MaH1 sembradas en medio de cultivo sólido, luego de permanecer 52 días en un ultracongelador a -80 °C crecieron sin dificultad.

Asimismo, se pudo verificar que luego de 24 horas al sembrar muestras de agua de mar de los acuarios en placas Petri con medio de cultivo sólido se observó crecimiento de las bacterias MII y MaH1 lo que indican que tienen la capacidad de permanecer en el agua por este tiempo.

8.4. Inocuidad de las cepas.

Después de la exposición de las Postlarvas a las bacterias seleccionadas estas no sufrieron ningún efecto negativo en presencia del sobrenadante y de la bacteria inoculada en ninguno de los acuarios, al finalizar las 72 horas se demuestra que las cepas bacterianas aisladas de camarones silvestres *Litopenaeus vannamei* presentan un potencial probiótico ya que hubo una sobrevivencia del 100%.

8.5. Inhibición *in vivo*.

Luego de someter a las postlarvas al probiótico y al patógeno se realizó la siembra en placas para observar el número de colonias presentes en el organismo (Tabla 1).

Tabla 1 Cantidad de *Vibrios sp* por gramo de hepatopáncreas.

Tratamientos	Cantidad de Vibrio (UFC/g)
T1	$2,5 \times 10^3$
T2	1×10^3
T3	$3,8 \times 10^3$
T4	$0,5 \times 10^3$

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las post larvas en chromo agar demuestran que en T1 y T2 hay una disminución de vibrios totales, demostrando que la mezcla de las bacterias probióticas y sus productos extracelulares producen una reducción en el número de unidades formadoras de colonia de *Vibrios sp* por gramo de hepatopáncreas.

Se realizó un análisis de ANOVA unidireccional de los tratamientos aplicados luego de concluir la prueba de desafío, determinándose que existe evidencia estadística que explica la supervivencia por el efecto protector de las bacterias probióticas y sus productos extracelulares frente a la infección con *Vibrios sp* ($p < 0,05$).

Tabla 2 Análisis ANOVA unidireccional realizado para la variable supervivencia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,966	3	,322	12,426	,000
Dentro de grupos	2,072	80	,026		
Total	3,038	83			

Para establecer diferencia estadística entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Duncan como se muestra en la tabla # 3

Tabla 3 Prueba de rango múltiple de Duncan

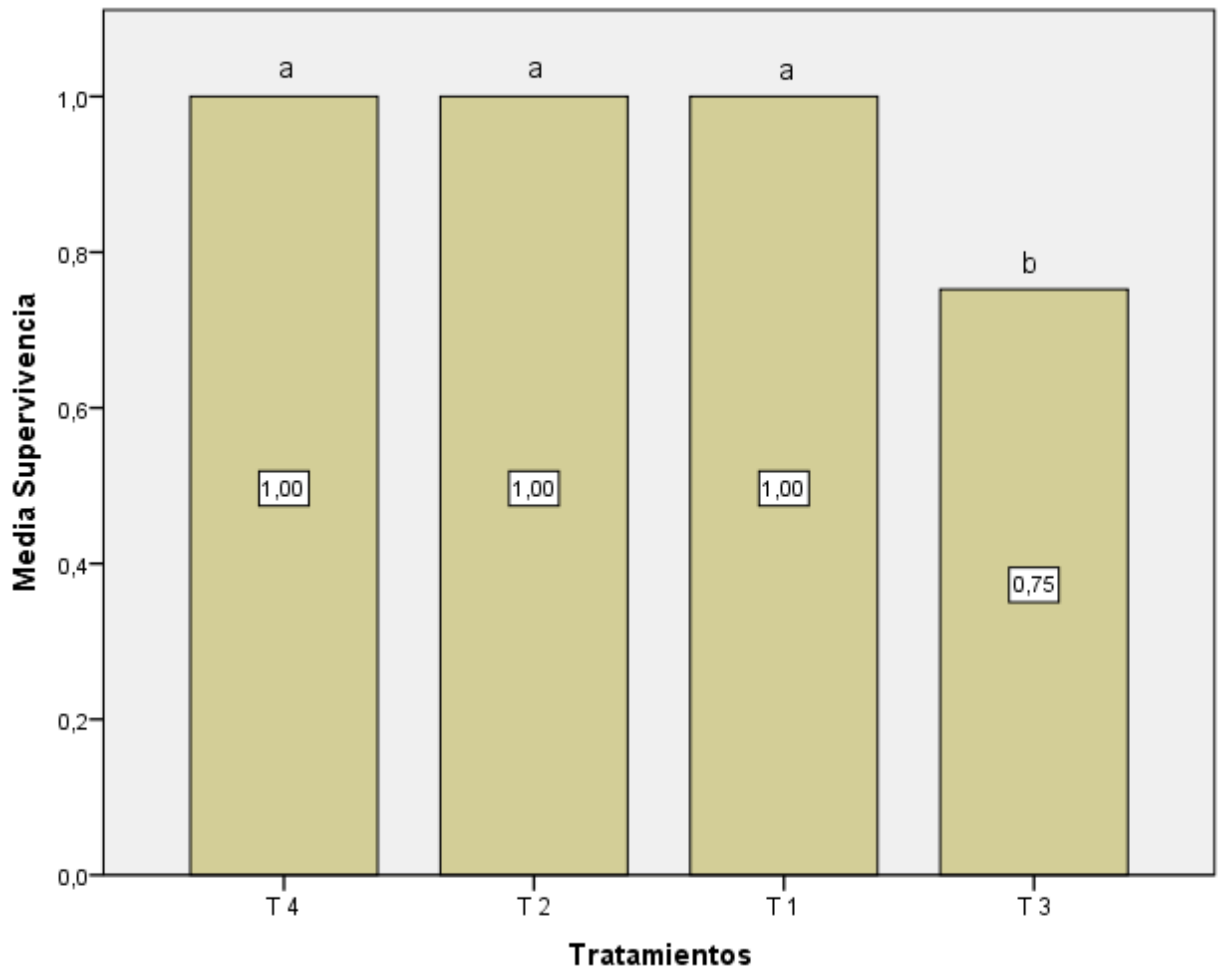
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Bacterias Patógenas	21	,752	
Bacterias Probióticas	21		1,000
Productos Extracelulares	21		1,000
Testigo Absoluto	21		1,000
Sig.		1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 21,000.

En la siguiente grafica se puede evidenciar que el T 3 alcanzo un 0,75 de supervivencia, valor menor y diferente estadisticamnete al resto de los tratamientos lo que significa que la mezcla de bacterias probioticas y sus productos extracelulares aplicadas por separado al agua de cultivo mejora la suervivencia en las postlarvas de camaron produciendo un efecto protector.

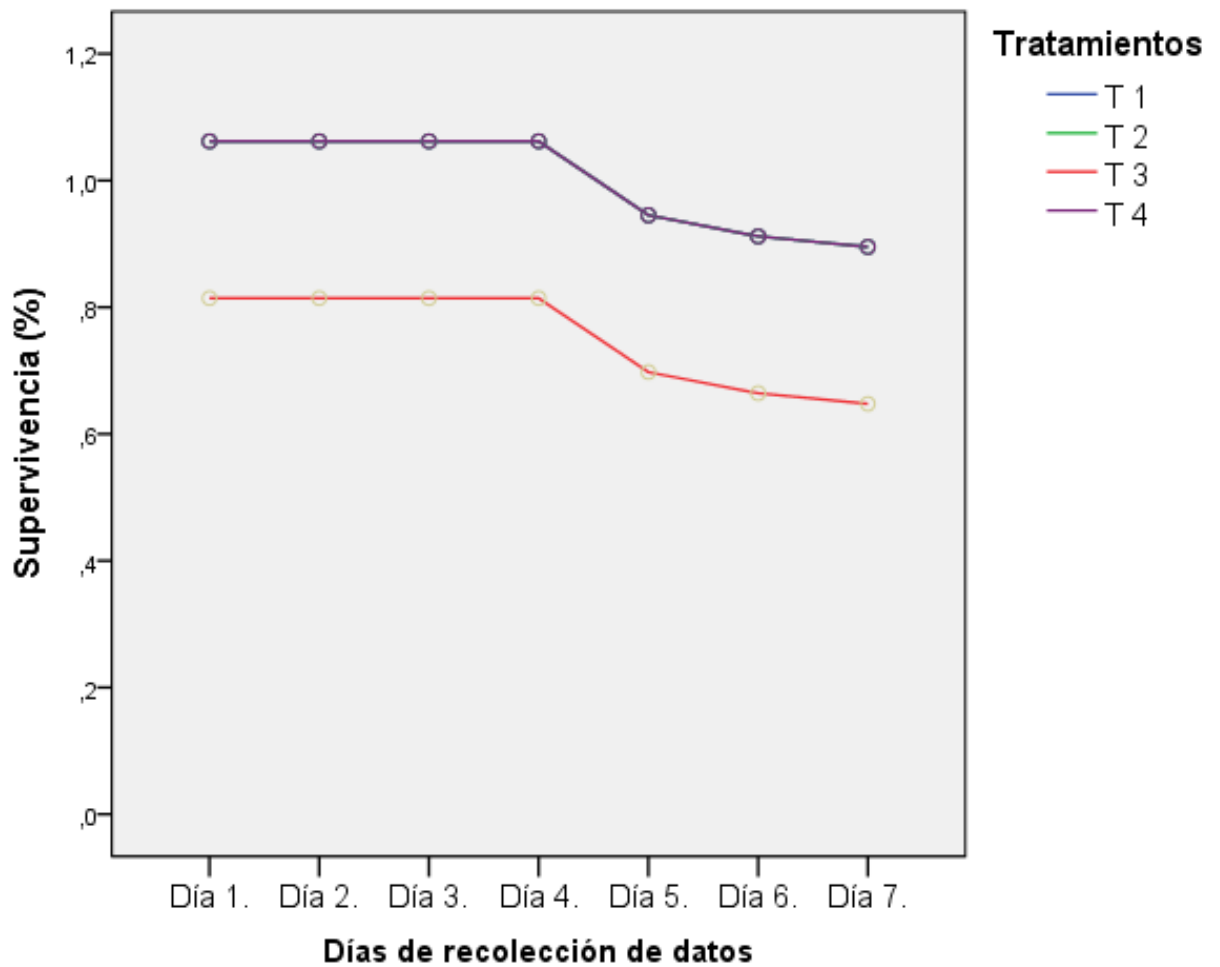
Grafico 1 Análisis de las medias de supervivencia con relación a los diferentes tratamientos utilizados



Letras diferentes difieren estadísticamente para un p-valor<0,05.

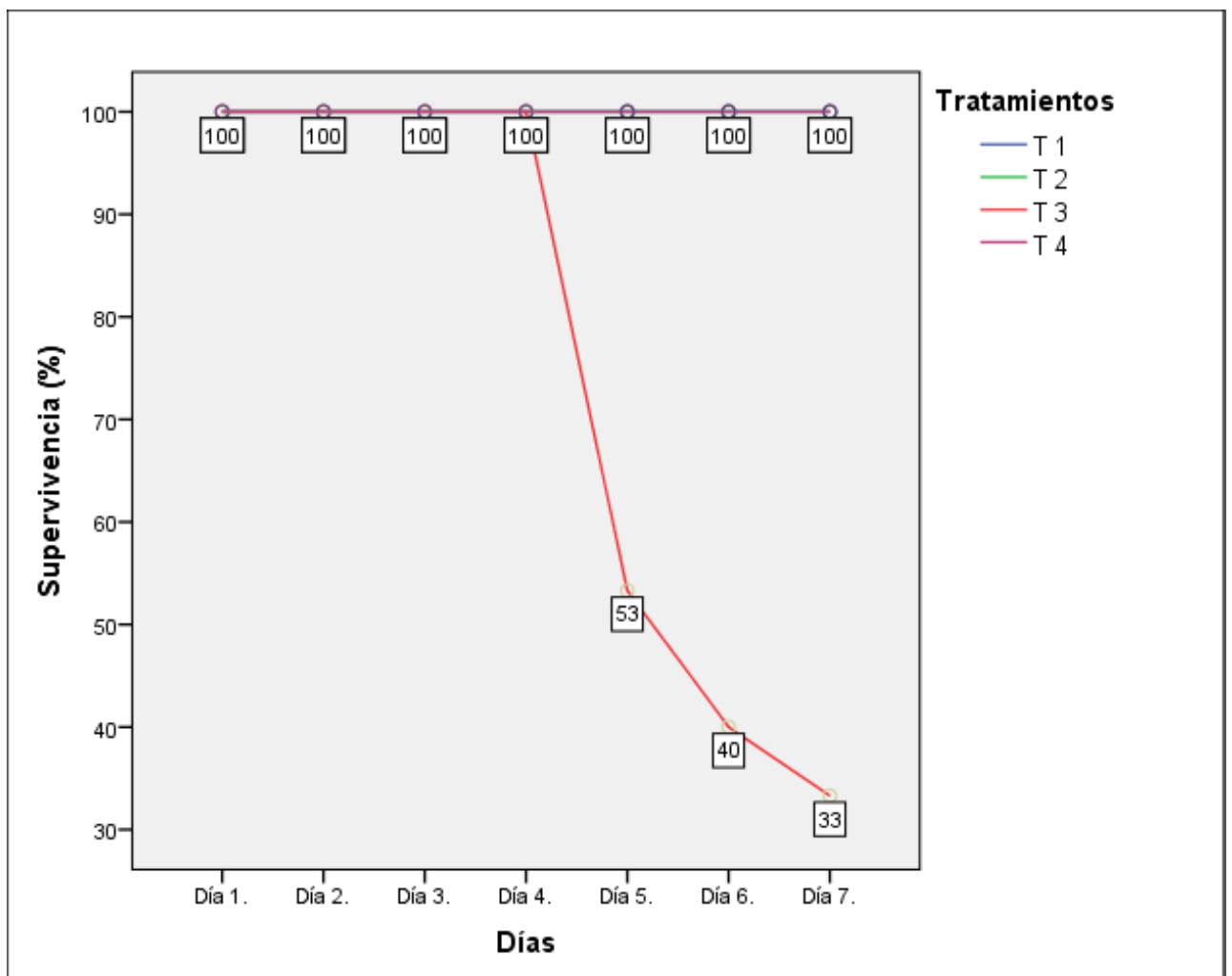
En el gráfico N° 2 se evidencia que el T 3 presenta el menor porcentaje de supervivencia durante los siete días, diferente estadísticamente a la supervivencia alcanzada en el resto de tratamientos, los cuales presentaron el mismo comportamiento. Los cuatro tratamientos objeto de estudio mantuvieron el mismo comportamiento desde el primer día hasta día siete que duró la investigación.

Grafico 2 Supervivencia en relación con cada tratamiento y los días que duro el experimento.



En la siguiente grafico se observa la respuesta de los tratamientos a la prueba de desafio con la inclusión de Vibrios (96h). En este caso, los tratamientos que contenían tanto probióticos como productos extracelulares (y el control) no presentaron mortalidad alguna luego de 72h de exposición a los vibrios. Sin embargo, el tratamiento 3 empezó a mostrar mortalidad desde las 24h post desafio (47%), incrementándose la misma a 60% y 77% a las 48h y 72h, respectivamente.

Grafico 3 Supervivencia porcentual de cada tratamiento.



9. DISCUSIÓN.

El presente trabajo de investigación se lo realizo con la finalidad de encontrar una alternativa al uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura mediante el uso de bacterias probióticas para combatir infecciones causadas por *Vibrios*, ya que estas son las principales bacterias patógenas que causan grandes mortalidades en larvicultura y en los sistemas de engorde de *Litopenaeus vannamei*.

Como resultado de la prueba de desafío luego de infectar con *Vibrios sp* se evidencio una reducción de *Vibrios* en el hepatopáncreas, resultados similares fueron reportados por Nimrat et al. (2019) luego de realizar una investigación al adicionar una mezcla de probióticos en la dieta y posterior una prueba de desafío frente a *Vibrios sp* ellos observaron una mejor supervivencia de *L vannamei* y además una reducción de colonias de *Vibrios sp* siendo significativamente menor que el control.

De la misma manera Amoah et al. (2019) evidenciaron datos parecidos referente a nuestra investigación ya que observaron una reducción significativamente menor de *Vibrios sp* en *L. vannamei* luego de la prueba de desafío y un incremento del 10,8 % en la supervivencia al adicionar bacterias probióticas al cultivo, al igual que Adel et al. (2017) en una investigación, ellos evidenciaron una reducción de *Vibrios sp* en el intestino y un incremento en la supervivencia al utilizar bacterias probióticas en el cultivo.

En otra investigación realizada por Sha et al. (2016), se demostró resultados parecidos referente a la utilización de bacterias probióticas y en este caso además los productos extracelulares de *L pentosus* ya que obtuvo una mayor supervivencia que en los demás tratamientos.

Analizando otras investigaciones y comparando los resultados con la presente investigación, queda claro que se puede evitar el uso exagerado de antibióticos usando otras alternativas como los probióticos para controlar la vibriosis.

10. CONCLUSIÓN.

- Dos cepas MaH1 y MI1 resultaron ser potencialmente probióticos y mostraron un efecto antagónico, formaron un halo de inhibición frente a *vibrios spp* (colonias verdes y amarillas).
- La supervivencia de las postlarvas fue significativamente diferente donde se aplicó la mezcla de las bacterias y de los post-bióticos en relación al testigo, posterior a la inclusión de Vibrios, los tratamientos que contenían tanto probióticos como productos extracelulares (y el control) no presentaron mortalidad alguna luego de 72h de exposición a los Vibrios, observándose un 100% de supervivencia. Sin embargo en el tratamiento 3 se observó una mortalidad del 77% a las 72h, obteniendo un 33% de supervivencia al final del tratamiento.

11. RECOMENDACIÓN.

- Continuar aislando bacterias autóctonas de organismos acuáticos y realizar todas las pruebas necesarias que certifiquen ser microorganismos probióticos.
- Identificar genéticamente a las bacterias autóctonas aisladas de organismos acuáticos.
- Fomentar la aplicación de bacterias probióticas autóctonas en los cultivos acuícolas.

12. BIBLIOGRAFÍA.

- Adel, M., El-Sayed, A. F. M., Yeganeh, S., Dadar, M., & Giri, S. S. (2017). Effect of Potential Probiotic *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* on Growth Performance, Intestinal Microbiota, Digestive Enzyme Activities, and Disease Resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 150–156. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9235-9>
- Amoah, K., Huang, Q. C., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y., Yang, Q. H., ... Dong, X. H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87(February), 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- Ananda Raja, R., Sridhar, R., Balachandran, C., Palanisammi, A., Ramesh, S., & Nagarajan, K. (2017). Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 368–381. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.020>
- Boyaci, H., Shah, T., Hurley, A., Kokona, B., Li, Z., Ventocilla, C., ... Hughson, F. M. (2016). Structure, Regulation, and Inhibition of the Quorum-Sensing Signal Integrator LuxO. *PLoS Biology*, 14(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002464>
- Cai, Y., Yuan, W., Wang, S., Guo, W., Li, A., Wu, Y., ... Zhou, Y. (2018). *PT State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea , Hainan*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.024>
- Chai, P. C., Song, X. L., Chen, G. F., Xu, H., & Huang, J. (2016). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.011>
- Cuéllar, A. J. (2013). *Vibriosis Vibriosis*. 1–5. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Cuéllar Jorge Anjel, Lightner Donald, Morales Covarrubias María Soledad, Almanza

- María José, Barracco Margherita Anna, Mendes Emiko Shinozaki, Pantoja Carlos, Perazzolo Luciane Maria. Coze Agnes Saborio, G. T. C. (2008). *GUÍA TÉCNICA - PATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE CAMARONES PENAEIDOS*. Panamá, Rep. de Panamá.
- Dash, P., Avunje, S., Tandel, R. S., & Sandeep, K. P. (2017). *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture : A Review of Current Approaches and Future Perspectives Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture : A Review of Current*. 8249. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1277973>
- Díaz, L. V., & Martínez-Silva, M. A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38(2), 165–187. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2009.38.2.177>
- Du, Y., Zhou, S., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Fang, H., & Wang, L. (2019). Understanding the roles of surface proteins in regulation of *Lactobacillus pentosus* HC-2 to immune response and bacterial diversity in midgut of *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 1194–1206. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.073>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Junprung, W., Supungul, P., & Tassanakajon, A. (2017). HSP70 and HSP90 are involved in shrimp *Penaeus vannamei* tolerance to AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* after non-lethal heat shock. *Fish and Shellfish Immunology*, 60, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.049>
- Khimmakthong, U., & Sukkarun, P. (2017). The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microbial Pathogenesis*, 113, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.028>
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D. K., & Kumar, U. (2016). Reviews in Fisheries Science & Aquaculture Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance , Mechanisms of Action , and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 342–368.

<https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1193841>

- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I. T., Chuang, J. C., ... Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Laranja, J. L. Q., Amar, E. C., Ludevese-Pascual, G. L., Niu, Y., Geaga, M. J., De Schryver, P., & Bossier, P. (2017). A probiotic Bacillus strain containing amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) stimulates the innate immune response of Penaeus monodon postlarvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 68, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.023>
- Laranja, J. L. Q., Ludevese-Pascual, G. L., Amar, E. C., Sorgeloos, P., Bossier, P., & De Schryver, P. (2014). Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulating Bacillus spp. improve the survival, growth and robustness of Penaeus monodon (Fabricius, 1798) postlarvae. *Veterinary Microbiology*, 173(3–4), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.011>
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(1), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>
- Melgar Valdes, C. E., Macías, E. B., Álvarez-González, C. A., Hernández, C. T., & Sánchez, A. J. (2013). Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón litopenaeus vannamei (decapoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1215–1228. <https://doi.org/10.15517/rbt.v61i3.11936>
- Morales M, Ruiz A, Pereira M, S. V. et al. (2011). PREVALENCIA DE ENFERMEDADES DE CAMARÓN BLANCO (Litopenaeus vannamei) CULTIVADO EN OCHO REGIONES Prevalence of Diseases in Cultured Litopenaeus vannamei. *Redalyc*, 11, 434–446. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95919362010%0D>
- Morales, V., & Cuéllar, J. (2014). *Guía técnica -Patología e inmunología de camarones penaeidos*.

- Nimrat, S., Khaopong, W., Sangsong, J., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2019). Dietary administration of Bacillus and yeast probiotics improves the growth, survival, and microbial community of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture*, 4438, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10454438.2019.1655517>
- Nimrat, Subuntith, Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3–4), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>
- Sha, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., & Wang, L. (2016). Interaction between *Lactobacillus pentosus* HC-2 and *Vibrio parahaemolyticus* E1 in *Litopenaeus vannamei* in vivo and in vitro. *Aquaculture*, 465, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.007>
- Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., & Wang, B. (2016). Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 452, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.014>
- Suárez, Medina, S. et al. (2015). DISTRIBUCION DE *Vibrio* spp. EN AGUA Y SEDIMENTO DE ESTANQUES PRODUCTORES DE CAMARON *Litopenaeus vannamei*. *Redalyc*, 14, 293–299. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95941173003%0D>
- Tepaamorndech, S., Chantarasakha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M., ... Visessanguan, W. (2019). Effects of *Bacillus aryabhata* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.010>
- Varela A, P. N. (2016). Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones peneidos. *Redalyc*, 27, 73–80. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43743010007%0D>
- Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M. A., Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T., & Martínez-Córdova, L. R. (2017). Bacterial biota

of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. *Helgoland Marine Research*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s10152-017-0485-z>

Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>

Wang, Y. C., Hu, S. Y., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish and Shellfish Immunology*, 84(September 2018), 1050–1058. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.017>

Zheng, C. N., & Wang, W. (2017). Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, 48(6), 2767–2777. <https://doi.org/10.1111/are.13110>

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. *Veterinary Quarterly*, 36(4), 228–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

Anexos



Figura 1 Litopenaeus vannamei silvestre capturados en el mar frente a jámbeli.



Figura 2 Peso de los camarones L vannamei.



Figura 3 Siembra de hepatopáncreas e intestino de camarones silvestres en placas Petri con agar MRS y agar Marino.

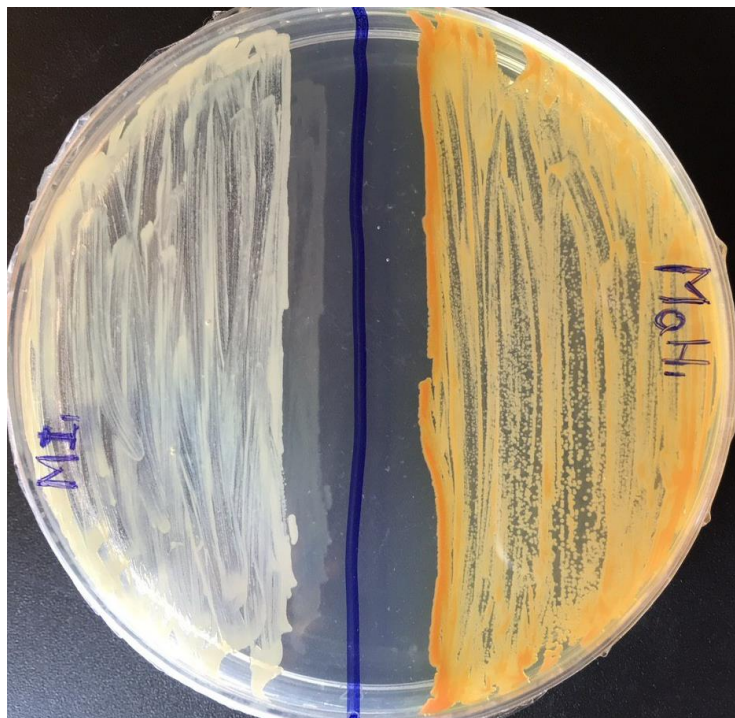


Figura 4 Cepas que presentaron un halo de inhibición frente a Vibrios sp.

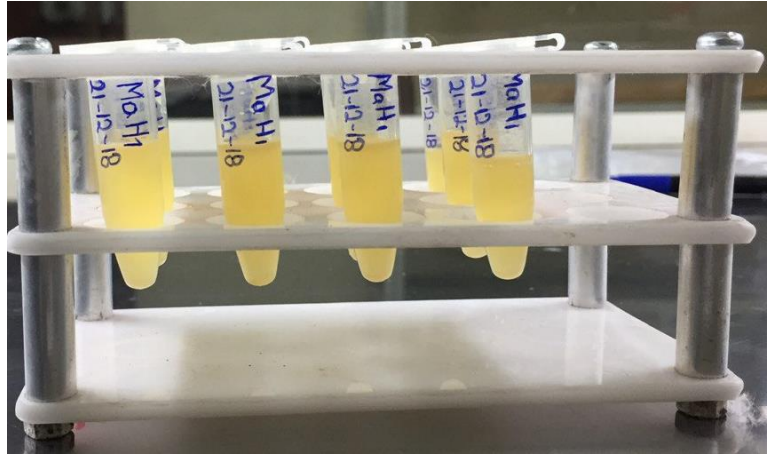


Figura 5 Bacterias depositadas en tubos eppendorf para posterior congelarlas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

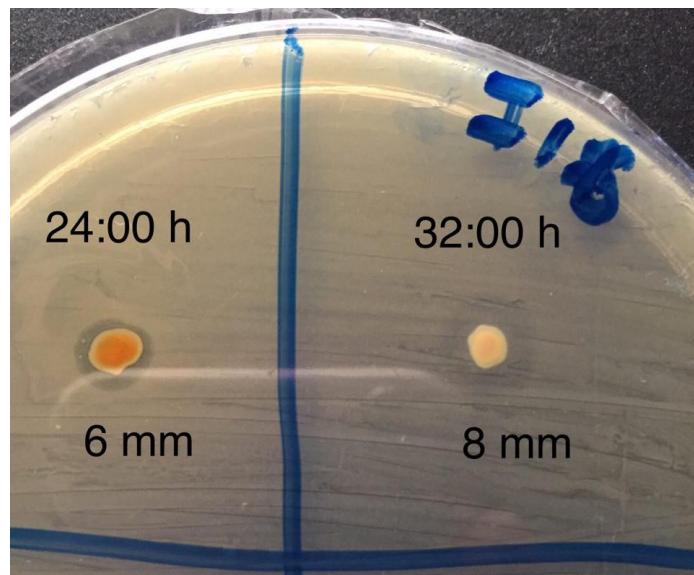


Figura 6 Tamaño del halo de inhibición de bacterias probióticas frente a colonias verdes a las 24 y 32 h respectivamente.

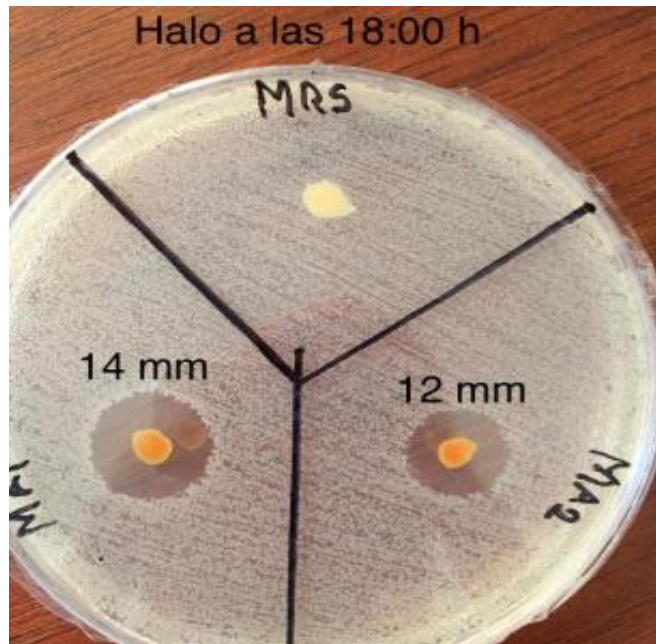


Figura 7 Tamaño del halo de inhibición de bacterias probióticas frente a colonias amarillas a las 18 h. con bacterias de 20 y 48 h de crecimiento.

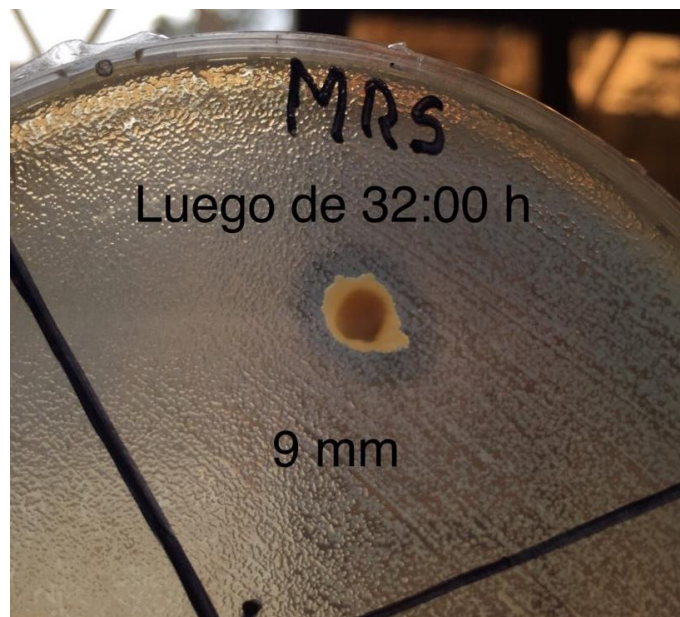


Figura 8 Tamaño del halo de inhibición de bacterias probióticas frente a colonias amarillas.



Figura 9 Medición del halo formado por las bacterias probióticas.

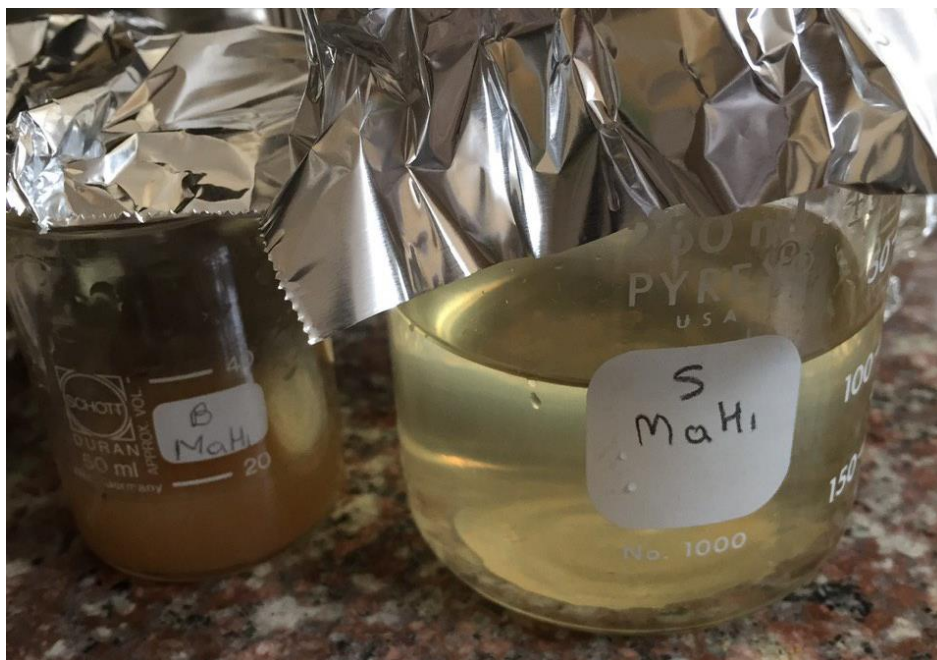


Figura 10 Separación de bacteria y producto extracelular luego de centrifugar.



Figura 11 Mortalidad observada en el T3 (1×10^6 Vibrios sp).

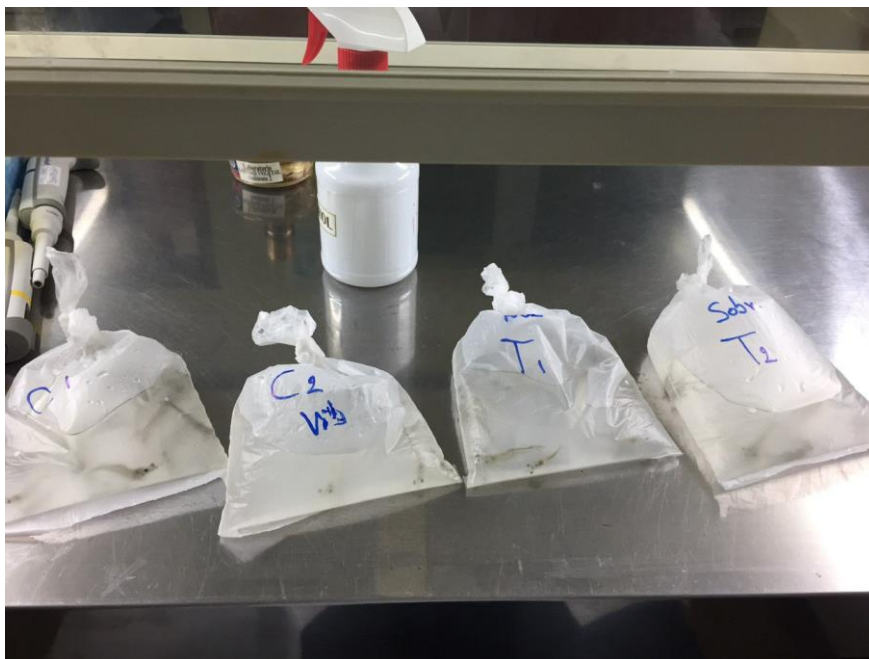


Figura 12 Post larvas de cada tratamiento antes de extraer el hepatopáncreas.



Figura 13 Extracción del hepatopáncreas con equipo de disección.



Figura 14 Peso de hepatopáncreas de larvas para macerar y sembrar en CHROMagar.