



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

Efecto de los ácidos orgánicos en la carga bacteriana de *Vibrios* spp. en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

**ESCOBAR BENAVIDES CESAR EFREN
INGENIERO ACUICOLA**

**SILVA JACOME ANGIE MILENA
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**Efecto de los ácidos orgánicos en la carga bacteriana de *Vibrios* spp.
en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).**

**ESCOBAR BENAVIDES CESAR EFREN
INGENIERO ACUICOLA**

**SILVA JACOME ANGIE MILENA
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Efecto de los ácidos orgánicos en la carga bacteriana de *Vibrios* spp. en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

**ESCOBAR BENAVIDES CESAR EFREN
INGENIERO ACUICOLA**

**SILVA JACOME ANGIE MILENA
INGENIERA ACUICOLA**

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

**MACHALA
2023**

ÁCIDOS ORGÁNICOS

por ANGIE MILENA SILVA JÁCOME

Fecha de entrega: 07-oct-2023 12:01a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2179964408

Nombre del archivo: Tesis.docx (1.17M)

Total de palabras: 11802

Total de caracteres: 64664

ÁCIDOS ORGÁNICOS

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1 www.aquahoy.com <1 %
Fuente de Internet

2 Submitted to Universidad de Las Palmas de Gran Canaria <1 %
Trabajo del estudiante

3 pesquisa.bvsalud.org <1 %
Fuente de Internet

4 www.slideshare.net <1 %
Fuente de Internet

5 issuu.com <1 %
Fuente de Internet

6 L. Alandes, A. Quiles, I. Pérez-Munuera, I. Hernando. "Manzana fresca cortada tratada con aditivos naturales: calidad y aspectos estructurales Fresh-cut apple treated with natural additives: quality and structural aspects", CyTA - Journal of Food, 2011 <1 %
Publicación

7 repositorio.ug.edu.ec
Fuente de Internet

<1 %

8

www.scilit.net

Fuente de Internet

<1 %

9

dspace.ucacue.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

10

patentimages.storage.googleapis.com

Fuente de Internet

<1 %

11

www.coursehero.com

Fuente de Internet

<1 %

12

moam.info

Fuente de Internet

<1 %

13

repositorio.unap.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

14

repositorio.usil.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

15

repositorio.utn.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

16

revistas.utadeo.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

17

[Submitted to Universidad de Salamanca](#)

Trabajo del estudiante

<1 %

18

accedacris.ulpgc.es

Fuente de Internet

<1 %

19	doczz.net Fuente de Internet	<1 %
20	www.etsia.upm.es Fuente de Internet	<1 %
21	"Invasive Alien Species", Wiley, 2021 Publicación	<1 %
22	riul.unanleon.edu.ni:8080 Fuente de Internet	<1 %
23	gloriyackelin.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
24	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
25	KW Hasson, Y Fan, T Reisinger, J Venuti, PW Varner. "White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp", Diseases of Aquatic Organisms, 2006 Publicación	<1 %
26	repositorio.uide.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
27	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
28	Lina Angelica Zermeño-Cervantes, Aarón Barraza, Herson Antonio González-Ponce,	<1 %

Sergio Francisco Martinez-Diaz et al.
"Penaeus vannamei challenged with a Vibrio
parahaemolyticus AHPND strain shows
hepatopancreatic microbiota imbalance",
Ciencias Marinas, 2023

Publicación

29

www.ecuaventura.com

Fuente de Internet

<1 %

30

www.jove.com

Fuente de Internet

<1 %

31

Héctor Suarez M, Álvaro Jiménez T, Consuelo
Díaz M. "Determination of microbiological and
sensory parameters of fish fillets with
propolis preserved under refrigeration",
Revista MVZ Córdoba, 2014

Publicación

<1 %

32

americanae.aecid.es

Fuente de Internet

<1 %

33

apps1.semarnat.gob.mx:8443

Fuente de Internet

<1 %

34

core.ac.uk

Fuente de Internet

<1 %

35

eprints.umm.ac.id

Fuente de Internet

<1 %

36

munayi.uileam.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

37	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
38	repositorio.uc.cl Fuente de Internet	<1 %
39	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1 %
40	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
41	saviabiotech.es Fuente de Internet	<1 %
42	Ana R Álvarez-Sánchez, Héctor Nolasco-Soria, Humberto Mejía-Ruíz. "Digestibilidad in vitro del dsRNA específico por enzimas del tracto digestivo del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> ", Revista MVZ Córdoba, 2017 Publicación	<1 %
43	cienciaspecuarias.inifap.gob.mx Fuente de Internet	<1 %
44	Laura Settier Ramírez. "Envases activos portadores de microorganismos para la bioconservación de alimentos", Universitat Politecnica de Valencia, 2021 Publicación	<1 %

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

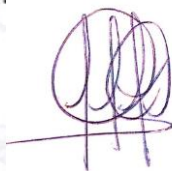
Los que suscriben, ESCOBAR BENAVIDES CESAR EFREN y SILVA JACOME ANGIE MILENA, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Efecto de los ácidos orgánicos en la carga bacteriana de Vibrios spp. en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), otorgan a la Universidad Técnica de Machala, 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 tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran 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.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen 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.



ESCOBAR BENAVIDES CESAR EFREN

0750218349



SILVA JACOME ANGIE MILENA

0707339164

AGRADECIMIENTO

Quiero comenzar expresando mi profundo agradecimiento a mi madre, Rosa, quien ha sido el principal pilar en mi vida y en la realización de este proyecto de tesis.

Desde el primer día de mi vida siempre ha estado a mi lado, brindándome su apoyo emocional y su amor incondicional. Durante todos los momentos más desafiantes en esta travesía académica, sus esfuerzos, sus sabios consejos, su aliento y su fe en mí han sido mi fortaleza. Cada día, su fuerza, perseverancia y dedicación me han inspirado para poder seguir adelante y superar cada percance que se presenta en el camino.

No puedo expresar en su totalidad cuánto valoro su apoyo y voluntad inquebrantable. Su paciencia y la capacidad para comprender mis altibajos, han sido una luz y comprensión en los momentos de estrés y ansiedad. Este logro no es solo mío, sino también de mi madre, cuyo amor desmensurable ha sido la base para poder construir mi camino hacia un éxito académico.

Gracias mamá, por ser mi roca, por mover montañas por mí, por ser mi amuleto en mis momentos flojos, por ser mi inspiración y mi mayor defensora. Este logro en mi vida es tanto tuyo como mío, y es algo que voy a llevar en mi vida siempre con el amor y sabiduría que me has brindado y enseñado.

César Efrén Escobar Benavides

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a quienes hicieron posible la realización de este proyecto investigativo, especialmente a mis padres por haberme brindado todo su apoyo en esta etapa crucial de mi vida profesional.

Agradezco a mis amigos quienes no dudaron en hacer notar su apoyo en cada momento que necesite de su ayuda. Así mismo, agradecer a los docentes de la institución por los conocimientos y consejos impartidos a lo largo de la carrera.

Finalmente quiero agradecer sinceramente a mi tutora la Dra. Lita Sorroza, al Dr. Roberto Santacruz, y al Econ. Víctor Garzón por las enseñanzas y conocimientos brindados para el correcto desarrollo de la investigación, por su confianza, paciencia y dedicación.

Angie Milena Silva Jácome

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre, quien es la persona que me ha ayudado día a día a poder salir adelante y prepararme en todos mis estudios, lo cual ha permitido que termine de cumplir con una meta más en mi vida.

César Efrén Escobar Benavides

Dedico esta tesis principalmente a mis padres, Juan Carlos y Patricia, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento, quienes gracias a su esfuerzo y motivación me han permitido lograr cumplir una meta más en mi vida.

Angie Milena Silva Jácome

RESUMEN

Los avances tecnológicos que hoy en día presentan la industria acuícola son un gran punto a favor, puesto que, mediante dichos avances se ha podido evidenciar una gran mejora en este sector. Pero al intensificar la producción la capacidad de carga del estanque aumenta, lo que trae consigo también un mayor riesgo de alteraciones ambientales en el entorno acuático. En el peor de los casos puede llegar a generar la presencia de microorganismos patógenos, los cuales pueden llegar a propagarse en los cultivos, ocasionando que los animales enfermen o lleguen a morir. Una de las estrategias empleadas comúnmente son los antibióticos, no obstante, su manejo inadecuado ha provocado que dichos microorganismos patógenos lleguen a desarrollar resistencia a los mismos. El presente trabajo fue realizado con la finalidad de evaluar las propiedades antimicrobianas de mezclas de ácidos orgánicos comerciales sobre las colonias bacterianas Gram-negativas presentes en el hepatopáncreas del camarón blanco.

Para el desarrollo de este ensayo se probaron 3 tratamientos con ácidos orgánicos comerciales (T1:AO1, T2:AO2, T3:AO3) y 1 tratamiento control sin aditivos, contando con tres replicas para cada uno de ellos. Se emplearon 60 ejemplares de *Litopenaeus vannamei*, los cuales fueron alimentados con dos raciones diarias en relación a su peso corporal, y distribuidos de manera homogénea en cada uno de los recipientes con un volumen de 25 L y aireación constante. Para mantener la calidad del agua en cada una de las unidades experimentales se realizó recambios de agua y se adicioneo bacterias para el control de metabolitos tóxicos. Al finalizar el ensayo se efectuaron los análisis microbiológicos para determinar el número de bacterias Gram-negativas (UFC/ml) en los ejemplares.

Los resultados obtenidos se ejecutaron estadísticamente con ANOVA de un factor, determinándose que existen diferencias significativas entre los tratamientos (T1, T2, T3) y el control ($p < 0,05$) siendo el T2 el más efectivo para aminorar la carga bacteriana en el camarón. Por otra parte, los resultados del análisis *in vitro* mediante el antibiograma demostraron diferente sensibilidad en cuanto al halo de inhibición, siendo el T1 (10 mm) el T3 (12 mm) y no se logró visualizar la presencia de halos de inhibición en el T2. Por último, se determinó la predominancia de vibrios específicos, siendo desplazados del organismo los *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* al usar T1 y T2 en comparación con el tratamiento control.

En conclusión, se evidencia que el uso de mezclas de ácidos orgánicos comerciales inhibe el crecimiento de bacterias Gram-negativas, incrementando la tasa de supervivencia en el camarón, y convirtiéndose en una alternativa para reducir el uso de antibióticos en los cultivos acuícolas.

Palabras claves: ácidos orgánicos, carga bacteriana, antibiograma, antimicrobiana, camarón.

ABSTRACT

The technological advancements that the aquaculture industry presents today are a significant advantage, as these advances have led to a substantial improvement in this sector. However, as production intensifies, the carrying capacity of the pond increases, which also brings a greater risk of environmental disturbances in the aquatic environment. In the worst-case scenario, it can lead to the presence of pathogenic microorganisms, which can propagate in the crops, causing animals to become sick or die. One of the commonly employed strategies is antibiotics; however, their improper management has caused these pathogenic microorganisms to develop resistance to them. This study was conducted to evaluate the antimicrobial properties of commercial organic acid blends on Gram-negative bacterial colonies present in the hepatopancreas of white shrimp.

For the development of this assay, three treatments with commercial organic acids (T1: AO1, T2: AO2, T3: AO3) and one control treatment without additives were tested, with three replicates for each. Sixty *Litopenaeus vannamei* specimens were used, which were fed twice daily according to their body weight, and evenly distributed in each of the containers with a constant aeration system. To maintain water quality in each of the experimental units, water changes were performed, and bacteria were added to control toxic metabolites. At the end of the assay, microbiological analyses were conducted to determine the number of Gram-negative bacteria (UFC/ml) in the specimens.

The results obtained were statistically analyzed with one-way ANOVA, determining that there are significant differences between the treatments (T1, T2, T3) and the control ($p < 0.05$), with T2 being the most effective in reducing bacterial load in the shrimp. Furthermore, the results of the *in vitro* analysis using the antibiogram showed varying sensitivity in terms of the inhibition zone, with T1 (10 mm) and T3 (12 mm), while no inhibition zones were observed in T2. Finally, the predominance of specific vibrios was determined, with *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* being displaced from the organism when using T1 and T2 compared to the control treatment.

In conclusion, the use of commercial organic acid blends inhibits the growth of Gram-negative bacteria, increases the survival rate in shrimp, and becomes an alternative to reduce the use of antibiotics in aquaculture.

Key words: organic acids, bacterial load, antibiogram, antimicrobial, shrimp

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN	III
ABSTRACT.....	V
CAPÍTULO I	12
1.1 INTRODUCCIÓN	12
1.2 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	14
1.3 JUSTIFICACIÓN	15
1.4 OBJETIVO.....	16
1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1.4.2 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	16
CAPÍTULO II.....	17
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 Acuicultura en Ecuador.....	17
2.2 Generalidades del camarón blanco (Litopenaeus Vannamei)	17
2.3 Taxonomía.....	19
2.4 Tracto digestivo del camarón	19
2.4.1 Factores que afectan a la microbiota intestinal del camarón	20
2.5 Sistema inmune del camarón	21
2.6 Agentes patógenos de interés en el cultivo de camarón.....	22
2.7 Género Vibrio.....	23
2.7.1 Vibriosis.....	25
2.8 Terapéuticos	26
2.8.1 Uso de antibióticos en acuicultura	26
2.8.2 Uso de probióticos en acuicultura.....	27
2.8.3 Uso de ácidos orgánicos en la acuicultura	28

2.9	Ácidos orgánicos	29
2.9.1	Ácido cítrico	30
2.9.2	Ácido ascórbico	30
2.9.3	Ácido Acético	31
2.9.4	Ácido fumárico	31
2.9.5	Ácido propiónico	31
2.9.6	Ácidos orgánicos como aditivos nutricionales en los alimentos	32
2.9.7	Inhibición de bacterias patógenas	33
CAPÍTULO III.....		37
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1	Área de estudio.....	37
3.2	Materiales y equipos	37
3.3	Metodología	38
3.3.1	Obtención de los ejemplares	39
3.3.2	Proceso de aclimatación de los juveniles.....	39
3.3.3	Preparación de unidades experimentales	39
3.3.4	Manejo de unidades experimentales	39
3.3.5	Preparación del alimento	40
3.3.6	Alimentación.....	40
3.3.7	Análisis microbiológico.....	40
3.3.8	Diseño experimental	41
4.	RESULTADOS	43
4.1	Análisis microbiológico <i>in vivo</i>	43
4.2	Apariencia de las colonias.....	45
4.3	Análisis microbiológico <i>in vitro</i>	45
4.4	Supervivencia.....	46
5.	DISCUSIÓN.....	47

6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
7	BIBLIOGRAFÍA	52
8.	ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
Tabla 2. Ácidos orgánicos y sus efectos en la nutrición animal	33
Tabla 3. Comparación del efecto de los ácidos orgánicos sobre la carga bacteriana de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>).....	43
Tabla 4. Análisis de varianza inter-grupos sobre la carga bacteriana del camarón blanco en relación a la adición de ácidos orgánicos en el balanceado.....	44
Tabla 5. Lectura de halos de inhibición que formaron los ácidos orgánicos	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura morfológica del <i>Litopenaeus vannamei</i> . (A) cefalotórax, (B) abdomen, (C) telson.	18
Figura 2. Biología del camarón	18
Figura 3. Ubicación de la investigación.	37
Figura 4. Diseño experimental del ensayo.....	42
Figura 5. Efecto de los ácidos orgánicos sobre la carga bacteriana en el camarón blanco.	44
Figura 6. Presencia de vibrios específicos presentes en el hepatopáncreas del camarón blanco al emplear ácidos orgánicos en la dieta.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección de agua de camarónera para el abastecimiento de las unidades experimentales.	58
Anexo 2. Obtención de ejemplares de la camarónera "COODAESVIR".	58
Anexo 3. Peso de los ejemplares.	58
Anexo 4. Aclimatación de los ejemplares.	58
Anexo 5. Medición de amonio.	58
Anexo 6. Alimento preparado con ácidos orgánicos comerciales.	58
Anexo 7. Preparación de los medios de cultivo para el análisis microbiológico (agar TCBS y CHROMagar).	59
Anexo 8. Extracción de hepatopáncreas.	59
Anexo 9. Peso de las muestras de hepatopáncreas extraídas (1g).	59
Anexo 10. Crecimientos de colonias bacterianas de Vibrios en agar TCBS.	59
Anexo 11. Diluciones seriadas.	59
Anexo 12. Halos de inhibición indicando que no se produce crecimiento bacteriano alrededor de los discos con AO.	60
Anexo 13. Crecimiento de Vibrios específicos (<i>V. vulnificus</i> y <i>V. alginolyticus</i>).	60

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón en Ecuador representa cerca del 95% de la producción acuícola del país. La camaronicultura en el país es una de las fuentes con mayor ingreso económico; en el año 2021 se obtuvo un ingreso anual de 500 millones de dólares. Sin embargo, el sector acuícola se ha visto afectado en los últimos años a causa de la aparición de enfermedades, las cuales son ocasionadas por virus o bacterias. Los brotes virales que cabe mencionar son: el Síndrome de Taura (TSV), Virus de la Mancha Blanca (WSSV), por otra parte, enfermedades de origen bacteriano como la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* (Chávez & Llanos, 2015).

Uno de los grandes retos que afronta la acuicultura son los precios y costos de alimentación, los cuales tienen una representación del 60% de su costo final, proveniente de las proteínas que se adquieren de la harina de pescado. Por ende, es de suma importancia buscar estrategias que nos permitan mitigar este problema y a su vez una disminución de los costos de producción, lo cual nos dará como resultado una mayor rentabilidad en nuestros sistemas y una disminución considerable de impactos ecológicos, así como también la degradación de estos alimentos en el fondo, donde se pueden llegar a generar diferentes enfermedades (Reyes, 2014).

Los factores que influyen para que una producción sea baja son muchos, varios de ellos se pueden llegar a prevenir siempre y cuando se lleve un control adecuado del estanque. Sin embargo, las diferentes enfermedades que se presentan en un cultivo han sido propicie para el desarrollo de diversas estrategias que han ayudado a contrarrestar su impacto (González, 2014). En el cultivo de camarón, la vibriosis es una de las enfermedades bacterianas que es capaz de afectar a una amplia gama de camarones peneidos, la cual es causada por diferentes especies de *Vibrio*, generando cuantiosas pérdidas económicas en el sector acuícola. Se estima que el 60% de las pérdidas en el cultivo de camarón son a causa del virus del síndrome de la mancha blanca, mientras que un 20% se genera por las infecciones bacterianas predominando el género *Vibrio spp.* Para la industria del camarón, la vibriosis es considerada como una amenaza constante (Abdel-Latif et al., 2022).

Dentro de estas estrategias se encuentran la implementación de raceway; mejoramiento genético; biorremediación de suelos y agua; corrección mediante balances iónicos; aditivos para el balanceado como: probióticos, ácidos orgánicos (González, 2014). Los ácidos orgánicos son una de las alternativas más usadas, esto no se debe a que estos solo nos ayuden a poder controlar las enfermedades y lograr conseguir mejores supervivencias, sino también porque son uno de los principales causantes del mejoramiento de la conversión alimenticia en el estanque (Anangón, 2014).

Siendo así, los ácidos orgánicos uno de los reductores de cargas bacterianas con mayor eficacia, por lo cual, en este proyecto, se plantea usar ácidos orgánicos para comprobar su efecto antimicrobiano ante las cargas de *Vibrios spp* en el camarón blanco (*Litopennaeus vannamei*).

1.2 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

Durante los últimos años la actividad acuícola ha ido potencialmente en aumento, pero así mismo el manejo de los factores medioambientales respecto a la calidad del agua ha ido en deterioro, consecuentemente la generación de enfermedades y de nuevas patologías perjudican a la sostenibilidad del sistema productivo.

La proliferación de las enfermedades de origen infeccioso son las más reincidentes en el sector acuícola, afectando negativamente sobre los costos de inversión de la producción. Estas infecciones son causadas por diferentes microorganismos patógenos, siendo las infecciones bacterianas las más frecuentes, impidiendo el desarrollo óptimo del animal.

Generalmente, las bacterias del género *Vibrio* se encuentran de forma natural en los medios acuáticos marinos y en el tracto digestivo del camarón, por lo tanto, cuando estos se convierten en patógenos oportunistas, el hepatopáncreas es el principal órgano afectado. Una de las enfermedades bacterianas que provoca altos índices de mortalidad en el camarón es la vibriosis, afectando tanto la etapa larvaria como la de engorde.

Además, debido al incremento de la demanda por especies acuáticas, la acuicultura intensiva se ha convertido en una de las opciones para abastecer el suministro de mariscos alrededor del mundo, sin embargo, su intensificación se encuentra estrechamente relacionada con el estrés de los organismos en cultivo, dando pauta a la aparición de enfermedades. Mucho de los productores recurren al uso de los antibióticos en las granjas acuícolas, pero su uso indiscriminado ha provocado la resistencia bacteriana a los mismos (Sardar, et al, 2020).

1.3 JUSTIFICACIÓN

El uso continuo de los antibióticos en la acuicultura genera una destrucción de las comunidades bacterianas en el medio de cultivo lo que resulta en un deterioro del sistema inmune de los animales. Por tal razón, se ha hecho necesaria la búsqueda de diferentes estrategias para reforzar el sistema inmune e incrementar el crecimiento de las especies acuícolas, además de hacer hincapié a una acuicultura sustentable. Una de las mejores alternativas que contribuye al crecimiento y bienestar de los animales es la inclusión de nutracéuticos o aditivos en los alimentos, los cuales son componentes derivados de alimentos como minerales, vitaminas, probióticos, prebióticos, fitobióticos, ácidos orgánicos, etc. Se ha comprobado que los ácidos orgánicos promueven el crecimiento, destacándose principalmente en el control de patógenos intestinales y supervivencia de los animales (Sardar et al, 2020).

Los ácidos orgánicos son aditivos funcionales en los piensos acuícolas, se ha podido demostrar que estos actúan: a) minimizando el pH del alimento, por ende, puede aumentar la higiene del mismo; b) al modular la actividad enzimática y el pH intestinal, beneficia a una mejor digestión de los nutrientes y la utilización del pienso; c) modula la microbiota intestinal de los peneidos, siendo así una ventaja, permitiendo un mejor control de la colonización entérica generada por bacterias oportunistas; d) intensifica y mejora la salud animal (Busti et al., 2020).

Con lo mencionado anteriormente, una alternativa para contrarrestar las patologías causadas por bacterias y a su vez aminorar el empleo de antibióticos en los cultivos acuícolas, es la aplicación de ácidos orgánicos debido a su acción antimicrobiana, mejorando no solo la respuesta inmune en el animal, sino también aportando mayor digestibilidad a los alimentos, y por ende mejor asimilación de los nutrientes.

1.4 OBJETIVO

Determinar el efecto de los ácidos orgánicos en las cargas bacterianas de *Vibrios spp.* en el camarón blanco mediante su aplicación en el alimento balanceado.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar *in vitro* el efecto antimicrobiano de ácidos orgánicos comerciales.
- Determinar el efecto antibacteriano in vivo de ácidos orgánicos ante la presencia de *Vibrios spp.*
- Determinar el mejor ácido orgánico para minimizar la carga bacteriana de *Vibrios spp.* en el camarón blanco.

1.4.2 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Sí los ácidos orgánicos poseen una acción antimicrobiana, se espera que su efecto disminuya las excesivas cargas bacterianas producidas por *Vibrios spp.* en el camarón blanco.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Acuicultura en Ecuador

Ecuador es uno de los países con mayor exportación de bienes agropecuarios del mundo, lo cual ha tenido un reconocimiento internacional debido a la calidad de sus productos. Dentro de estos bienes se encuentra el sector camaronero, que con el pasar de los años ha tenido una evolución considerable, lo que le ha permitido marcar territorio en cuanto a exportaciones para la generación de nuevas fuentes de empleo y un valor agregado. La actividad camaronera representa un crecimiento económico muy importante en Ecuador, a diferencia de otros rubros según la constancia de su producto interno bruto (Ullsco et al., 2021).

En el año 2020 se logró 570,00 TM en la industria camaronera, lo que dio como resultado un porcentaje más allá del 9,2% entre el año 2015 y 2020. La industria acuícola en Ecuador lleva presente alrededor de cinco décadas, lo que la convierte como uno los sectores económicos principales, ya que, las exportaciones que realiza el sector camaronero comprenden a más de un 40% (Gonzabay et al., 2021).

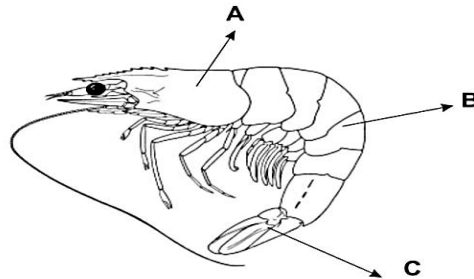
2.2 Generalidades del camarón blanco (*Litopenaeus Vannamei*)

El *Litopenaeus vannamei* fue descrito por Lee Boone en el año 1931 como un artrópodo mandibulado, con un caparazón, antenas y branquias. Se encuentra localizado en el Pacífico, desde México (Sonora) hasta Perú (Tumbes), se ubica comúnmente en sistemas estuarinos lagunares, además vive en fondos arcillosos (5 - 72 m). Posee un rostrum alargado con dientes ventrales (8-9), anténulas, pedúnculos oculares, cuerpo lateralmente comprimido y un caparazón sin sutura. Su cuerpo se divide en: cefalotórax, abdomen y telson. El cefalotórax se conforma de mandíbulas, antenas y anténulas; el abdomen cuenta con 6 segmentos donde se ubican 6 pares de pleópodos; el telson cuenta con urópodos, los cuales le ayudan a la natación (Velázquez, 2016).

Esta especie se encuentra en ambientes marinos tropicales, donde los adultos habitan y desoven en el océano, mientras que las larvas y juveniles se encuentran en zonas costeras como los estuarios, manglares o lagunas. Las hembras tienen un crecimiento mayor que

los machos, donde una hembra madura pesa de 30 a 45 g, y puede llegar a desovar entre 100.000 y 250.000 huevos (Dugassa & Gaetan, 2018).

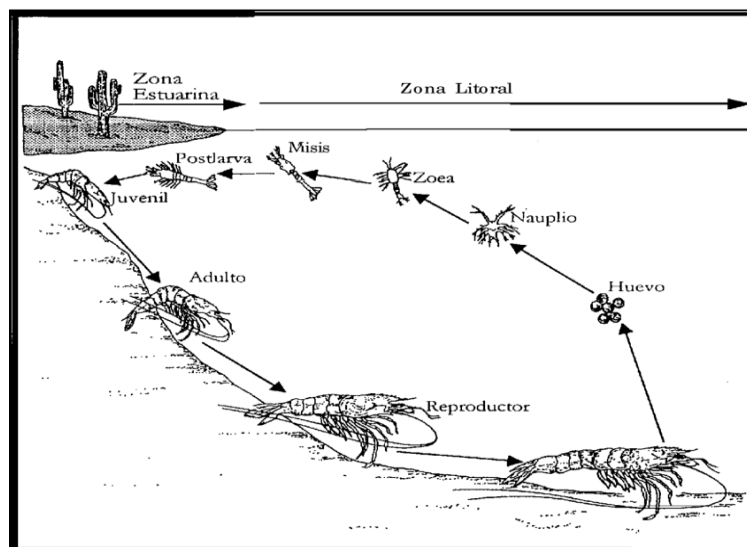
Figura 1. Estructura morfológica del *Litopenaeus vannamei*. (A) cefalotórax, (B) abdomen, (C) telson.



Fuente: Velázquez (2016)

El ciclo de vida de *P. vannamei* es complejo. Las hembras desovan en aguas mar adentro, y la eclosión de huevos se da tras el desove y fecundación, liberando los nauplios, que son la primera fase larvaria. Estos se alimentan de las reservas del saco vitelino del huevo, y mediante la metamorfosis se desarrollan las siguientes etapas larvarias: zoea, mysis y postlarva. En zoea, su alimentación se basa en fitoplancton, mientras que mysis y en los primeros estadios postlarvales se alimentan de zooplancton. Posteriormente, las postlarvas tempranas se desarrollan en un estadio de postlarva tardío, donde su morfología es parecida a la de un ejemplar adulto (Dugassa & Gaetan, 2018).

Figura 2. Biología del camarón



Fuente: © Ciclo de vida

2.3 Taxonomía

Según Dugassa & Gaetan (2018), El *Penaeus vannamei* pertenece al filo Arthropoda, debido a sus característicos apéndices unidos, y por tener una cutícula o exoesqueleto el cual se desprende en determinados periodos (muda). A continuación, se describe la clasificación taxonómica de acuerdo a varios autores:

Tabla 1. Taxonomía de *Litopenaeus vannamei*.

Dominio	Eucariota
Reino	Animal
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Superorden	Eucarida
Orden	Decapoda
Suborden	Dendrobranchiata
Superfamilia	Penaeoidea
Familia	Penaeidae
Género	Penaeus
Especie	<i>Penaeus vannamei</i>

Fuente: Dugassa & Gaetan (2018).

2.4 Tracto digestivo del camarón

Por lo general, el sistema del tracto digestivo de los camarones está conformado por a) intestino proximal, que es donde se localiza el estómago y ocurre la masticación; b) intestino medio o hepatopáncreas, que libera enzimas digestivas y se produce la asimilación de nutrientes; y c) intestino distal, que es una estructura tubular en la parte superior del organismo, terminando en el ano. La actividad enzimática de los peneidos puede provenir del hepatopáncreas o desde otras fuentes, lo que acontece al desarrollo digestivo antes que el alimento termine en el intestino. En el transcurso del proceso digestivo, los camarones poseen la capacidad de provocar la ruptura de un gran número de polisacáridos y oligosacáridos (Garibay et al., 2020).

La microbiota intestinal se la define como el “nuevo órgano” en peneidos con efectos importantes en la digestión, sistema inmune, y en el metabolismo nutricional. Debido a

la acción mutua entre el sistema digestivo del animal y su entorno adyacente, el hepatopáncreas y la microbiota intestinal deben ser partícipes en los diferentes mecanismos de resistencia ante las enfermedades (Martín et al., 2022). La microbiota del animal y su entorno juegan un rol importante en su bienestar, puesto que a diferencia de los animales terrestres que obtienen su microbiota de forma materna, los organismos acuáticos son colonizados por las diferentes comunidades microbianas presentes en el medio acuático que habitan (Rajeev et al., 2020).

Las proteobacterias son el filo mayormente presente en la microbiota intestinal de los invertebrados acuáticos, llegando a ser predominante en crustáceos. Dicho filo es diverso en morfología, fisiología y genética, siendo bacterias Gram-negativas, y en su mayoría anaerobias obligadas o facultativas. Las bacterias más comunes en el intestino del camarón tanto para el *P. monodon* como para el *L. vannamei* son de la clase Gammaproteobacterias, que es el grupo más numeroso del filo. Además de esta clase, *Photobacterium* y *Vibrio spp.*, representan más del 70% de secuencias aisladas en los intestinos de *P. monodon*, donde el restante de las secuencias pertenece a los taxones: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria (Holt et al., 2021).

2.4.1 Factores que afectan a la microbiota intestinal del camarón

Los factores que afectan a la microbiota intestinal pueden ser tanto exógenos como endógenos. Hasta la actualidad se ha podido comprobar que los factores exógenos se determinan en la salinidad, los componentes de las dietas, la temperatura del agua del estanque y la concentración de sulfuros en el fondo de la piscina, siendo los dos últimos los más importantes (Li et al., 2018). En los ecosistemas acuáticos, los factores no biológicos y biológicos se regulan entre sí: las poblaciones de microorganismos afectan a los factores acuáticos no biológicos, mientras que los factores fisicoquímicos promueven el crecimiento de diferentes poblaciones de microorganismos (Chen & He, 2019).

De acuerdo a Li et al (2018), el sedimento tiene un impacto mayor sobre las bacterias que se desarrollan en el intestino de los camarones, puesto que, estos organismos viven en los estanques, el agua y los sedimentos pueden llegar a afectar la microbiota intestinal. De igual manera, independientemente de la temperatura, existen diferentes tipos de bacterias

oportunistas que abundan en el medio de cultivo, teniendo algunas una mayor propagación en temperaturas altas.

Diversos estudios han revelado que la microbiota intestinal interviene en varios aspectos de la salud del animal, como el crecimiento, alimentación, metabolismo, reproducción, defensa ante agentes patógenos, inmunidad y envejecimiento, es decir, las bacterias intestinales son esenciales para la obtención de nutrientes indispensables para los artrópodos. Los procesos biológicos y funcionales varían según los cambios que se puedan producir en la microbiota intestinal (Cheng et al., 2021).

Entre los factores endógenos informados se reportan: el estado de salud y la etapa de desarrollo del camarón. La comunidad bacteriana intestinal de los peneidos tiende a variar según la etapa de su desarrollo y también su edad. La composición de bacterias intestinales en camarones post-larvas de 14 días y juveniles de uno y dos meses disminuye hasta un 70%. Por otra parte, cuando llegan a una edad adulta de tres meses esta puede aumentar en un 75%, lo cual está relacionado con las dietas implementadas (Li et al., 2018).

Por esta razón, aquellos patógenos que parasitan el intestino del *L. vannamei* pueden formar una simbiosis con bacterias beneficiosas, lo cual puede desempeñar un papel crucial a la hora de garantizar un óptimo ecosistema intestinal para el mantenimiento de la salud gastrointestinal. Sin embargo, cuando el entorno o medio de cultivo de *L. vannamei* sufre modificaciones, altera el equilibrio simbiótico que hay entre bacterias oportunistas y bacterias beneficiosas, causando la aparición de numerosas enfermedades en el animal (Cheng et al., 2021).

2.5 Sistema inmune del camarón

Los camarones no poseen un sistema linfático separado a diferencia de otros seres vertebrados; el fluido corporal es el principal sistema de transporte, en otras palabras, la hemolinfa. La sangre de los camarones peneidos se constituye de agua, células, proteínas y sales inorgánicas disueltas (Roy et al., 2020). Los camarones dependen de su sistema inmunitario innato para protegerse contra diferentes tipos de patógenos y los hemocitos son células que tienen un rol esencial como parte clave ante el sistema inmunitario de los camarones (Fajardo et al., 2021).

Para poder combatir las enfermedades infecciosas, los camarones confían únicamente en sus respuestas inmunitarias innatas, que por lo general tienen como característica el ser rápidas, (de horas a días) inespecíficas y sin un desarrollo de una memoria inmunológica (Norouzitallab et al., 2019). El sistema inmune de un animal colabora en el reconocimiento de moléculas no deseadas, seguido de la movilización de varias moléculas y células para poder iniciar la neutralización. De modo que, el mecanismo de defensa es una ayuda necesaria para poder rechazar una invasión de patógenos (Kulkarni et al., 2020).

La fagocitosis es el mecanismo de defensa celular principal en camarones. Esta actividad la realizan los semi y granulocitos, con la afectación de ingestión, quimiotaxis, adherencia y destrucción de patógenos y exocitosis del patógeno. Un ejemplo son las enzimas lisosómicas, las cuales están implicadas en la degradación de polisacáridos, bacterias Gram-negativas, como *Vibrios spp.* que transforman la conformación de la pared celular bacteriana, haciéndola más reconocible por las células fagocíticas. Las lisozimas pueden descomponer el patógeno tanto fuera como dentro de los hemocitos (Amatul et al., 2020).

El exoesqueleto cuticular del camarón también forma parte de la línea principal de defensa que consigue interceptar la unión y penetración de patógenos. Igualmente, el tracto oral que también es una de las rutas que potencia la entrada de patógenos, el cual está conformado por enzimas intestinales y ácidos que pueden llegar a digerir los patógenos. Además, el revestimiento quitinoso que se conoce como membrana peritrófica, es el encargado de proteger el epitelio intestinal de patógenos que pueden incorporarse mediante vía oral. Sin embargo, es posible que estos agentes patógenos logren destruir la primera línea de defensa mediante la cutícula dañada y/o durante fases de intermudación (Kulkarni et al., 2020).

2.6 Agentes patógenos de interés en el cultivo de camarón

En los cultivos de camarón blanco, la principal finalidad se centra en mejorar el manejo de las técnicas de producción, teniendo en cuenta la relación de la flora bacteriana a lo largo de todo el ciclo de cultivo de estos organismos. Si se llegan a tener las condiciones de sanidad adecuadas estas asociaciones pueden resultar positivas, pero si no se mantienen las condiciones del ambiente, mediante la proliferación de las bacterias pueden generar una alta tasa de mortalidad (Reyes, 2021).

En los ambientes de cultivo de camarón se producen condiciones artificiales que facilitan la adaptación, selección y crecimiento colectivo bacteriano. Estas comunidades bacterianas no tienen ningún riesgo para los organismos en cultivo, a menos que estos estén débiles, estresados o inmunodeprimidos. Los camarones pueden retener diferentes tipos de especies bacterianas en su exoesqueleto, tracto intestinal y branquias (Carrillo, 2017).

Las bacterias tienen un papel importante en los ambientes marinos y dulceacuícolas, esto se debe a que la propagación de las mismas puede llegar a tener efectos positivos o generar efectos negativos como enfermedades en los sistemas productivos de camarón. A pesar de ello, existen diferentes tipos de asociaciones simbióticas en las comunidades bacterianas que se crean en la columna de agua y sustratos (Reyes, 2021).

La mayor preocupación de las granjas camaroneras en medios marinos y estuarinos son los patógenos bacterianos del género *Vibrio spp.* tales como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii*, que son los que comúnmente se encuentran en los cultivos de camarón de América y Asia. En Ecuador, el sector camaronero durante la fase larvaria ha sufrido de las afectaciones de ciertas enfermedades de origen bacteriano causadas por *Vibrio*, como lo es el síndrome de bolitas generado por *V. harveyi*, y el síndrome Zoea 2 generado por *V. alginolyticus* y *V. harveyi* (Sotomayor et al., 2019).

Por otra parte, en la fase de engorde las enfermedades más infecciosas y letales son la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) y la enfermedad de las heces blancas (WFD), esta última se caracteriza por la presencia de hilos fecales de color blanco flotando en el agua de cultivo, y generalmente se presenta después de los 50 días de cultivo, dando como resultado un crecimiento tardío del organismo, cosechas no productivas, y mortalidades masivas. Por tal razón, la efectividad de los productos terapéuticos juega un rol vital en el control de las enfermedades acuícolas (Alfiansah et al., 2020).

2.7 Género Vibrio

Vibrio spp., es un género de bacterias Gram negativas, siendo microorganismos anaerobios facultativos, fermentadores, no entéricos, y catalasas positivos, contando con una forma curvada o recta junto con un flagelo polar para su movilidad. La mayoría de

las especies tienen la capacidad de fermentar glucosa a través de la generación de ácido y oxidasa positivo. Para su desarrollo se requiere de 2 - 2.5% (peso/volumen) de NaCl, sin embargo, otros vibrios requieren de otros iones como el magnesio y potasio. Entre los medios de cultivo específicos para el desarrollo de vibrios se encuentran: teepol, sales biliares, telurito y polimixina B y E (Sánchez, 2018).

Este tipo de bacterias se encuentran distribuidas en los ambientes acuáticos especialmente en los marinos y en los estuarios, así mismo cohabitan con los animales de cultivo, ya que estos colonizan las branquias, la cutícula y el tracto digestivo. Por ello, cuando el sistema inmune del camarón se encuentra suprimido se pueden convertir en patógenos oportunistas, donde sus brotes ocurren cuando los parámetros ambientales están en desbalance favoreciendo a la multiplicación de bacterias, las cuales son toleradas a niveles bajos en la hemolinfa, o sino cuando las barreras de protección del hospedero han sido penetradas por las bacterias (Peña & Cuéllar, 2019).

Según Holt et al (2021), varios vibrios generan enzimas quitinolíticas lo cual puede explicar su predominancia en entornos ricos en quitina como el intestino de los crustáceos, produciéndose así un nicho para su uso. No obstante, la actividad enzimática de ciertos vibrios puede causar efectos negativos en el exoesqueleto y en la salud del animal, como necrosis de la cola, síndrome de la concha suelta, y enfermedad roja.

Vibrio spp. es uno de los patógenos bacterianos con mayor importancia dentro del cultivo de camarón, siendo el responsable de un sin número de enfermedades, reportándose mortalidades de un 100% a causa de la Vibriosis (Valenzuela et al., 2020). No obstante, no todas las especies de Vibrios representan ser microorganismos patógenos, ya que forman parte natural de la microflora intestinal de los animales, pero puede causar enfermedades al encontrarse un número elevado. Entre los causantes de enfermedades en la fase larvaria y de engorde se destacan el *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. harveyi* (Reyes, 2018).

Una característica de los vibrios es que, cuando los parámetros ambientales del agua, como por ejemplo la salinidad, pH, temperatura, y los nutrientes, pueden influenciar la presencia como tal de los vibrios en la columna de agua, esto se debe a que determinadas especies de vibrios son estacionales, estando vigentes comúnmente en la temporada de verano, donde las temperaturas son cálidas y las precipitaciones son mínimas, mientras

que, en la temporada de invierno, estas bacterias no se pueden cultivar con facilidad, por tal motivo, *Vibrio* podría servir como un indicador del cambio de las condiciones ambientales dentro del estanque (de Souza & Wan, 2021).

2.7.1 Vibriosis

Todos los crustáceos son susceptibles a la presencia de la vibriosis durante todo su ciclo de vida, principalmente en sus primeras etapas, es decir, desde la fase larvaria hasta que son juveniles, esto se debe a que su sistema inmunológico no se encuentra completamente desarrollado sino hasta después de alcanzar las subetapas postlarvales. Por ejemplo, las actividades del sistema profenoloxidasa (PO) y la superóxido dismutasa (SOD) se encuentran reducidas en las primeras etapas de desarrollo, puesto que la energía que se debe emplear para la respuesta inmune está invertida en el crecimiento larval. Por otra parte, en el caso de los juveniles de camarones, se podría decir que su microbiota intestinal está condicionada luego de la metamorfosis de postlarva (de Souza & Wan, 2021).

Entre los signos clínicos que presentan los camarones infectados por *Vibrio spp.* se encuentra enrojecimiento del cuerpo, branquias rojizas o marrones, disminución en la ingesta de alimento, hipoxia, nado errático en la superficie y en los bordes de los estanques, y letargia. Las lesiones ubicadas en la cutícula, branquias y apéndices de color negro o marrón son típicas de la enfermedad bacteriana del caparazón; así mismo se visualiza una musculatura blanda, pérdidas de miembros, infecciones en el hepatopáncreas o intestino, o inclusive una septicemia generalizada. Por otra parte, las coloraciones rojizas en las antenas, branquias, periópodos, pleópodos, en juveniles y adultos, son a causa de la enfermedad de las patas rojas (Peña & Cuéllar, 2019)

Una de las enfermedades que ha generado considerables pérdidas económicas en el cultivo de camarón es la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), denominada también síndrome de mortalidad temprana (EMS). En el año 2009 se reportó por primera vez su aparición en China, extendiéndose a nivel mundial principalmente en Asia y Sudamérica, siendo las cepas de *V. parahaemolyticus* los principales agentes causantes de AHPND, los cuales contienen un plásmido que puede codificar los genes de toxinas. Las cepas son capaces de colonizar el estómago para posteriormente invadir el

hepatopáncreas del camarón, lo que sugiere que la microbiota del tracto digestivo está en relación con la manifestación de AHPND (Imaizumi et al., 2021).

Las cuantiosas pérdidas económicas en la camaronicultura se deben principalmente a causa de la vibriosis, la cual es una enfermedad desarrollada por la especie vibrio que mata al camarón debido a la infección bacteriana. Por ello, la industria camaronera ha implementado diferentes estrategias para tener el control sobre la vibriosis, destacando el uso de antibióticos y probióticos para contrarrestar los agentes patógenos tanto en camarones como en peces (Valenzuela et al., 2020). Sin embargo, con el incremento de la resistencia hacia los antimicrobianos por parte de varias especies de vibrio, se ha generado la necesidad de suplantar los métodos convencionales con alternativas más sostenibles (Rossi et al., 2021).

2.8 Terapéuticos

2.8.1 Uso de antibióticos en acuicultura

Para contrarrestar las enfermedades causadas por bacterias en el sector acuícola, anteriormente se ha implementado el uso de antibióticos sobre todo en países asiáticos. El empleo indiscriminado de una variedad de antibióticos en los cultivos acuícolas ha desencadenado el incremento de posibles riesgos sobre la salud humana y del animal, y principalmente en el ambiente acuático, potenciando el desarrollo de microorganismos resistentes a los mismos (Silva et al., 2021).

Según Arenas & Moreno (2018), el uso excesivo y el desconocimiento de los antibióticos en la acuicultura, ocasiona que los productores apliquen dosis mucho más allá de los índices establecidos, lo cual además de crear una resistencia microbiana, puede llegar a desencadenar un impacto ambiental en el medio ambiente. La resistencia ante los antibióticos se da cuando las bacterias están expuestas a estos compuestos, desarrollando niveles subterapéuticos durante lapsos de tiempo prolongados, donde las bacterias pueden llegar a desarrollar plásmidos y genes resistentes a los antibióticos. Este tipo de bacterias pueden transferir horizontalmente sus genes resistentes a los plásmidos y a otras bacterias (El-Saadony et al., 2021).

En el tratamiento contra la vibriosis se emplean antibióticos tales como el florfenicol, enrofloxacin, oxitetraciclina, y en determinadas ocasiones norfloxacin; estos

antibióticos son aplicados en la mayoría de los casos de manera inapropiada, sin realizar previos análisis de sensibilidad antibiótica, dosis exageradas, inclusive son utilizados como preventivo, generando de tal manera la llamada resistencia bacteriana (Aguirre et al., 2021).

En consecuencia, los antibióticos son estrictamente controlados, por lo cual solo determinados antibióticos están autorizados para ser usados en la acuicultura, siendo necesaria la búsqueda de otras alternativas para manejar las enfermedades y reemplazar a los antibióticos en la producción animal, considerando el empleo de productos naturales y orgánicos para el control de patógenos en el cultivo de camarón (Sotomayor et al., 2019).

2.8.2 Uso de probióticos en acuicultura

Los probióticos son microorganismos que al ser suplementados tienen la capacidad de modificar la microbiota intestinal del hospedero, proporcionando beneficios en su fisiología con el fin de mejorar su salud, y a su vez mejorar la calidad del agua y sedimentos (Reyes, 2018). Dentro de las limitaciones de los probióticos incluye la aplicación inapropiada en el huésped que puede ser manejada negativamente en algún momento, presentan un mecanismo de acción lento, y su preparación requiere de tecnología avanzada siendo el principal desafío (Valenzuela et al., 2020). (Valenzuela-Cobos et al., 2020).

En la acuicultura, los *Bacillus* son una de las especies mayormente utilizadas para la formulación comercial de raciones, por ser capaces de generar elementos inhibitorios y enzimas, y por la sencillez de incorporarlos a las raciones a razón de que sus esporas les otorga un mayor grado de resistencia. No obstante, existe evidencia de que cepas de *B. subtilis* provocan lesiones en la cutícula de *P. monodon*, además de ello se ha descrito una nueva enfermedad llamada White Patch Disease (WPD) en el *L. vannamei* que genera manchas opacas en la cutícula, reducción del apetito, tonalidad azul blanquecina, músculos pálidos, necrosis y mortandad a causa de *B. cereus*. por ello se debe tomar antes en consideración el tipo de bacteria que se ingresa al medio de cultivo (Vieira, et al., 2017).

2.8.3 Uso de ácidos orgánicos en la acuicultura

Otras de las alternativas para contrarrestar los problemas de las enfermedades bacterianas son los ácidos orgánicos. Estos poseen acciones antimicrobianas que se encadena con la reducción del pH, siendo su forma no disociada la más importante, ya que le permite propagarse libremente a través de la membrana celular de los microorganismos hacia su citoplasma (González, 2014).

Por otra parte, las bacterias llegan a consumir grandes cantidades de trifosfato de adenosina (ATP) para poder desechar protones al tratar de conservar el equilibrio del pH intracelular, acabando así con la energía celular, para finalmente provocar la muerte. Las sales que poseen los ácidos orgánicos también pueden llegar a beneficiar de manera nutricional, mediante la generación de varias rutas metabólicas para originar ATP en el ciclo del ácido carboxílico o ácido cítrico (Mahmoud & Shunsuke, 2017).

Los ácidos orgánicos tienen diferentes beneficios como aditivos nutricionales funcionales en los animales en cautiverio. Estos componentes reducen los agentes patógenos (hongos, bacterias Gram-negativas) como reducción del pH, aumentar la actividad enzimática (proteasas), mejorar la atractividad del alimento y suministro de energía, o cual ocasiona una mejor disponibilidad y aprovechamiento de los nutrientes, un crecimiento acelerado y tasas de conversión alimenticia menores (Silva et al., 2021).

La combinación de varios tipos de ácidos orgánicos nos ayuda a mejorar la salud digestiva y potenciar los efectos antibacterianos del animal. Al usar estos compuestos se obtiene una mejor resistencia inmune a mejoras de crecimiento y reducción de mortalidad, repercutiendo positivamente en los parámetros de producción. Por otro lado, los ácidos orgánicos tienden a progresar el desarrollo de la microflora, que da como resultado una aceleración en las células epiteliales intestinales, ayudando al desarrollo de la actividad de las enzimas digestivas. Al ser empleados como estimulantes nutricionales y digestivos en el camarón, pueden ser beneficiosos en periodos de cultivos sometidos a estrés, disminuyendo los retrasos deficientes de alimentación y crecimiento del animal (Díaz, 2020).

2.9 Ácidos orgánicos

Son compuestos de hidrocarburos, que comprenden en uno o más grupos carboxilo, los cuales se dividen de la combinación de un par de grupos funcionales dentro de un mismo átomo de carbono: grupo hidroxilo y grupo carbonilo. Poseen un carácter ácido el cual se lo conoce como ácidos carboxílicos. Dentro de los tejidos biológicos estos ácidos se encuentran distribuidos de 8 formas, siendo mediadores de los ciclos metabólicos, mientras que otros se originan en el tracto digestivo mediante la fermentación (Reyes, 2014).

Generalmente los ácidos orgánicos son considerados como compuestos seguros, que poseen uno o más grupos carboxilo (-COOH). Los de cadena corta son los ácidos más comunes, es decir, aquellos que cuentan con un número pequeño de carbonos (C1-C6), entre ellos están los ácidos láctico, fórmico, cítrico, propiónico y sus sales (Kabir et al., 2021). Durante varias décadas los ácidos orgánicos han sido usados como un recurso, debido a las propiedades antimicrobianas que estos poseen, así como también la capacidad de poder mejorar la resistencia a enfermedades y el crecimiento de los organismos acuáticos. Su modo de empleo es en los alimentos como conservantes (Mahmoud & Shunsuke, 2017).

Su modo de acción incluye la reducción de pH de la digesta, promoción de la integridad intestinal, estimulación de las enzimas digestivas y control de las comunidades microbianas intestinales; su eficacia ante los microorganismos está relacionado con el valor de pKa, en otras palabras, es el valor del pH en que se puede disociar el 50% del ácido. La variación de pKa de los ácidos orgánicos va desde 3,02 hasta 6,4 para el ácido fumárico y cítrico respectivamente (Kabir et al., 2021).

Los ácidos orgánicos pueden también utilizarse como promotores para el crecimiento en la acuicultura, ya que estos ayudan a la inhibición de patógenos en su tracto intestinal, además de suministrar de energía y ayudar a tener una mejor digestibilidad de los nutrientes como el P y N. Estos compuestos orgánicos son elementos fundamentales de diferentes rutas metabólicas, como por ejemplo, la generación de ATP en el ciclo de los ácidos carboxílicos o en el ciclo del ácido cítrico (Correa, et al., 2012).

2.9.1 Ácido cítrico

Los ácidos cítricos son considerados como aditivos y son sintetizados mediante vías de laboratorio, así como también pueden ser naturales. Estos ácidos pueden llegar a ubicarse prácticamente en todos los tejidos tanto animales como vegetales. Se presentan en el ácido que poseen las frutas tales como la lima, naranjilla, piña, toronja, mandarina, entre otros. Así mismo, el ácido cítrico se encuentra como uno de los aditivos alimentarios más usados, usados como antioxidantes, conservadores, saborizante de alimentos y acidulante, por ende, empleados en medicamentos (Cedeño & Mendoza, 2020).

En la acuicultura manera que se emplea estos aditivos para potenciar el beneficio que estos poseen son muchos, por ejemplo, los ácidos cítricos también pueden mezclarse con otros aditivos similares o extractos naturales, lo cual puede llegar a tener un efecto positivo mejorando la calidad de los conservantes en camarones. Así mismo, tienen consecuencias positivas en la inhibición del crecimiento de microorganismos, la oxidación de proteínas y lípidos (Zhang et al., 2021).

2.9.2 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un nutriente que tiene una enorme importancia, se lo puede llegar a usar como un medio terapéutico, el cual se traslada a nivel intracelular. Es un agente reductor, en donde uno de sus beneficios es neutralizar los compuestos reactivos del oxígeno, como lo son el peróxido de hidrógeno que pueden llegar a dañar las membranas de los camarones y los peces (Cedeño & Mendoza, 2020). En la acuicultura la falta de vitamina C puede llegar a causar pérdida de apetito en camarones, causa una tolerancia al estrés menor, así como también una disminución en las mudas y causa altas mortalidades. El ácido ascórbico en las post-larvas de camarones aumenta la resistencia en infecciones bacterianas y condiciones de estrés (Cabrera, 2018).

Las defensas antioxidantes que poseen los animales en cultivo ayudan a poder mantener un mejor ambiente reductor de cada célula, previniendo los daños causados por agentes patógenos. El ácido ascórbico al ser mezclados o empleado con otros aditivos pueden mejorar la actividad enzimática antioxidante, teniendo así una mejor resistencia en peneidos, previniéndolos de varias enfermedades causadas por géneros *Vibrios spp.* tales como el virus de la mancha blanca. Por otra parte, también poseen un efecto antioxidante

que puede minimizar los daños que son causados por productos oxidativos, en donde se incluye los radicales libres (Poom, 2018).

2.9.3 Ácido Acético

El ácido acético revise comúnmente el nombre de vinagre, este se obtiene mediante una fermentación doble (alcohólica y acética) de una sustancia que contiene almidones y azúcares, lo que nos da como resultado una solución acuosa. En la industria alimentaria este ácido es muy usado, ya que puede ayudar a mejorar la proliferación de organismos patógenos. Un empleo correcto dentro de los límites establecidos y permitidos no llega a causar ningún efecto secundario en el animal (Cedeño & Mendoza, 2020).

2.9.4 Ácido fumárico

El ácido fumárico es un ácido orgánico débil de cuatro carbonos ($C_4H_4O_4$), es estable a temperatura ambiente, inodoro, no tóxico, con una solubilidad media en el agua, y se encuentra naturalmente en las plantas y hongos. Las sales fumáricas en el metabolismo animal se generan a partir de la degradación de la fenilalanina, aspartato y la tirosina durante el ciclo de la ornitina y la síntesis de purinas. Al ingerirse por vía oral o producirse en el ciclo del ácido cítrico interviene en la generación de ATP, otra característica que posee es su acción antimicrobiana debido a su propiedad lipofílica y a su alta disociación (pK_a), ya que al traspasar la membrana celular bacteriana y disminuir el pH del citoplasma altera el metabolismo de las bacterias y sus actividades enzimáticas, impidiendo su desarrollo o incitando a la muerte celular (das Neves et al., 2021).

2.9.5 Ácido propiónico

El ácido propiónico es ácido orgánico que puede llegar a ser usado como fungicida, conservante y agente microbiano. Este ácido es uno de los compuestos que se pueden considerar como seguros, una de las ventajas que se ha podido llegar a demostrar es que, la implementación de este ácido puede ayudarnos a mejorar el crecimiento de nuestros animales. Otra de sus ventajas que estos compuestos poseen es la limitación del crecimiento de bacterias, las cuales se pueden llegar a propagar a través de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Los organismos que se alimentan con este tipo de ácidos pueden llegar a presentar un menor número de cargas bacterianas de *Vibrios spp.* en

donde el ácido propiónico actúa como un gran estimulante de los efectos inhibitorios sobre el crecimiento *V. harveyi* en el camarón (Pourmozaffar et al., 2017).

2.9.6 Ácidos orgánicos como aditivos nutricionales en los alimentos

Dentro de los alimentos destinados a la producción animal es necesaria la inocuidad y calidad para satisfacer y garantizar el adecuado desarrollo de los animales. Las bacterias, hongos y levaduras pueden llegar a proliferar en el alimento almacenado cuando ciertos parámetros ambientales tales como la humedad y la temperatura se encuentren elevados. Por ello, han sido empleados en el alimento como preservantes. Por ejemplo, el ácido láctico es aprovechado en el ensilado de forrajes debido a sus propiedades antimicrobianas que generan las bacterias ácido lácticas durante el proceso de fermentación. Los ácidos orgánicos pueden ser usados en los ensilados de pescado, mejorando la digestibilidad de las proteínas a causa del declive de pH, siendo desnaturalizadas y aumentando la actividad enzimática (Reyes, 2014).

Últimamente los ácidos orgánicos se han venido utilizando en la acuicultura como aditivos alimentarios para mejorar la inmunidad, crecimiento, rendimiento y digestibilidad de nutrientes en especies acuáticas. Estos componentes orgánicos al disminuir el pH del ambiente gastrointestinal del individuo, aumenta la capacidad de absorción y los nutrientes digestivos, lo que conlleva a un mejor crecimiento del animal. Por otro lado, la inclusión de ácido orgánico en el organismo de los crustáceos puede aumentar la digestibilidad de la proteína seca y energía, lo que nos da como resultado mejoras de ganancia de peso (Duan et al., 2018).

Los ácidos orgánicos se los emplea en dietas alimenticias, que estimulan la actividad pepsina mejorando la disponibilidad de proteínas. Al ser de cadena corta comúnmente han demostrado tener como beneficio la capacidad de mejorar la tasa de crecimiento específico y la tasa de conversión alimenticia, y por ende generar ganancias de peso mediante una mayor asimilación nutricional de ingesta proteica (Lee et al., 2021).

Los acidificantes pueden presentar propiedades bactericidas y bacteriostáticas según la cantidad de inclusión en el alimento, además de un efecto antifúngico para mantener la higiene de los balanceados. En aquellos países tropicales, el incremento de la humedad deteriora los piensos durante el almacenamiento. Por ejemplo, una temperatura mayor a los 25°C, una humedad relativa mayor al 65% y una humedad del 12%, crea condiciones

factibles para la proliferación de bacterias y mohos que malogran la conservación de los piensos. El *Aspergillus flavus* es un moho que contamina los balanceados con aflatoxinas afectando el bienestar de los animales. El uso de acidificantes al 0,25-1% minimiza el pH en los balanceados, comportándose como un conservante, ya que limita el crecimiento de microorganismos patógenos, manteniendo la profilaxis y calidad de los piensos (Sardar et al.,2020).

Tabla 2. Ácidos orgánicos y sus efectos en la nutrición animal.

SITIOS DE ACCIÓN	EFFECTOS	FORMA EFECTIVA
Tracto intestinal	Aumento de la actividad de pepsina. Reducción del pH de estómago y duodeno. Cambios en la concentraciones de microbiota.	H +
	Disponibilidad de cationes (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺)	Anión
Metabolismo	H + y Anión	Efecto antimicrobiano
Dieta	Reducción pH. Reducción del crecimiento microbiano. Desnaturalización de proteínas.	H +
	Efecto antimicrobiano	H + y Anión

Fuente: (Reyes, 2014).

2.9.7 Inhibición de bacterias patógenas

Cada uno de los microorganismos cuenta con un pH óptimo en el cual puede desarrollarse, y un valor de pH donde les resulta imposible crecer, haciendo referencia al pH extracelular, puesto que el pH intracelular debe estar próximo a la neutralidad, inclusive el de aquellos microorganismos acidófilos. Los ácidos orgánicos actúan sobre los microorganismos de dos formas diferentes, aunque se encuentren relacionadas entre sí. La primera trata sobre el efecto antimicrobiano correspondiente a la acidez por acción de la reducción del pH extracelular. La segunda, es el efecto antimicrobiano a causa de la forma no disociada del ácido, el cual es capaz de atravesar la membrana celular y causar un declive en el pH intracelular (Anangonó, 2014).

Las bacterias patógenas tienen una inhibición efectiva mediante la adición de ácidos orgánicos, sobre todo las Gram negativas, al reducir el pH de su ambiente. Su acción se realiza al entrar a la pared celular y liberar protones en el citoplasma, lo que provoca un desequilibrio del pH en la célula. Para poder mantener el equilibrio comienza a gastar grandes cantidades de ATP y así poder extraer los protones de la célula. El consumo de ATP genera una depleción energética que concluye en muerte celular. Además de reducir el pH intracelular, los ácidos orgánicos tienen la capacidad para formar complejos minerales con quelantes, ante todo el hierro, indisponibilizando los micronutrientes y acortando el desarrollo de otros microorganismos (Vieira et al., 2017).

En investigaciones citadas por Li et al (2018), se ha estudiado diferentes dosis de butirato y propionato como aditivos en las dietas de los peneidos, donde se ha usado concentraciones de 0,5%, 1% o 2% de cada sal, así como una dieta de control por 47 días. Todas las dietas que poseían butirato o propionato han logrado aumentar la biomasa final, así como la aglutinación sérica de los peneidos. En las dietas que fueron alimentadas con 1% y 2% de propionato y butirato las comunidades bacterianas de los camarones fueron similares a los grupos de control y 0,5% de propionato, en donde se encontraron una carga baja de *Vibrios spp.* en los intestinos de los camarones para el grupo de butirato. Así mismo, se obtuvieron resultados semejantes en peneidos alimentados con el 2% de butirato en sistemas superintensivos de biofloc.

En la investigación realizada por Valenzuela et al (2020), se emplearon 3 formulaciones: pellets mezclados con ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido sórbico y aglutinante acuícola (M1); pellets mezclados con ácido fumárico, ácido sórbico, ácido cítrico y aglutinante acuícola (M2); y pellets mezclados con ácido fórmico (M3). Los camarones infectados con vibriosis tuvieron una alimentación durante 5 días, que fue realizada dos veces por día con 200 g de pellets con las 3 formulaciones. Utilizando la primera mezcla (M1) se logró obtener una mortalidad del 10,00%, un índice mayor porcentual de supervivencia del 80,00%, así como un incremento de peso de 54,00 g; mientras que, utilizando la muestra de control (solo pellets) se obtuvo una mortalidad significativamente mayor del 50,00%, el menor índice porcentual de supervivencia de un 0,00% y así mismo el mayor peso de los camarones. Por otra parte, se pudo encontrar cambios relativos entre las 3 mezclas que fueron probadas en *L. vannamei* infectados por vibrios empleando la mezcla (M1) en donde no se presentó síntomas de vibriosis después de realizar una prueba de biocontrol. La muestra (M1) demostró un contenido mayor de

cenizas y proteína siendo de 344,20 y 145,70 g. Kg⁻¹. Esto nos muestra como resultado que el empleo de ácidos orgánicos en dietas alimenticias está relacionado de manera directa con un mejor control de la vibriosis, así como también una mejorar en el crecimiento del camarón blanco.

De acuerdo con investigaciones citadas por Sardar et al (2020), los efectos que pueden generar los ácidos orgánicos en los peces van más allá de una modificación en la microflora intestinal del animal. Entre otros beneficios positivos tenemos el aumento de la secreción pancreática, una mejora considera en la actividad de las enzimas digestivas y en la integridad de la barrera intestinal, y el desarrollo del epitelio intestinal. La adición de fitasa (a 500 FTU) combinado con ácido cítrico (3%) en dietas basadas en vegetales, puede aumentar la biodisponibilidad de P y diferentes minerales, aumentado la mineralización en alevines de *L. rohita*. El resultado total de las bacterias por gramo de heces disminuyó significativamente en los peces que fueron alimentados con dietas suplementadas con 0,2% de diformato de potasio y 0,3% de mezcla de ácidos orgánicos.

Chuchird & Tirawat (2015) comprobaron el efecto del ácido fórmico (FA) y la astaxantina (AX) en el crecimiento, supervivencia, bacterias intestinales y resistencia de las postlarvas de camarón blanco ante la presencia de *V. parahaemolyticus*. Se realizaron 6 dietas, donde los resultados mostraron que no hubo diferencias en cuanto a la ganancia de peso entre los tratamientos. La tasa de supervivencia fue mayor en camarones alimentados con FA, AX y su combinación (45,83–67,50 %), a diferencia del grupo control (20,00 ± 17,32 %). Las dietas que incluían FA presentó un recuento inferior de bacterias intestinales totales (0,6% FA) y *Vibriosis spp.* En cuanto a los parámetros inmunitarios, los grupos alimentados con AX mejoraron significativamente en contraste con los otros grupos. Se puede concluir que la inclusión de FA, AX y su combinación son útiles en el cultivo de camarón.

Dentro de las investigaciones citadas por Ng & Koh (2016), reportan que para la supervivencia, la actividad enzimática, la respuesta inmune y la tolerancia a la vibriosis en el camarón blanco, se recomienda una suplementación de ácido cítrico de 2-3 g kg⁻¹. Así mismo la suplementación de butirato puede favorecer a la microbiota intestinal de los camarones, obteniendo un mejor rendimiento respecto al crecimiento. En el caso de los peces, la adición de diformato de potasio (KDF) en la dieta de la tilapia híbrida mejoraba su resistencia a *V. anguillarum* dependiendo la dosis. La suplementación de 20

g Kg⁻¹ de KDF podría ser eficaz para controlar la infección por *V. anguillarum* en la tilapia.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, ubicada en la ciudad de Machala perteneciente a la provincia de El Oro, con las siguientes coordenadas $3^{\circ}17'29''\text{S}$ $79^{\circ}54'49''\text{W}$ (Figura 3).

Figura 3. Ubicación de la investigación.



Fuente: Google Earth (2023)

3.2 Materiales y equipos

Materiales

- Gavetas (25 L)
- Mangueras de acuario y piedras difusoras
- Red de acuario
- Filtro de bolsa de agua
- Balanceado
- Placas de petri
- Tubos eppendorf
- Matraz Erlenmeyer
- Gradilla

- Tubos de ensayo
- Mechero
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta
- Asas de siembra Drigalski
- Pinzas
- Hisopos
- Papel aluminio
- Papel absorbente
- Rotuladores

Equipos

- Medidor de pH y temperatura
- Aireadores
- Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza gramera

Sustancias

- Aglutinantes
- Ácidos orgánicos
- Probióticos
- Medio de cultivo (Agar)
- Alcohol industrial
- Agua destilada
- Agua salobre

3.3 Metodología

Para el desarrollo de la siguiente investigación se realizó un ensayo para comprobar el efecto que presentan los ácidos orgánicos en las cargas bacterianas de *Vibrios spp.* del camarón blanco.

3.3.1 Obtención de los ejemplares

Para realizar esta investigación se obtuvo 60 ejemplares con un peso aproximado de 9 gr, los cuales fueron recolectados de la camaronera “COODAESVIR” ubicada en la parroquia La Cuca del cantón de Arenillas de la provincia de El Oro. Se tomó los parámetros del agua de transporte los cuales fueron: T°C 30°C, salinidad de 16 ppt, pH 7,51.

Cabe mencionar que los organismos recolectados no fueron expuestos a ningún tipo de tratamiento por parte del productor durante su cultivo.

3.3.2 Proceso de aclimatación de los juveniles

El proceso de aclimatación se realizó durante un periodo de cuatro días para evitar el estrés y mortalidad de los ejemplos a causa de la adaptación a las nuevas condiciones fisicoquímicas del medio, así mismo para verificar el comportamiento de los organismos.

3.3.3 Preparación de unidades experimentales

Durante el proceso de investigación se empleó 12 unidades experimentales, es decir, 3 réplicas para cada tratamiento (T1, T2, T3), incluido el tratamiento control (T0).

En cada unidad experimental se colocó 5 ejemplares de camarón blanco. Por otra parte, el agua empleada para las unidades experimentales fue recolectada de la camaronera “ACUICOLA MAR Y TIERRA S.A” ubicada en la ciudad de Machala, vía Puerto Grande. Previamente el agua fue filtrada con ayuda de una bolsa filtrante de 1 μ m, colocándose un volumen de 25 L para cada unidad experimental con aireación constante. Sus parámetros fueron los siguientes: T°C 29°C, salinidad 19 ppt, pH 8,01, amonio 0 ppm.

3.3.4 Manejo de unidades experimentales

Los parámetros de calidad de agua tales como pH y temperatura se midieron con un equipo digital, mientras que el amonio se midió con ayuda de un kit colorimétrico API diariamente, por último, los recambios de agua realizados fueron de un 30% pasando un día mediante un sifoneo. Para recuperar el volumen de agua perdido se utilizó agua del

reservorio previamente tratada. Posteriormente se adicionará bacterias probióticas al agua para mantener su calidad en óptimas condiciones.

3.3.5 Preparación del alimento

Para poder realizar las dietas correspondientes se emplearon 3 diferentes ácidos orgánicos comerciales (AO1, AO2, AO3). Durante la investigación se utilizó un balanceado comercial de la empresa Biomar, que contiene un 35% de proteína y es extruido. El pienso alimenticio fue mezclado con los diferentes ácidos orgánicos según la dosis recomendada por el fabricante (10g/kg de alimento), y para su compactación se utilizó pegante (1 ml). La dieta suplementada se suministró a los ejemplares por un periodo de 10 días.

AO1: Ácido cítrico, ácido gálico, ácido fumárico y ácido láctico, extracto de ajo, canela, olivo y aceituna.

AO2: Ácido propiónico, ácido acético, ácido fórmico, formaldehído.

AO3: Ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido fumárico, polvo de diatomeas

3.3.6 Alimentación

Las dietas fueron determinadas en base a su peso corporal promedio, siendo alimentados al 2,6% de su biomasa. Se dosificó con dos raciones al día durante los 10 días.

3.3.7 Análisis microbiológico

Se realizaron dos análisis microbiológicos: a) el primer análisis se llevó a cabo al comienzo del ensayo para verificar la cantidad de carga bacteriana inicial (UFC) presente en las muestras de hepatopáncreas del camarón; b) el segundo análisis se realizó al final del ensayo, determinando la cantidad de carga bacteriana presente en las muestras de hepatopáncreas luego de haberse sometido al tratamiento con los ácidos orgánicos. Para ello se utilizó la técnica de diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) preparándose con anticipación una solución salina al 1.5% que fue autoclavada, donde se colocó 9 ml de la solución en cada tubo de ensayo a emplear. Después se tomó al azar 6 ejemplares de cada tratamiento y se extraerá muestras de hepatopáncreas para macerarlos y preparar un pool, pesando 1g de HP que fue depositado en el primer tubo de ensayo, y siguiendo dicho proceso se continuará con las diluciones seriadas. Luego se efectuará la siembra en placa

con el Agar TCBS y CHROMagar™ Vibrio, tomando 100 µL de cada dilución realizada, extendiendo la muestra por toda la superficie del medio de cultivo mediante la técnica de siembra en superficie. Se realizó un duplicado de cada dilución. Posterior a esto, se incubo las placas por 24 horas a 30°C, para después contabilizar las colonias bacterianas (UFC), así como también se determinará la predominancia de vibrios en específico por medio de su coloración, el cual será expresado en porcentaje.

Además, se llevó a cabo un examen *in vitro* en donde se determinó el halo de inhibición que los ácidos orgánicos pueden producir ante la presencia de bacterias Gram-negativas, de tal forma que se evidenciará su eficacia. Primero se realizará una siembra en placa de una muestra de HP con la técnica de siembra por estría con ayuda de un hisopo sobre el medio de cultivo. Después se elaboró pequeños discos de papel absorbente (0,5 mm), los cuales fueron sumergidos en cada ácido orgánico, y colocados sobre la superficie del medio de cultivo con ayuda de unas pinzas. Posterior a ello se incubo las placas por 24 horas a 30°C, y a continuación se podrá visualizar el halo de inhibición que forma cada ácido orgánico, el cual fue medido con una regla (mm) para determinar su diámetro.

3.3.8 Diseño experimental

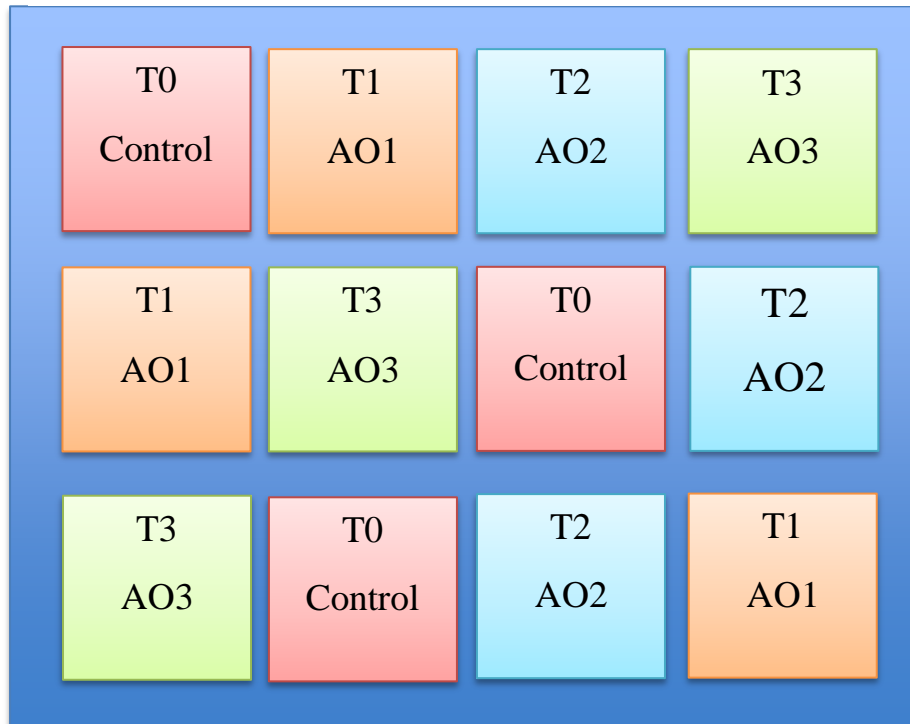
El diseño experimental que se utilizó en la investigación es un Diseño Completamente al Azar (DCA), siendo el factor de estudio los ácidos orgánicos que serán implementados en el alimento. Los datos que se obtuvieron son en base al conteo de bacterias en el hepatopáncreas en función de cada tratamiento. Se trabajará con 4 tratamientos y 3 réplicas (4x3) (Figura 4):

- Tratamiento 1 (T1): alimento balanceado con la adición de AO1.
- Tratamiento 2 (T2): alimento balanceado con la adición de AO2.
- Tratamiento 3 (T3): alimento balanceado con la adición de AO3.
- Tratamiento control (T0): alimento balanceado sin la aplicación de ácidos orgánicos.

Para el análisis estadístico de los datos que se obtuvieron del conteo bacteriano del hepatopáncreas en el camarón blanco se utilizó el software IBM SPSS Statistics versión 25, con un intervalo de confianza del 95%. Se aplicará el método estadístico de ANOVA de un factor inter-grupos para comparar las varianzas entre las medias de los diferentes grupos, de tal manera que se determinará si existe o no diferencias significativas entre los

tratamientos, previamente comprobados los supuestos de prueba de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas. En el caso de existir diferencias significativas entre los grupos se aplicará la prueba Post Hoc Duncan.

Figura 4. *Diseño experimental del ensayo.*



Fuente: Autores (2023).

4. RESULTADOS

4.1 Análisis microbiológico *in vivo*

Respecto a los resultados del análisis microbiológico *in vivo* de hepatopáncreas de *L. vannamei* realizado con agar TCBS, se pudo observar que el número de colonias de bacterias presentes al inicio del ensayo fue de $2,15 \times 10^5$ con predominancia de colonias verdes.

En la tabla 3 se puede evidenciar que al final del ensayo el T2 ($2,65 \times 10^3$) presentó un menor número de colonias bacterianas con respecto al T1, T3 y T0 ($2,89 \times 10^3$, $4,35 \times 10^3$, $9,45 \times 10^3$ respectivamente), aunque no existe diferencias exponencialmente entre tratamientos, se puede observar una diferencia en la base numérica de los mismos. Por otra parte, se puede evidenciar que la carga bacteriana del T2 a diferencia de la carga bacteriana inicial es menor, es decir, que el AO2 tiene mayor efectividad para minimizar la carga bacteriana del organismo.

Tabla 3. Comparación del efecto de los ácidos orgánicos sobre la carga bacteriana de camarón blanco (*L. vannamei*).

Tratamientos	UFC ml-1
Tratamiento control (T0)	9,45E+03
Tratamiento 1 (T1)	2,89E+03
Tratamiento 2 (T2)	2,65E+03
Tratamiento 3 (T3)	4,35E+03

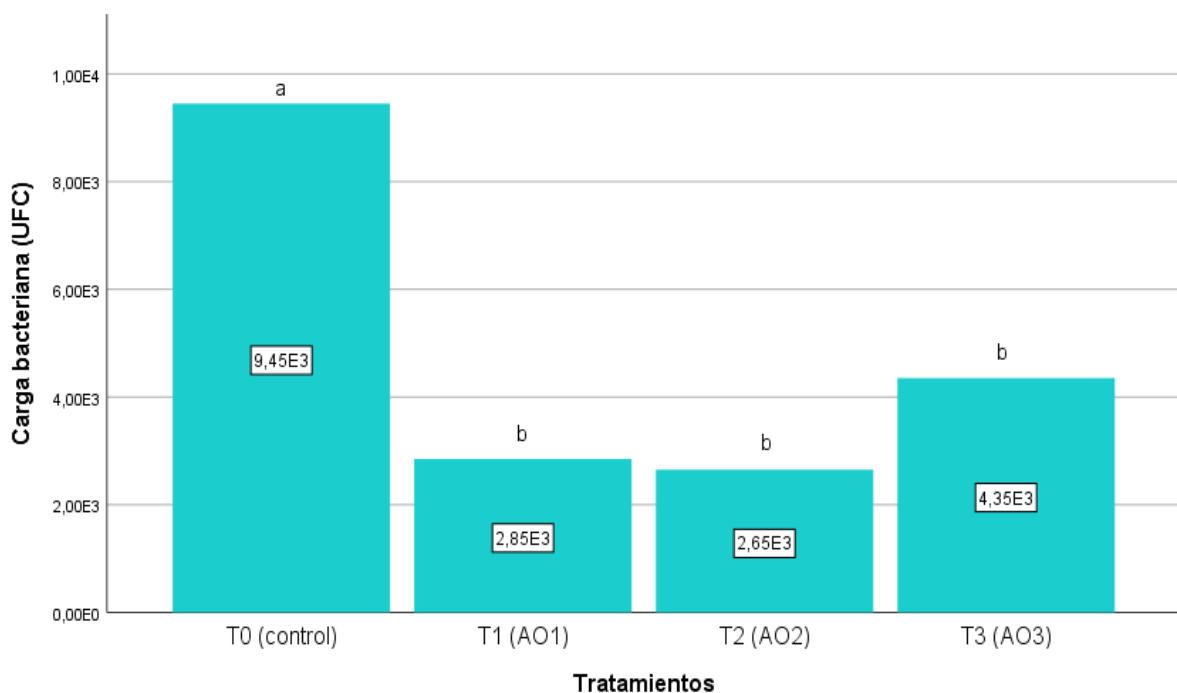
En el análisis de varianza (ANOVA) de un factor inter-grupos se evidencia que los tratamientos con ácidos orgánicos y el control presentan diferencias estadísticas significativas en relación a la carga bacteriana del camarón, puesto que el p-valor obtenido (0,047) es menor que alfa, por lo cual, se concluye que los aditivos empleados en el alimento (ácidos orgánicos) presentan un efecto significativo sobre la cantidad de bacterias totales en el camarón (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza inter-grupos sobre la carga bacteriana del camarón blanco en relación a la adición de ácidos orgánicos en el balanceado.

Carga bacteriana (UFC/ml)					
Fuentes de variabilidad	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	90742500,000	3	30247500,000	4,159	,047
Dentro de grupos	58180000,000	8	7272500,000		
Total	148922500,000	11			

Se puede observar en la figura 5 que los ácidos orgánicos incluidos en la dieta del camarón blanco son eficaces para combatir bacterias Gram-negativas, demostrando que el tratamiento 2 ($2,65 \times 10^3$) difiere estadísticamente del tratamiento control ($9,45 \times 10^3$) revelando ser el ácido orgánico más efectivo, seguido del tratamiento 1 ($2,89 \times 10^3$), y por último el tratamiento 3 ($4,35 \times 10^3$), no obstante, entre los tratamientos con ácidos orgánicos no mostraron diferencias estadísticas significativas.

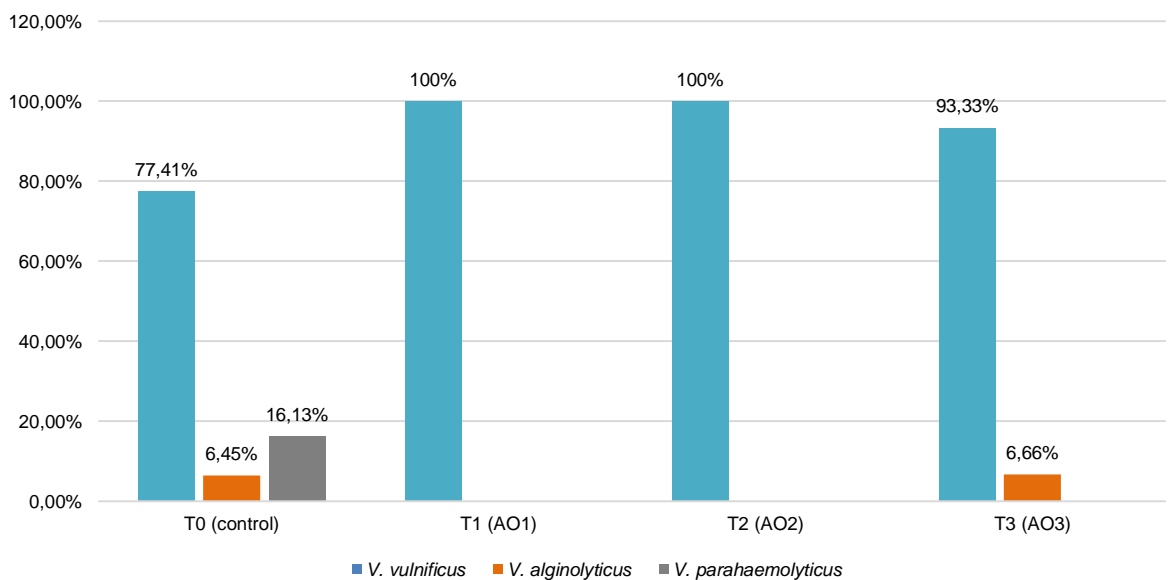
Figura 5. Efecto de los ácidos orgánicos sobre la carga bacteriana en el camarón blanco.



4.2 Apariencia de las colonias

Al determinarse la predominancia de vibrios específicos en el hepatopáncreas del camarón blanco, los resultados revelaron que las colonias de *Vibrio vulnificus* estuvieron presentes en todos los tratamientos, incluido el control. Se obtuvo un 100% de colonias de *V. vulnificus* presente en el T2 (AO2) y el T1 (AO1), mientras que en el T3 (AO3) predominaba con el 93,33% el *V. vulnificus* y con un 6,66% el *V. alginolyticus*. Por su parte, en el T0 (control) hubo la presencia de tres especies de vibrios: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, y *V. vulnificus* con el 16,13 %, 6,45% y 77,41% respectivamente (Figura 6).

Figura 6. Presencia de vibrios específicos presentes en el hepatopáncreas del camarón blanco al emplear ácidos orgánicos en la dieta.



4.3 Análisis microbiológico *in vitro*

Los resultados de la lectura de los halos de inhibición que formaron los ácidos orgánicos en presencia de bacterias Gram-negativas se puede observar que, el tratamiento 1 (AO1) y el tratamiento 3 (AO3) mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento 2 (AO2), calificándose la zona de inhibición como intermedia para el tratamiento 1 (AO1) y tratamiento 3 (AO3), y nula para el tratamiento 2 (AO2) (Tabla 5).

Tabla 5. Lectura de halos de inhibición que formaron los ácidos orgánicos

Tratamientos	Diámetro del halo de inhibición
Tratamiento 1 (AO1)	10 mm (intermedio)
Tratamiento 2 (AO2)	0 mm
Tratamiento 3 (AO3)	12 mm (intermedio)

4.4 Supervivencia

Al final del ensayo no se registró la muerte de ningún organismo en aquellos tratamientos en donde se aplicó los ácidos orgánicos, obteniendo una supervivencia del 100%, no obstante, en el tratamiento control se registró la muerte de un organismo, obteniendo una supervivencia final del 93%.

5. DISCUSIÓN

Uno de los grandes problemas que aqueja a la acuicultura mundial es las enfermedades bacterianas, siendo la vibriosis una de las enfermedades principales. Esta enfermedad es responsable de generar un sin número de mortalidad de organismos que se encuentren cultivados, así como también ocasionar importantes pérdidas económicas. Por lo general, las infecciones ocasionadas por el género *Vibrio* llegan a tener lugar en los criaderos, por otra parte, las epizootias tienden a ocurrir regularmente en estanques acuícolas donde se encuentran los camarones en cautiverio. El factor principal para la propagación de estas bacterias es una alteración de los factores ambientales, lo cual desata una masiva multiplicación de las mismas. Los camarones tienen un rango bajo de toleración de estas bacterias en la sangre, lo cual los hace susceptibles a tener una penetración bacteriana de las barreras del huésped, haciendo así que estos se lleguen a enfermar (Chandrakala & Priya, 2017).

En el siguiente ensayo realizado se pudo evidenciar que el uso de ácidos orgánicos en el alimento balanceado fue capaz de aminorar las cargas bacterianas de vibrios en el camarón y mantener la tasa de supervivencia, lo cual coincide con los resultados de Valenzuela-Cobos et al (2020), indicando que la combinación de ácidos orgánicos en la dieta ayuda a controlar la vibriosis, además de incrementar la tasa de supervivencia y mejorar el crecimiento en el camarón blanco. Por otra parte, de acuerdo a lo reportado por Ng & Koh (2016) se puede observar un recuento total de vibrios inferior en el hepatopáncreas al suministrar en la dieta de los camarones 20 g kg^{-1} de mezclas de ácidos orgánicos (OAB), a comparación del tratamiento control sin la adición de ácidos orgánicos.

Existen diversas investigaciones donde se comprueba la acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos al implementarse en las dietas de los organismos acuáticos. En el ensayo realizado por Sivakumar et al (2022) se evidenció que los camarones que fueron alimentados con ácido orgánico (diformiato de potasio (KDF), formiato de sodio (SF)) y una mezcla de ácidos orgánicos (KDF + SF) mostraron una resistencia significativa ante *V. harveyi* a diferencia del tratamiento control (sin ácido orgánico), siendo la dosis de ácido orgánico (KDF) al 2% la que presentó la tasa más baja de vibrios, así mismo, se observó una tasa de mortalidad inferior a comparación del control al emplear las

diferentes dietas de ácidos orgánicos, obteniendo resultados significativamente más elevados en los parámetros inmunes de los camarones.

En la investigación efectuada por Reyes (2017) evaluó el efecto antimicrobiano individualmente y de forma sinérgica de ácidos orgánicos y fitoquímicos bajo condiciones *in vitro* para el control de *Vibrio parahaemolyticus*, entre sus resultados obtenidos se observó que los ácidos propiónico, butírico, nicotínico y acético mostraron inhibición microbiana del 96,88%, 96,35%, 95,80% y 93,03% respectivamente, teniendo un amplio espectro inhibitorio ante las cepas de *V. parahaemolyticus*. Por otra parte, la combinación de los extractos acéticos de los fitoquímicos junto con los ácidos propiónico y butírico presentaron un efecto sinérgico positivo al tener un amplio espectro antimicrobiano ante las cepas de *V. parahaemolyticus*. Es decir, tanto el uso de manera individual como sinérgico de los ácidos orgánicos y fitoquímicos poseen propiedades antimicrobianas sobre *V. parahaemolyticus*.

El uso de ácidos orgánicos en la dieta también ha favorecido a ejemplares de tilapia, tal y como lo evidencia el trabajo realizado por das Neves et al (2021) donde aplicó ácido fumárico en diferentes dosis en el alimento de juveniles de tilapia del Nilo, siendo la dosis de 15 g/kg de ácido fumárico con mayor efectividad, puesto que no solo incrementa el crecimiento, sino que disminuye las bacterias Gram-negativas en el intestino de los organismos. De igual manera, el estudio realizado por Reda et al (2021) reveló que al incluir 1% de ácido fórmico en el alimento balanceado para peces tilapia, minimizó los efectos causados por bacteria patógenas *Aeromonas veronii* y redujo la mortalidad.

Los antibiogramas elaborados durante este ensayo, revelaron que los halos de inhibición asociados a los ácidos orgánicos del T1 y T3 demostraron tener un gran efecto inhibitorio sobre las colonias bacterianas de vibrios, sin embargo, estos resultados difieren del T2, puesto que en el ensayo *in vitro* realizado no llegó a formar un halo de inhibición. Por su parte, Silva et al (2021) indican que los ácidos orgánicos poseen un rango intermedio de inhibición bacteriana de 8,5 mm. A su vez, Sotomayor et al (2019) demostraron que la mezcla de ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico y formaldehído fue el más eficaz al generar mayor sensibilidad en las cepas de vibrios. Igualmente, Sardar et al (2020) han reportado que el uso de sales de ácidos orgánicos tales como el acetato, propionato y butirato presentan una mayor capacidad de inhibición ante las especies de *Vibrio*. En el caso de los peces, Yilmaz et al (2018) han comprobado

en condiciones *in vitro*, que el ácido transcinámico inhibe potencialmente al patógeno de peces *Aeromonas sobria*, así como otras bacterias patógenas: *Vibrio crassostreae*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersenia ruckeri*.

Por otra parte, el uso de bacterias utilizadas para mantener la calidad del agua durante el ensayo, puede ser el factor causante de la reducción de la cantidad de colonias bacterianas (UFC) en el tratamiento control (T0), dado que los ejemplares se encontraban en un medio acuático condicionado, actuando no solo como agentes reductores de amonio, sino también como agentes antagónicos. Farzanfar (2006) menciona que, la adición de una mezcla probiótica en sistemas de producción intensiva mejora la calidad de agua tanto en los cultivos de crustáceos como en los cultivos de peces al minimizar la cantidad de materia orgánica y amoníaco (NH₃), a su vez reduce la concentración de vibrios en el agua, puesto que influye en la composición de las comunidades microbianas, actuando como antagonista ante los microorganismos patógenos del medio circundante, destacándose los *Bacillus spp.* Así mismo indica que por definición, las bacterias que se suministran en el agua de cultivo tienen una función específica y no se debe comparar con aquellos microorganismos que se añaden en el alimento balanceado. Esto coincide con Chizhayeva et al (2022), donde señalan que los probióticos añadidos directamente en el agua, mejoran la calidad de la misma, y actúan desplazando a las bacterias oportunistas del medio. Por otra parte, Dawood et al (2021) aluden que las bacterias probióticas tienden a causar antagonismo bacteriano tanto en el medio de cultivo como en el huésped, esto se debe principalmente a su mecanismo para producir sustancias antimicrobianas, además, pueden incitar al proceso de exclusión competitiva, impidiendo que los microorganismos patógenos logren desarrollar genes de resistencia. Un claro ejemplo de ello son las especies de *Bacillus spp.* que tienen la capacidad de generar metabolitos y antibióticos en contra de los patógenos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- En comparación con la carga bacteriana inicial del tratamiento control ($2,15 \times 10^5$), el ácido orgánico que tuvo un mejor efecto antimicrobiano fue el tratamiento 2 (AO2), presentando una carga bacteriana final de ($2,65 \times 10^3$), seguido del tratamiento 1 (AO1) ($2,89 \times 10^3$), y finalmente el tratamiento 3 (AO3) ($4,35 \times 10^5$).
- Sin embargo, el uso de bacterias empleadas para controlar los metabolitos tóxicos en el agua influyó de cierta manera en la carga bacteriana final de los organismos del tratamiento control durante el ensayo, obteniendo $9,45 \times 10^3$ UFC, aun así, se puede notar diferencias numéricas con los tratamientos en donde fueron empleados los ácidos orgánicos en relación al control.
- En la prevalencia de vibrios específicos en el hepatopáncreas del camarón blanco, se llegó a constatar que las colonias de *Vibrio vulnificus* estuvieron presentes en todos los tratamientos realizados incluyendo el tratamiento control (T1 y T2: 100%, T3: 93,33%, T0: 77,41%), indicando que los componentes de los ácidos orgánicos comerciales del T1 y T2 son capaces de inhibir el crecimiento de *V. alginoliticus* y *V. parahaemolyticus*, los cuales sí estuvieron presentes en el T3 (6,66%) y T0 (6,45% y 16,13 %) respectivamente.
- En el análisis microbiológico *in vitro* los resultados mostraron que las bacterias Gram-negativas son sensibles a los ácidos orgánicos del T1 y T3 con un valor intermedio.
- Al concluir el ensayo no se registró ninguna muerte de los organismos que se encontraban en los tratamientos medicados con ácidos orgánicos, dando así una supervivencia del 100% con respecto al control.

RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones donde se evalúen estudios de probióticos mezclados con ácidos orgánicos como reductores de la carga bacteriana en el *Litopenaeus vannamei*.
- Llevar a cabo un análisis donde se evalúe el efecto antimicrobiano que tienen los ácidos orgánicos combinados, como de manera individual en la dieta del camarón blanco.
- Buscar alternativas para abaratar los costos por la utilización de ácidos orgánicos en la alimentación de *Litopenaeus vannamei*.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Latif, H. M., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737951>
- Aguirre Chanta, L. E., Sánchez-Suárez, H. A., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4).
- Alfiansah, Y. R., Peters, S., Harder, J., Hassenrück, C., & Gärdes, A. (2020). Structure and co-occurrence patterns of bacterial communities associated with white faeces disease outbreaks in Pacific white-leg shrimp *Penaeus vannamei* aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68891-6>
- Amatul-Samahah, M. A., Wan Omar, W. H., Mohd Ikhsan, N. F., Amal Azmai, M. N., Zamri-Saad, M., & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports*, 18.
- Anangonó Lara, C. A. (2014). Eficiencia del uso de ácidos orgánicos en camarón. [Tesis de Grado, Universidad Superior Politécnica del Litoral]. From <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25104>
- Arenas, N. E., & Moreno Melo, V. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infection*, 22(2). doi:<https://doi.org/10.22354/in.v22i2.717>
- Busti, S., Rossi, B., Volpe, E., Ciulli, S., Piva, A., D'Amico, F., . . . Parma, L. (2020). Effects of dietary organic acids and nature identical compounds on growth, immune parameters and gut microbiota of European sea bass. *Scientific Reports*, 10(1, 21321). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78441-9>
- Cabrera Stevens, M. J. (2018). Efecto de alimentos funcionales para camarón blanco (*Penaeus vannamei*) sobre la expresión de genes asociados a la resistencia al virus de la mancha blanca (WSSV) y a una cepa toxigénica de *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND). [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. From http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2832/cabrera_m%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Carrillo Pineda, V. (2017). Estudio Cuantitativo de la carga bacteriana de vibrios en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* a partir de una infección inducida. From <https://biblio.uabcs.mx/tesis/te3906.pdf>
- Cedeño Segovia, D. S., & Mendoza Velásquez, M. M. (2020). Optimización de la calidad sensorial de una conserva de camarón (*Litopenaeus vannamei*) con tres tipos de acidulantes. [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí]. From https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1855/1/TIC_AI09D.pdf

- Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 3(2).
- Chávez Alcívar, M. D., & Llanos Fernández, K. K. (2015). Estudio de la actividad antibacteriana de diferentes ácidos orgánicos sobre distintas bacterias Gram negativas de importancia en la industria acuícola. [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. From <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/29554/1/D-76456%20Llanos%20Fern%20c3%a1ndez>
- Chen, Y.-H., & He, J.-G. (2019). Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 744-755. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.069>
- Cheng, Y., Ge, C., Li, W., & Yao, H. (2021). The Intestinal Bacterial Community and Functional Potential of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 9(9). From <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091793>
- Chizhayeva, A., Amangeldi, A., Oleinikova, Y., Alybaeva, A., & Sadanov, A. (2022). Lactic acid bacteria as probiotics in sustainable development. *Aquatic Living Resources*, 35, 10. doi:<https://doi.org/10.1051/alr/2022011>
- Chuchird, N., & Tirawat Rairat, P. R. (2015). Effect of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *SpringerPlus*, 4(440). doi:<https://doi.org/10.1186/s40064-015-1234-x>
- Correa da Silva, B., do Nascimento Vieira, F., Pedreira Mouriño, J. L., Soltes Ferreira, G., & Quadros Seiffert, W. (2012). Salts of Organic Acids Selection by Multiple Characteristics for Marine Shrimp Nutrition. *Aquaculture*, 384-387, 104-110.
- das Neves, S. V., da Silva, S. B., Costa, G. A., Correia, E. S., Santos, A. L., da Silva, L. R., & Bicudo, Á. A. (2021). Dietary supplementation with fumaric acid improves growth performance in Nile tilapia juveniles. *Animals*, 12(1), 8. doi:<https://doi.org/10.3390/ani12010008>
- Dawood Butt, U., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S., & Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 114, 263-281. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.003>
- de Souza Valente, C., & Wan, A. H. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181.
- Díaz Chacho, Á. C. (2020). “Dosificación del aditivo nufoaqua grow plus en *Litopenaeus vannamei* para contrarrestar el estrés y aumentar el crecimiento en camarones en cautiverio ubicado en la camaronera Coopas, cantón Arenillas, provincia de El Oro. [Trabajo de Titulación, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. From <http://201.159.223.180/bitstream/3317/15196/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-170.pdf>

- Duan, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, Y., & Wang, J. (2018). Dietary effects of succinic acid on the growth, digestive enzymes, immune response and resistance to ammonia stress of *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 10-17.
- Dugassa, H., & Gaetan, D. G. (2018). Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 10(2).
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A., . . . Abdel-Latif, H. M. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36-52. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>
- Fajardo, C., Martinez-Rodriguez, G., Costas, B., Mancera, J. M., Fernandez-Boo, S., Rodolfo, H., & De Donato, M. (2021). Shrimp immune response: A transcriptomic perspective. *Reviews in Aquaculture*, 14(3), 1136-1149.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(2), 149-158. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Gollas-Galván, T., Matínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., & Arvayo, M. A. (2020). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte. *Biotecnia*, XXII(1), 5-16. From <https://www.scielo.org.mx/pdf/biotecnia/v22n1/1665-1456-biotecnia-22-01-5.pdf>
- Gonzabay-Crespín, Á. N., Vite-Cevallos, H. A., Garzón-Montealegre, V. J., & Quihpe-Cordero, P. F. (2021). Análisis de la producción de camarón Unión Europea en el período 2015-2020 en el Ecuador para su exportación a la. *Polo de Conocimiento (Edición núm. 62)*, 6(9), 1040-1058.
- González González, Y. M. (2014). Efecto de la adición de ácidos orgánicos y probióticos sobre el crecimiento del camarón (*Litopenaeus vannamei*). [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Machala]. From http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1979/7/CD666_TESIS.pdf
- Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. (2021). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186(107387). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107387>
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H., & Hirono, I. (2021). Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding. *Scientific Reports*, 11(9936). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-89415-w>
- Kabir Chowdhury, M. A., Song, H., Liu, Y., Bunod, J.-D., & Dong, X.-H. (2021). Effects of Microencapsulated Organic Acid and Their Salts on Growth Performance, Immunity, and Disease Resistance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Sustainability*, 13(14).

- Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil Uthaman, S., Kumar Otta, S., Karunasagar, I., & Kooloth Valappil, R. (2020). Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 431-459.
- Lee, C., Shin, J., Feyaerts, J., Shin, J., Kim, M.-G., Gunathilaka, B. E., . . . Lee, K.-J. (2021). Effects of dietary supplementation of monobutyryl and tributyrin on growth, feed efficiency, innate immunity, digestibility and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture Nutrition*, 27(3), 771-781.
- Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., . . . Chen, L. (2018). Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(3), 381-399.
- Mahmoud Dawood, A. O., & Shunsuke Koshio, M. E. (2017). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974.
- Martín Ríos, L. D., Corrales Barrios, Y., González Salotén, M., Carrillo Farnés, O., Cabrera Alarcón, H., & Arenal Cruz, A. (2022). Principales factores que modifican el sistema inmune en camarones peneidos estrategias para un cultivo sostenible. *Revista de Producción Animal*, 34(1). From http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202022000100103
- Ng, W.-K., & Koh, C. B. (2016). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 9(4). doi:<https://doi.org/10.1111/raq.12141>
- Norouzitallab, P., Baruah, K., Vanrompay, D., & Bossier, P. (2019). Teaching Shrimps Self-Defense to Fight Infections. *Trends in biotechnology*, 37(1), 16-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.007>
- Peña Osorio, L. J., & Cuéllar-Anjel, J. (2019). Vibriosis en camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei*. [Reporte de caso, *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*]. From <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/2755/CASO%20CL%20C3%208DNICO%20LEIDY%20PE%20C3%2091A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Poom Llamas, J. J. (2018). Efecto del silenciamiento de HIF-1alfa sobre la expresión génica de enzimas antioxidantes en camarón blanco infectado con el WSSV. [Tesis de Grado, *Universidad de Sonora*]. From <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/2005/1/poomllamasjenniferjocelinel.pdf>
- Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., & Miandre, H. K. (2017). Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 65-71. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.030>

- Rajeev, R., Adithya, K. k., Kiran, G. S., & Selvin, J. (2020). Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 238-258. doi:<https://doi.org/10.1111/raq.12471>
- Reda, R. M., El-Murr, A., Elhakim, Y. A., & El-Shahat, W. (2021). *Aeromonas veronii* detection in Egyptian fish farms with summer tilapia mortality outbreaks and the role of formic acid in limiting its spread. *Aquaculture Research*, 53(3), 940-956. doi:<https://doi.org/10.1111/are.15635>
- Reyes Delgado, J. K. (2018). Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. From <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4432/1/UPSE-TBM-2018-0009.pdf>
- Reyes León, G. S. (2014). Efecto de los ácidos orgánicos y/o sus sales como aditivos en dietas de juveniles de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* sobre parámetro productivos. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Autónoma de México]. From <http://132.248.9.195/ptd2014/febrero/0708276/0708276.pdf>
- Reyes León, G. S. (2017). Efecto sinérgico antimicrobiano in vitro de ácidos orgánicos y fitoquímicos, frente a *Vibrio parahaemolyticus*, potencialmente patógenos aislados de cultivos de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. From <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3065>
- Reyes Mero, A. J. (2021). Principales agentes infecciosos asociados al cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* reportados en Ecuador durante el periodo 2010-2021. From <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/6640/1/UPSE-TBI-2021-0016.pdf>
- Rossi, B., Esteban, M. A., García-Beltran, J. M., Giovagnoni, G., Cuesta, A., Piva, A., & Grilli, E. (2021). Antimicrobial Power of Organic Acids and Nature-Identical Compounds against Two *Vibrio* spp.: An In Vitro Study. *Microorganisms*, 9(5).
- Roy, S., Bossier, P., Norouzitallab, P., & Vanrompay, D. (2020). Trained immunity and perspectives for shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2351-2370.
- Sánchez Villanueva, A. (2018). Identificación y cuantificación de *Vibrio* spp en camarón de río (*Cryphiops caementarius*) procedente de Mercado pesquero Villa María del Triunfo. From https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1684/Sanchez_A.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sardar, P., Shamna, N., & Sahu, N. P. (2020). Acidifiers in aquafeed as an alternate growth promoter: A short review. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 20(2), 353-366. doi:10.5958/0974-181X.2020.00032.3
- Silva, J., Jiménez, I., Vivas, J., Mayer, L., & Figueredo, A. (2021). Algunas experiencias usando ácidos orgánicos para optimizar el desempeño de una larvicultura comercial de camarón blanco, *Penaeus vannamei*. *El Acuicultor*, 11-19. From https://www.researchgate.net/publication/349194917_Algunas_experiencias_us

ando_acidos_organicos_para_optimizar_el_desempeno_de_una_larvicultura_comercial_de_camaron_blanco_Penaeus_vannamei

- Sivakumar, M., Vijay Amirtharaj, K. S., Chrisolite, B., Sivasankar, P., & Subash, P. (2022). Dietary organic acids on growth, immune response, hepatopancreatic histopathology and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* against *Vibrio harveyi*. *PREPRINT (Version 1) Research Square*. doi:<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2177311/v1>
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, *14*(1), 1-19.
- Ullsco Azuero, E. S., Garzón Montealegre, V. J., Quezada Campoverde, J. M., & Barrezueta Unda, S. (2021). Análisis del comportamiento económico de la exportación en el sector camaronero en el Ecuador, periodo 2015-2019. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, *4*(S1), 112-119. From <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/418/438>
- Valenzuela-Cobos, J., Vargas, C., Garcés, F., Grijalva, A., & Marcillo, R. (2020). Biocontrol of the vibriosis in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using organic acids in the feeding. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, *24*(5), 279-287.
- Velázquez Lizárraga, A. E. (2016). Identificación de genes relacionados con las rutas de señalización del sistema inmune de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) expuesto a un fertilizante enriquecido con silicio orgánico. [*Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, S.C.*]. From http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2497/velazquez_a%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Vieira, F. d., Bolivar, N. C., Chamarro Legarda, E., Dias Schleder, D., Quadros Seiffert, W., & Hayashi, L. (2017). Aditivos Alimentarios para camarones marinos: Salud y Nutrición. *Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola*, 78-105.
- Zhang, X., Lan, W., & Xie, J. (2021). Combined citric acid and rosemary extract to maintain the quality of chilled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(7). doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.15614>

8. ANEXOS



Anexo 1. Recolección de agua de camaronera para el abastecimiento de las unidades experimentales.



Anexo 2. Obtención de ejemplares de la camaronera "COODAESVIR".



Anexo 3. Peso de los ejemplares.



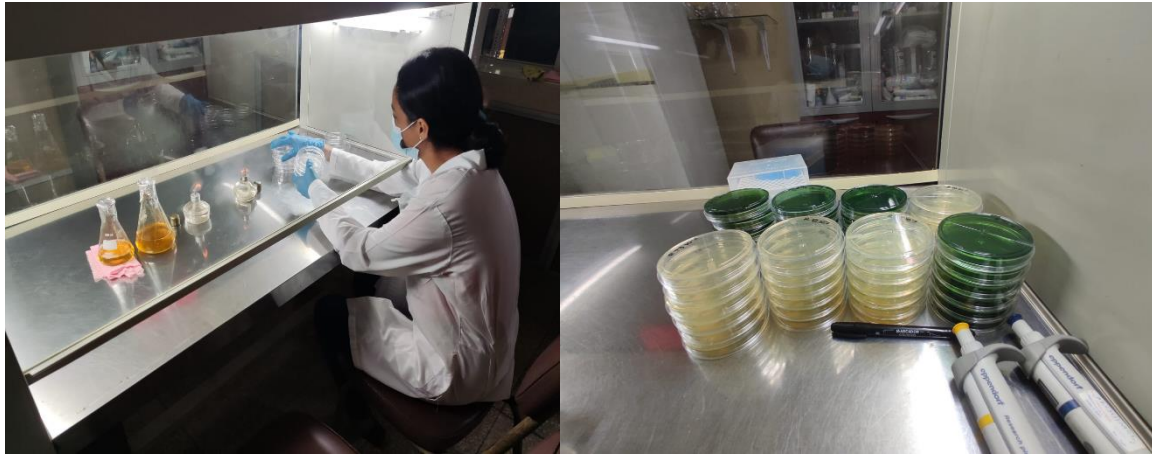
Anexo 4. Aclimatación de los ejemplares.



Anexo 5. Medición de amonio



Anexo 6. Alimento preparado con ácidos orgánicos comerciales.



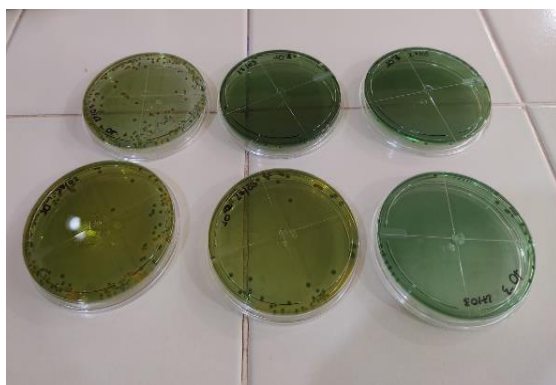
Anexo 7. Preparación de los medios de cultivo para el análisis microbiológico (agar TCBS y CHROMagar).



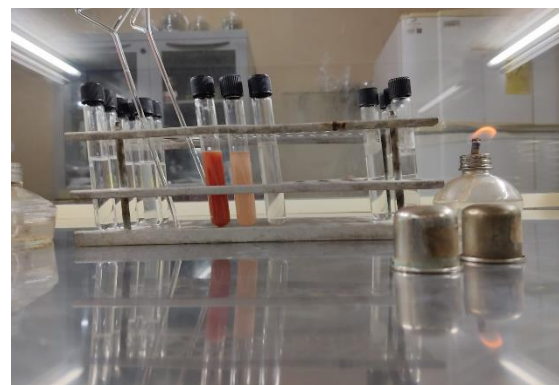
Anexo 8. Extracción de hepatopáncreas.



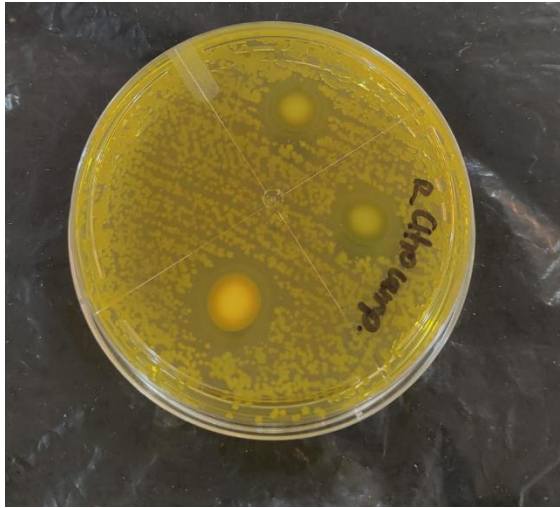
Anexo 9. Peso de las muestras de hepatopáncreas extraídas (1g).



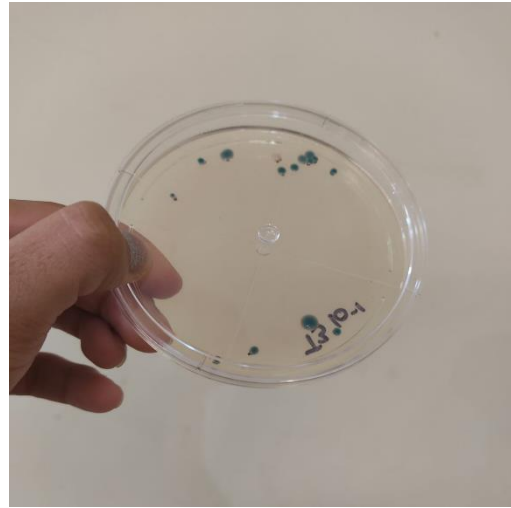
Anexo 10. Crecimientos de colonias bacterianas de *Vibrios* en agar TCBS.



Anexo 11. Diluciones seriadas.



Anexo 12. Halos de inhibición indicando que no se produce crecimiento bacteriano alrededor de los discos con AO.



Anexo 13. Crecimiento de Vibrios específicos (*V. vulnificus* y *V. alginolyticus*).