



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en la  
reducción de bacterias patógenas (*Vibrio* sp.) en el agua de piscinas  
camaroneras**

**ARIAS SAENZ FRANCESCA DANIELA  
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA  
2023**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en la  
reducción de bacterias patógenas (*Vibrio* sp.) en el agua de piscinas  
camaroneras**

**ARIAS SAENZ FRANCESCA DANIELA  
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA  
2023**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en  
la reducción de bacterias patógenas (*Vibrio* sp.) en el agua de  
piscinas camaroneras**

**ARIAS SAENZ FRANCESCA DANIELA  
INGENIERA ACUICOLA**

**VELASQUEZ LOPEZ PATRICIO COLON**

**MACHALA  
2023**

# Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en la reducción de bacterias patógenas (*Vibrio* sp.) en el agua de piscinas camaroneras

*por Francesca Arias*

---

**Fecha de entrega:** 06-may-2024 01:57p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2315536760

**Nombre del archivo:** TURNITIN\_2.pdf (1.07M)

**Total de palabras:** 11129

**Total de caracteres:** 60084

# Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en la reducción de bacterias patógenas (*Vibrio* sp.) en el agua de piscinas camaroneras

## INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	<1 %
2	<a href="https://doku.pub">doku.pub</a> Fuente de Internet	<1 %
3	<a href="https://www.slideshare.net">www.slideshare.net</a> Fuente de Internet	<1 %
4	<a href="https://rraae.cedia.edu.ec">rraae.cedia.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
5	<a href="https://dokumen.pub">dokumen.pub</a> Fuente de Internet	<1 %
6	<a href="https://www.aquahoy.com">www.aquahoy.com</a> Fuente de Internet	<1 %
7	<a href="https://apiculturapabloartigas.blogspot.com">apiculturapabloartigas.blogspot.com</a> Fuente de Internet	<1 %
8	<a href="https://ri.agro.uba.ar">ri.agro.uba.ar</a> Fuente de Internet	<1 %



Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo

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

La que suscribe, **ARIAS SAENZ FRANCESCA DANIELA**, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado **Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en la reducción de bacterias patógenas (Vibrio sp.) en el agua de piscinas camaroneras**, otorga a la **Universidad Técnica de Machala**, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

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

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

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

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



---

**ARIAS SAENZ FRANCESCA DANIELA**

0706281284

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi hermana, Génesis Arias. A lo largo de nuestra vida, hemos enfrentado juntas desafíos difíciles y hemos salido adelante. Te agradezco de todo corazón por ser mi soporte en los momentos más difíciles y por celebrar conmigo mis triunfos. Tu perseverancia y apoyo han sido como un faro de luz en mi camino. Eres un regalo preciado que Dios puso en mi vida. Gracias por impulsarme a dar lo mejor de mí y por confiar en mis capacidades incluso cuando yo dudaba. Esta tesis es también un testimonio de nuestra unión y del amor que nos impulsa mutuamente hacia el éxito.

**Francesca Arias Sáenz**



## **AGRADECIMIENTO**

Quiero comenzar expresando mi agradecimiento a Dios por todas las bendiciones recibidas También, deseo extender mi más sincero agradecimiento a mi querida hermana, Génesis Arias Sáenz, por su constante apoyo y presencia incondicional en cada etapa de mi vida. Su compañía y respaldo han sido fundamentales tanto en los momentos difíciles como en los días de alegría. No puedo sino sentir profunda gratitud por su aliento y la fuerza que siempre me ha brindado para seguir adelante con mis metas y sueños.

Asimismo, deseo agradecer de manera especial al Dr. Colón Velásquez López, mi tutor principal, por su dedicación, paciencia y valiosos consejos que fueron esenciales para alcanzar este logro académico tan anhelado. Sus enseñanzas y correcciones han dejado una huella imborrable en mi formación profesional. También agradezco a la Dra. Lita Sorroza Ochoa y a la Dra. Leonor Rivera Intriago por su contribución invaluable en la redacción de esta tesis.

A mis compañeros de estudio, les doy mi más sincero agradecimiento. Valoraré siempre las horas compartidas y las experiencias vividas juntos.

Finalmente, agradezco a la Universidad Técnica de Machala por brindarme un entorno desafiante que me permitió crecer académicamente y obtener mi título deseado. Reconozco el trabajo incansable de cada directivo y gestor que ha contribuido a crear las bases y condiciones necesarias para nuestro aprendizaje y desarrollo académico. Estoy profundamente agradecido por esta oportunidad invaluable que ha marcado un hito significativo en mi vida.

## RESUMEN

En el cultivo del camarón, el incremento en las densidades de siembra contribuye a la acumulación de materia orgánica, creando un entorno propicio para el desarrollo de microorganismos patógenos como los Vibrios. Para contrarrestar el crecimiento de Vibrios, la industria busca alternativas amigables con el medioambiente, teniendo a las levaduras marinas como una opción. El objetivo de este estudio fue analizar la influencia de microorganismos benéficos (Levaduras marinas) en la reducción de bacterias patógenas (*Vibrio sp.*) en el agua de cultivo de camarón. El experimento utilizó agua de mar esterilizada y agua de una camaronera madurada en laboratorio, en las que se inoculó diferentes concentraciones de *Vibrio sp.* y levaduras marinas en una relación 1:1 y 1: 10. En el agua de mar esterilizada, después de 2 horas de exposición, la concentración de *Vibrio sp.*, se redujo entre el 51% y 71%, relación de 1:1 y 1:10 respectivamente. En el agua de camaronera madurada en laboratorio, la reducción de *Vibrio sp.* alcanzó al 30% y 37%, relación de 1:1 y 1:10 respectivamente. El análisis de Varianza de una vía  $p < 0.05$ , demostró que los promedios entre los dos tratamientos fueron significativamente diferentes en la respuesta a la reducción de *Vibrio sp.* entre el agua de mar esterilizada y agua de camaronera madurada en laboratorio. El efecto de las levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de camaronera tuvo menor efectividad posiblemente por la presencia de materia orgánica y otros microorganismos, lo cual requiere mayor investigación para evaluar el comportamiento de *Vibrio sp.* en presencia de la levadura marina.

**Palabras clave:** Levaduras marinas, vibrios, reducción de bacterias, microorganismos

## ABSTRACT

In shrimp farming, increasing stocking densities contributes to the accumulation of organic matter, creating a conducive environment for the development of pathogenic microorganisms such as *Vibrios*. To counteract *Vibrio* growth, the industry is seeking environmentally friendly alternatives, with marine yeasts being one option. The objective of this study was to analyze the influence of beneficial microorganisms (marine yeasts) on the reduction of pathogenic bacteria (*Vibrio sp.*) in shrimp culture water. The experiment utilized sterilized seawater and water from a laboratory-matured shrimp farm, inoculating them with different concentrations of *Vibrio sp.* and marine yeasts in ratios of 1:1 and 1:10. In sterilized seawater, after 2 hours of exposure, the concentration of *Vibrio sp.* was reduced by 51% and 71% in the 1:1 and 1:10 ratios, respectively. In the laboratory-matured shrimp farm water, the reduction of *Vibrio sp.* reached 30% and 37% in the 1:1 and 1:10 ratios, respectively. One-way analysis of variance (ANOVA) with  $p < 0.05$  demonstrated that the means between the two treatments were significantly different in response to *Vibrio sp.* reduction between sterilized seawater and laboratory-matured shrimp farm water. The effect of yeast on reducing *Vibrio sp.* in shrimp farm water was less effective, possibly due to the presence of organic matter and other microorganisms, requiring further investigation to evaluate the behavior of *Vibrio sp.* in the presence of marine yeast.

**Keywords:** Marine yeasts, vibrios, bacteria reduction, microorganisms.

## INDICE

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1. Objetivo General.....	5
4.2. Objetivos específicos.....	6
4.3. Hipótesis.....	6
CAPÍTULO II.....	6
5. MARCO TEÓRICO.....	6
5.1. Descripción de la industria camaronera y su importancia económica.....	6
5.2. Vibrios en el ambiente acuático.....	8
5.3. Problemas asociados con la presencia de Vibrios.....	9
5.4. Levaduras marinas: definición, características y diversidad en el ambiente marino.	9
5.5. Levaduras marinas como agentes de control biológico de Vibrios en piscinas camaroneras.....	11
5.6. Mecanismos de acción de las levaduras para reducir la población de vibrios en piscinas camaroneras.....	13
5.7. Ventajas y desafíos del uso de levaduras marinas en la acuicultura.....	15

5.8. Estudios científicos sobre la eficacia de levaduras marinas en la reducción de Vibrios .....	16
<b>5.8.1. Metodologías empleadas para el uso de las levaduras en la disminución de Vibrios</b>	<b>19</b>
5.9. Aspectos prácticos y económicos del uso de levaduras marinas en la acuicultura .....	21
5.10. Costos asociados a la implementación de levaduras marinas .....	22
5.11. Perspectivas futuras: avances tecnológicos y nuevas investigaciones .....	24
CAPITULO III .....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Ubicación del área de estudio. ....	25
6.2. Equipos y Materiales .....	26
6.2. Metodología.....	27
<b>6.2.1. Obtención de las muestras de sedimento</b> .....	<b>27</b>
<b>6.2.2. Desinfección del área de estudio</b> .....	<b>28</b>
<b>6.2.3. Aislamiento y cultivo de levadura</b> .....	<b>28</b>
<b>6.2.5. Sostenimiento de vibrios</b> .....	<b>30</b>
<b>6.2.6. Preparación de medios de cultivo</b> .....	<b>30</b>
<b>6.2.7. Plaqueo en cajas petri</b> .....	<b>31</b>
<b>6.2.8. Diluciones seriadas</b> .....	<b>31</b>
6.2.10. Preparación de unidades experimentales.....	31

6.2.11. Diseño Experimental.....	33
6.2.12. Análisis estadístico .....	34
CAPITULO IV .....	34
7. RESULTADOS .....	34
7.1. Replicación de <i>Vibrio sp.</i> .....	34
7.5. Sostenimiento de <i>Vibrio sp</i> .....	38
7.6 Ensayos experimentales para la reducción de <i>Vibrio sp.</i> con levaduras.....	38
8. DISCUSIÓN.....	43
8.1 Aislamiento y sostenimiento de <i>Vibrio sp.</i> mediante agar TCBS .....	43
8.2 Interacción levaduras - <i>Vibrio sp.</i> .....	44
10. BIBLIOGRAFÍA.....	48

## Índice de figuras

Figure 1. Ubicación del área de estudio Fuente: Google Earth (2023) .....	26
Figure 2. Resultados de la primera siembra en el aislamiento de <i>Vibrio</i> sp. mediante agar TCBS .....	36
Figure 3. Resultados de la segunda siembra en el aislamiento de <i>Vibrio</i> sp. mediante agar TCBS .....	37
Figure 4. Resultados de la tercera siembra en el aislamiento de <i>Vibrio</i> sp. mediante agar TCBS .....	38
Figure 5. Comparación de las concentraciones de <i>Vibrio</i> sp. frente a diferentes concentraciones de levaduras marinas en agua de mar esterilizada .....	39
Figure 6. Comparación de las concentraciones de <i>Vibrio</i> sp. frente a diferentes concentraciones de levaduras marinas en agua de camarón madurada .....	41
Figure 7. Porcentajes de reducción de la concentración de <i>Vibrio</i> sp. en agua de mar esterilizada y agua de camarón madurada .....	42

## **CAPÍTULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

En los últimos años la producción de camarón en el Ecuador ha crecido significativamente debido al aumento en las densidades de siembra (Gonzabay et al., 2021). Sin embargo, la acuicultura intensiva ha creado un entorno artificial que involucra la adición de grandes cantidades de alimento; factor que influye en la formación de materia orgánica que se acumula en el sedimento, esto, a su vez, estimula la proliferación de diversos microorganismos, tanto patógenos como oportunistas (Parrado et al., 2014).

La prevalencia de enfermedades bacterianas en el cultivo de camarón ha llevado a la utilización de agentes terapéuticos, lo que ha generado la aparición de cepas bacterianas que han desarrollado resistencia a los antibióticos (Luna G. et al., 2003). Por esta razón, las levaduras marinas se presentan como una opción sostenible para tratar enfermedades ambientales. Su inclusión en las piscinas de cultivo de camarones puede prevenir la aparición de enfermedades ocasionadas por *Vibrios*, lo que, a su vez, favorece la salud de los camarones y la calidad del agua (Sahandi et al., 2019).

Las levaduras marinas podrían inhibir el crecimiento de *Vibrios* de varias formas. Un ejemplo es el efecto inhibitorio de las levaduras es a través de la producción de compuestos antimicrobianos que son tóxicos para los *Vibrios*, lo que limita su crecimiento y proliferación en el agua de las piscinas. Además, estas levaduras podrían competir directamente con los *Vibrios* por los nutrientes necesarios para su supervivencia, lo que reduce su disponibilidad y limita su crecimiento (Ayiku et al., 2020).



La efectividad de las levaduras marinas en la disminución de Vibrios en el agua de las piscinas camaroneras puede verse influenciada por diversos factores, como la concentración de levaduras, las condiciones ambientales y las prácticas de manejo de las piscinas. Por ende, es fundamental llevar a cabo investigaciones que permitan comprender mejor el potencial de las levaduras marinas en la reducción de Vibrios, asegurando así una producción camaronera sostenible y saludable (Reddy, 2017).

Adicionalmente las levaduras marinas pueden tener un impacto significativo en la reducción de vibrios en el agua de las piscinas camaroneras. Su capacidad para competir con los vibrios por los nutrientes y producir compuestos antimicrobianos puede ayudar a prevenir brotes de enfermedades y mantener la salud de los camarones. Por lo antes mencionado es importante seguir investigando y desarrollando estrategias de manejo adecuadas para aprovechar al máximo el potencial de estas levaduras en la producción camaronera (Sahandi et al., 2019).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En las piscinas camaroneras, la presencia de Vibrios y su resistencia a los antibióticos representan un problema crítico para la salud de los camarones y la garantía de la calidad alimentaria.. Esto puede acarrear una serie de consecuencias adversas, como la reducción en la producción de camarones, el aumento del riesgo de enfermedades y el incremento de los costos asociados a los tratamientos sanitarios.

La resistencia de Vibrios a los antibióticos es un fenómeno complejo y multifactorial. Según Loo et al. (2020), los vibrios presentes en el ambiente acuático y en los organismos marinos, han desarrollado una serie de mecanismos de resistencia a lo largo del tiempo debido a la exposición continua a antibióticos utilizados en la acuicultura, esto incluye la capacidad de adquirir y transmitir genes de resistencia (Mohamad et al., 2019), así como la formación de biofilms que los protegen de la acción de los antibióticos (Thompson et al., 2018). La resistencia de Vibrios a los antibióticos plantea un desafío significativo en el control de enfermedades bacterianas en las piscinas camaroneras.

Así mismo, se ha reportado que las piscinas camaroneras proporcionan un entorno propicio para la proliferación de Vibrios debido a las condiciones de salinidad y temperatura, pueden contaminar el agua y los camarones, lo que aumenta el riesgo de enfermedades bacterianas, como la vibriosis. Además, la presencia de Vibrios en las piscinas camaroneras puede dar lugar a la pérdida de camarones por enfermedades, lo que disminuye la rentabilidad de la acuicultura y puede afectar la disponibilidad de camarones en el mercado.

De lo anteriormente descrito, se deduce que la proliferación de Vibrios en las piscinas camaroneras puede tener graves consecuencias, tanto económicas como de salud pública, en términos económicos, provocando la pérdida de lotes enteros de camarones, costosos tratamientos profilácticos para los camarones enfermos y un aumento en los costos de

producción. La contaminación del agua con productos químicos tóxicos y la proliferación descontrolada de bacterias como los Vibrios amenazan este equilibrio y la vida marina.

Consecuentemente, desde el punto de vista de la salud pública, la contaminación de los camarones con Vibrios resistentes a los antibióticos representa un riesgo para los consumidores, ya que pueden contraer enfermedades transmitidas por alimentos si no se toman las medidas adecuadas de control y manipulación. Todo se resume en un grave problema de salud animal con efectos en la salud pública del ser humano y graves consecuencias económicas.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La problemática planteada anteriormente permite entender la necesidad de encontrar métodos de cultivo de camarón amigables con la naturaleza para reducir la presencia de Vibrios en el agua de cultivo, teniendo como fundamento la necesidad apremiante de preservar valiosos ecosistemas acuáticos, los mares y océanos, hogar de una inmensa biodiversidad, desempeñan un papel crucial en el equilibrio de nuestro planeta.

Adicionalmente, es necesario ejecutar estudios para innovar los métodos convencionales de cultivo, que comúnmente están asociados al uso de antibióticos y productos químicos que, lamentablemente, pueden tener efectos adversos en los ecosistemas acuáticos, perturbando la cadena alimentaria y dañando a otras especies marinas no objetivo. Nuevas investigaciones son también necesarias para contribuir con la reducción de la contaminación ambiental que es perjudicial para el medio ambiente y, a la larga, también lo es para la salud de los seres humanos que dependen de estos ecosistemas para obtener alimentos y recursos.

Además, investigaciones con el uso de productos naturales para la reducción de Vibrios permitiría mitigar los impactos ambientales negativos, promover la seguridad alimentaria, ya que la presencia de Vibrios resistentes a los antibióticos en los camarones representa un riesgo significativo para la salud pública. Identificar alternativas de manejo con mecanismos de control biológico es significativamente importante para la producción sostenible de productos marinos no contaminados con bacterias patógenas que pueden dar lugar a enfermedades transmitidas por alimentos que ponen en peligro la integridad sanitaria de los consumidores.

Cumplir con las regulaciones ambientales y de seguridad alimentaria es otra razón de peso para adoptar investigaciones con enfoques más amigables con la naturaleza. Las normativas cada vez más estrictas requieren que las empresas cumplan con estándares ambientales y de calidad de los productos. La adopción de métodos sostenibles puede ayudar a cumplir con estas regulaciones y evitar sanciones legales y problemas comerciales. Es por esto que es importante realizar estudios en búsqueda de alternativas sostenibles que permitan la reducción de bacterias patógenas en el cultivo de camarón, y un ejemplo de esto es la utilización de levaduras planteadas en esta propuesta de investigación.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Analizar la influencia de microorganismos benéficos (Levaduras marinas) en la reducción de bacterias patógenas (*Vibrio sp.*) en el agua de piscinas camaroneras.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de las levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de mar esterilizada y agua de camaronesa madurada en laboratorio.
- Determinar la diferencia en los porcentajes de reducción de la concentración de *Vibrio sp.* con el inóculo de levaduras en agua de mar esterilizada y agua de camaronesa madurada en laboratorio.

#### **4.3. Hipótesis**

La incorporación de levaduras marinas extraídas del sedimento de manglar en el agua de piscinas camaroneras resultará en una reducción significativa de la concentración de *Vibrio sp.*

## **CAPÍTULO II**

### **5. MARCO TEÓRICO**

#### **5.1. Descripción de la industria camaronera y su importancia económica.**

Según Sánchez & Palma (2023), la industria camaronera desempeña un papel fundamental en muchas regiones costeras de todo el mundo, ya que se dedica a la cría y cultivo controlado de camarones en estanques y sistemas acuíferos para obtener camarones destinados al consumo comercial, en las últimas décadas, esta industria ha experimentado un notable crecimiento debido a la gran demanda mundial de camarones y su valor como una fuente importante de proteína de alta calidad.

La industria camaronera tiene una importancia económica multifacética que abarca varios aspectos.

- La generación de empleo: La producción de camarón involucra una cadena de valor que incluye actividades como preparación de estanques, reproducción, cultivo y cosecha, estas etapas generan empleos en las zonas rurales y costeras, contribuyendo al desarrollo económico local y mejorando la calidad de vida de las comunidades.
- Exportación e ingresos: Los camarones cultivados tienen una gran demanda en todo el mundo, lo que hace que su exportación sea una importante fuente de ingresos para los países productores, esta actividad ayuda a equilibrar la balanza comercial y fortalecer la economía nacional.
- El desarrollo de la infraestructura ha sido impulsado por la industria del camarón, que ha establecido sistemas de estanques, centros de reproducción y laboratorios de investigación, no solo beneficia a esta actividad económica en particular, sino que también puede ser utilizada por otras actividades económicas y fomentar más inversiones en la región.
- La búsqueda de prácticas más eficientes y sustentables ha generado avances en innovación y tecnología dentro de la industria, se evidencia en la adopción de sistemas como la recirculación de agua, el mejoramiento genético y el uso de alimentos balanceados.
- Impacto en la cadena alimentaria: la producción de camarones contribuye al suministro de proteína animal en la dieta humana, lo que ayuda a abordar la seguridad alimentaria en muchas partes del mundo.

- Diversificación económica: La industria del camarón puede servir como una fuente adicional de ingresos y ayudar a diversificar la economía más allá de las actividades tradicionales, especialmente en países con bases económicas ya diversificadas.

La inversión en la industria del camarón puede impulsar el desarrollo rural y promover la modernización de las regiones menos desarrolladas, mejorando la infraestructura local y elevando la calidad de vida en las comunidades cercanas (Sánchez & Palma, 2023).

## **5.2. Vibrios en el ambiente acuático**

La "vibriosis" es una enfermedad común en la acuicultura, especialmente en los cultivos de camarón, esta enfermedad es causada por bacterias del género *Vibrio sp*, las cuales son gramnegativas y tienen flagelos que les permiten moverse. Estas bacterias se encuentran principalmente en ambientes con altos niveles de materia orgánica. Se sabe que son bacteria mesófilas y quimioorganotrofas, lo cual significa que obtienen energía a través de la fermentación metabolismo (Aguilera et al., 2019).

Los Vibrios son microorganismos marinos que se encuentran en todas partes y pueden multiplicarse fácilmente en ambientes de cultivo, especialmente cuando las condiciones no son ideales, las infecciones bacterianas asociadas con estos pueden afectar a los camarones y causar síntomas como debilidad, falta de apetito, cambio de coloración anormal e incluso la muerte significativa dentro del cultivo, estos problemas sanitarios pueden llevar a pérdidas económicas importantes para los productores acuícolas (Mendoza & Ordinola, 2022).

Los factores que influyen en la proliferación de Vibrios incluyen la calidad del agua, la temperatura, la densidad de cultivo y las prácticas de manejo, los productores de camarones abordan estos problemas a través de medidas como bioseguridad y buenas prácticas

acuícolas. Estas acciones implican realizar monitoreo regular para evaluar la calidad del agua, ajustar las condiciones ambientales según sea necesario, seleccionar dietas equilibradas y usar sistemas adecuados de filtración (Rubio et al., 2020).

### **5.3. Problemas asociados con la presencia de Vibrios.**

En muchas regiones del mundo, la acuicultura de camarón desempeña un papel económico importante al proporcionar tanto alimentos como empleo, sin embargo, enfrenta diversos obstáculos relacionados con los microorganismos patógenos, especialmente las bacterias *Vibrio*, pueden tener consecuencias negativas para la salud y el rendimiento de los camarones, por lo que es crucial manejar esta situación cuidadosamente a fin de garantizar la sostenibilidad y rentabilidad en esta industria (Aguirre et al., 2021).

### **5.4. Levaduras marinas: definición, características y diversidad en el ambiente marino.**

Las levaduras marinas son microorganismos unicelulares que se encuentran en ambientes marinos, a diferencia de las levaduras terrestres, que a menudo se asocian con la fermentación y la producción de alimentos como el pan y la cerveza, las levaduras marinas han evolucionado para prosperar en ambientes acuáticos, donde cumplen roles diversos en los ecosistemas marinos (Burini et al., 2021).

Las levaduras marinas comparten algunas características generales con otras levaduras, pero también presentan adaptaciones específicas al entorno acuático:

- Unicelulares: Son microorganismos unicelulares que varían en tamaño y forma, pero generalmente son más pequeños que muchas células bacterianas.



- Heterotróficos: Las levaduras marinas son heterotróficas, lo que significa que obtienen su energía y nutrientes de materia orgánica en descomposición.
- Reproducción: Se reproducen asexualmente mediante gemación, donde una nueva célula "yema" se forma a partir de la célula madre.
- Metabolismo: Muchas levaduras marinas tienen la capacidad de fermentar compuestos orgánicos para obtener energía.
- Adaptaciones Marinas: Algunas levaduras marinas pueden resistir la alta salinidad y las variaciones en la temperatura y la presión que se encuentran en los ambientes marinos (Burini et al., 2021).

#### Diversidad en el Ambiente Marino:

Las levaduras marinas de acuerdo a Hernández et al. (2018), exhiben una diversidad sorprendente en términos de especies y funciones ecológicas en el ambiente marino:

- Ecosistemas Varios: Se pueden encontrar en una variedad de hábitats marinos, como aguas superficiales, sedimentos marinos, desembocaduras de ríos, estuarios y áreas de manglares.
- Ciclo de Nutrientes: Desempeñan un papel importante en el ciclo de nutrientes marinos al contribuir a la descomposición de materia orgánica, liberando nutrientes esenciales para otros organismos.
- Simbiosis: Algunas levaduras marinas establecen relaciones de simbiosis con otros organismos, como corales, algas y esponjas, ayudando en la nutrición y la salud de estos organismos.

- Producción de Metabolitos: Algunas levaduras marinas producen metabolitos bioactivos con potencial aplicaciones farmacológicas y biotecnológicas.
- Interacciones Ecológicas: Las levaduras marinas pueden interactuar con bacterias, otros hongos y microorganismos en el ecosistema marino, influyendo en la estructura y función de las comunidades microbianas.

La diversidad y el papel ecológico de las levaduras marinas en los ecosistemas acuáticos aún están siendo investigados, sin embargo, su presencia y su potencial para influir en procesos ecológicos clave hacen que sean objetos de interés en la investigación científica y en aplicaciones prácticas, como la biorremediación y el control biológico en la acuicultura (Hernández, 2021).

#### **5.5. Levaduras marinas como agentes de control biológico de Vibrios en piscinas camarонерas.**

Las levaduras marinas se han convertido en una prometedora opción para el control biológico de Vibrios patógenos tanto en piscinas camarонерas como en otros entornos acuáticos, estas son microorganismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi, y presentan características beneficiosas que pueden ser utilizadas para disminuir la propagación de bacterias patógenas dentro de los sistemas de cultivo (Aguirre et al., 2023). A continuación, se detallarán los puntos clave sobre este método:

Mecanismos de Control Biológico:

Las levaduras marinas tienen la capacidad de ejercer control biológico sobre Vibrios patógenos a través de varios mecanismos:

- Competencia por Nutrientes: Al introducir levaduras marinas beneficiosas en el entorno acuático, se crea una competencia por los nutrientes necesarios para el crecimiento de los Vibrios patógeno, esto puede limitar la disponibilidad de recursos esenciales y reducir la capacidad de los Vibrios para multiplicarse.
- Producción de Metabolitos: Algunas levaduras marinas tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, estos compuestos pueden interferir con procesos metabólicos vitales de los Vibrios y reducir su virulencia.
- Interferencia en la Adhesión: Algunas levaduras marinas pueden competir por los sitios de adhesión en las superficies biológicas y físicas en el entorno acuático, puede dificultar la capacidad de los Vibrios para adherirse a las superficies y, por lo tanto, limitar su capacidad de colonización y proliferación (Morales et al., 2022).

#### Ventajas del Uso de Levaduras Marinas:

- Ambientalmente Amigables: Las levaduras marinas son organismos naturales y no tóxicos, lo que hace que su uso sea una alternativa respetuosa con el medio ambiente.
- Baja Resistencia: A diferencia de los antibióticos, los microorganismos patógenos pueden desarrollar resistencia con el tiempo, las levaduras marinas ofrecen una solución que es menos propensa a la resistencia.
- Manejo Sostenible: El uso de levaduras marinas en el control biológico es parte de un enfoque de manejo sostenible de enfermedades en la acuicultura, minimizando la dependencia de productos químicos.

- Reducción de Estrés: Al mantener la población de Vibrios patógenos bajo control, se reduce el estrés en los camarones cultivados, lo que puede contribuir a un mejor crecimiento y rendimiento (Morales et al., 2022).

El uso de levaduras marinas como agentes de control biológico de Vibrios patógenos en piscinas camaroneras es una estrategia prometedora que puede contribuir a la salud y el rendimiento de los cultivos, al tiempo que reduce la dependencia de productos químicos, sin embargo, se requiere investigación y monitoreo continuos para optimizar su efectividad y comprender mejor su impacto en los ecosistemas acuáticos.

#### **5.6. Mecanismos de acción de las levaduras para reducir la población de vibrios en piscinas camaroneras**

Según Palma (2021), la aplicación de levaduras con propósitos probióticos se convierte en una opción viable para mitigar afecciones patológicas, no obstante, se han identificado distintos modos de operación que antagonizan patógenos, agilizan el proceso de digestión, potencian la respuesta inmunológica, generan diversas enzimas relacionadas con la hidrólisis proteica y contribuyen a la mejora de la calidad del medio acuícola., algunos de los mecanismos de acción incluyen:

- Competencia por nutrientes y espacio: Las levaduras marinas pueden competir con las bacterias Vibrio por los nutrientes y el espacio disponibles en el entorno acuático, al consumir nutrientes, las levaduras limitan los recursos disponibles para el crecimiento de los Vibrio, lo que puede reducir su proliferación.
- Producción de metabolitos antimicrobianos: Algunas levaduras marinas son capaces de producir compuestos antimicrobianos, como péptidos, enzimas y ácidos orgánicos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y la supervivencia de las bacterias

Vibrio, estos metabolitos pueden interferir con las funciones vitales de los patógenos, debilitándolos o eliminándolos.

- Modificación del ambiente: Las levaduras pueden cambiar el entorno microbiano alrededor de ellas al consumir nutrientes y liberar productos metabólicos, esto puede alterar las condiciones favorables para el crecimiento de los Vibrio, haciendo que sea más difícil para las bacterias patógenas mantenerse y reproducirse.
- Biofilm competitivo: Las levaduras pueden formar biofilms en las superficies del entorno acuático, incluyendo las superficies de las piscinas camaroneras, estos biofilms pueden actuar como una barrera física que dificulta la adhesión y el crecimiento de las bacterias Vibrio en esas superficies.
- Estimulación de respuestas inmunitarias: Al interactuar con el sistema inmunológico de los organismos acuáticos, algunas levaduras marinas pueden estimular respuestas inmunitarias que aumentan la resistencia de los camarones y otros organismos a las infecciones por Vibrio.
- Competencia química: Las levaduras pueden liberar productos químicos y metabolitos que pueden interferir con la señalización química de las bacterias Vibrio, reduciendo su capacidad de comunicación y formación de colonias.

Ayiku et al., (2020) afirma que el contenido de carbohidratos complejos (MOS) de la levadura en el intestino inhibe la colonización de patógenos mediante el bloqueo de las moléculas de reconocimiento de patrones y sirve como sitio de unión del patógeno potencial en lugar de colonizar directamente las paredes intestinales. Efectos probados han demostrado que (MOS) puede mejorar el rendimiento del crecimiento de los peces, la morfología

intestinal, modulando la microbiota intestinal, y elevando la inmunidad y la capacidad de resistencia al estrés

### **5.7. Ventajas y desafíos del uso de levaduras marinas en la acuicultura**

El uso de levaduras marinas en la acuicultura presenta varias ventajas que deben considerarse al implementar esta estrategia, una de las ventajas es que las levaduras marinas tienen el potencial de competir con patógenos, como las bacterias *Vibrio*, ayudando a reducir la prevalencia de enfermedades. Estas pueden estimular las respuestas inmunológicas de los organismos acuáticos, fortaleciendo su resistencia frente a enfermedades, al participar en la descomposición de materia orgánica, las levaduras contribuyen a mantener la calidad del agua. Algunas levaduras marinas producen enzimas que pueden facilitar la digestión y el aprovechamiento de nutrientes por parte de los camarones, mejorando su crecimiento; la utilización de levaduras marinas como alternativa a productos químicos puede alinear la acuicultura con prácticas más sostenibles y amigables con el medio ambiente (Valentina et al., 2020).

Como desafíos tenemos que identificar las levaduras marinas más efectivas para el control de patógenos y otros beneficios requiere investigación y pruebas exhaustivas, pueden interactuar con otros microorganismos presentes en el ambiente, lo que puede tener impactos imprevistos en el ecosistema. Las levaduras pueden necesitar tiempo para adaptarse a las condiciones específicas de una piscina camaronera, lo que puede afectar su eficacia inicial, se debe determinar la dosis adecuada y la forma de aplicación de las levaduras es crucial para asegurar que tengan el efecto deseado sin causar problemas adicionales. La implementación de levaduras marinas puede implicar costos asociados a la producción, aplicación y monitoreo, lo que debe considerarse en términos de viabilidad económica, la efectividad de

las levaduras marinas puede variar según las condiciones ambientales y las cepas utilizadas, lo que puede resultar en resultados inconsistentes (Sarlin & Philip, 2016).

### **5.8. Estudios científicos sobre la eficacia de levaduras marinas en la reducción de Vibrios**

De acuerdo con Berrocal & Weil (2022), la búsqueda constante de métodos efectivos y sostenibles para controlar enfermedades en la acuicultura ha llevado a la exploración de alternativas biológicas, entre estas, el empleo de levaduras marinas ha emergido como un enfoque prometedor. Los vibrios, género de bacterias patógenas, representan una amenaza significativa para los cultivos acuícolas, y su control es esencial para asegurar la salud y la producción sostenible.

En este contexto, numerosos estudios científicos han centrado su atención en investigar la eficacia de las levaduras marinas como agentes de reducción de Vibrios, estos estudios abordan diversos aspectos, desde los mecanismos de acción subyacentes hasta los beneficios potenciales en términos de mitigación de enfermedades y mejora del entorno acuático. Esta revisión introductoria presenta una visión general de la relevancia y el alcance de dichos estudios, destacando su contribución al avance en la comprensión y la aplicación de las levaduras marinas en la gestión de la salud en la acuicultura (Sarlin & Philip, 2016).

Para la propagación de levaduras autóctonas del sur del Ecuador se tiene como referencia a los autores Solorzano & Velásquez (2021), llevaron a cabo un estudio sobre la propagación de levaduras autóctonas en el sur del Ecuador, centrándose en la asimilación de levaduras marinas como alimento para el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). En su investigación, aislaron levaduras marinas nativas de un manglar en la costa de Machala, El Oro.

Estas levaduras se purificaron en aproximadamente 10 días en el laboratorio, siguiendo un procedimiento que involucró la recolección de sedimento de manglar, la dilución en solución de peptona, la incubación en agar Saboraud y la transferencia de unidades formadoras de colonias a un caldo de levadura. Las post-larvas alimentadas con diversas concentraciones de levaduras mostraron una eficiencia de absorción notable.

El estudio realizado por Reyes et al., (2021) se centró en evaluar la actividad probiótica y la capacidad antimicrobiana de la levadura marina *Yarrowia lipolytica* frente a *Vibrio parahaemolyticus*. Las cepas de levadura *Yarrowia lipolytica* D1 y N6 se aislaron de la salina "Sea Water Solar Evaporation" en Guerrero Negro, Baja California Sur, México. Estas cepas se cultivaron en caldo de dextrosa de peptona de levadura (YPD) con cloranfenicol. Luego, se realizaron cultivos frescos en YPD durante 48 horas a 30°C con aireación constante.

Este proceso se repitió tres veces para construir curvas de crecimiento. Se seleccionó el cultivo en el momento álgido para el recubrimiento de la placa y se determinó el tiempo de cultivo necesario para alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Las bacterias utilizadas fueron patógenos oportunistas en la acuicultura de peces: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela*. Se cultivaron a 28°C durante 24 horas. Los resultados mostraron que las cepas D-1 y N-6 de *Y. lipolytica* pueden ser potenciales probióticos para los peces al demostrar actividad antirradical libre, antimicrobiana y mejoras en las respuestas inmunoprotectoras frente a la infección por *Vibrio parahaemolyticus*.

En el estudio realizado por (Caruffo et al., 2015) se evaluaron 15 cepas de levadura aisladas del intestino de peces para probar su capacidad probiótica contra *Vibrio anguillarum*. El modelo de infección en larvas de pez cebra con *V. anguillarum* mostró una mortalidad rápida ( $\geq 50\%$ ) 5 días después de la provocación por inmersión. Sin embargo, trece de las quince cepas de levadura aumentaron el porcentaje de supervivencia de las larvas después



del desafío, lo que sugiere su potencial como probióticos para reducir la mortalidad asociada con la infección por *V. anguillarum*, posiblemente mediante la colonización intestinal. Este hallazgo destaca la importancia de investigar cepas locales de levadura como posibles agentes probióticos en la protección contra enfermedades bacterianas en la acuicultura.

Ayiku et al., (2020) llevo a cabo un estudio para evaluar los efectos de diferentes niveles de suplementación con cultivos de levadura (CL) al 0% (CL 0%), 1% (CL 1%) y 2% (CL 2%) sobre el crecimiento, la microflora, la respuesta inmunitaria y la resistencia a la infección por *Vibrio harveyi* en *Litopenaeus vannamei*. Después de 8 semanas de prueba de alimentación, los resultados mostraron una mejora significativa en el peso final, la tasa de crecimiento específico, la tasa de supervivencia y el bajo índice de conversión alimenticia en los grupos CL que en el control. A nivel de género, las bacterias patógenas oportunistas *Vibrio* disminuyeron significativamente, mientras que las bacterias beneficiosas *Pseudoalteromonas* aumentaron en el grupo CL (2%). La prueba de desafío de los grupos CL mostró significativamente una mejor respuesta inmunitaria de los camarones frente a las infecciones por *V. harveyi*, registrando el grupo CL (2%) el mayor porcentaje de supervivencia (70%). El presente estudio demostró que la suplementación con CL (2%) puede mejorar el crecimiento, la microbiota intestinal, la morfología intestinal y la respuesta inmunitaria frente a las infecciones por *V. harveyi* en *L. vannamei*.

Yun et al., (2021) evaluaron el potencial de una levadura roja marina, *Rhodospiridium sphaerocarpum* para la inhibición de *Vibrio sp.* en agua de camaronera, donde llevaron a cabo un experimento tomando una muestra de agua de cultivo de un estanque de camarones que sufrió un brote de Vibriosis y se calculó el número de células de *Vibrio* mediante placas TCBS. Luego se prepararon muestras de agua de cultivo tratadas con

glucosa y extracto de levadura, se dividieron en grupos experimental y de control. Al grupo experimental se agregó una concentración aproximada de  $2 \times 10^7$  UFC/ml de levaduras, esto fue evaluado a las 48 h. El número de células de *Vibrio* en el agua de cultivo del grupo de control fue de aproximadamente  $4,6 \times 10^4$  UFC/ml al inicio y disminuyó ligeramente a  $3,8 \times 10^4$  UFC/ml a las 48 h, mientras que el número de células *Vibrio* en el agua de cultivo del grupo experimental disminuyó de  $4,6 \times 10^4$  UFC/ml al inicio a  $6,8 \times 10^3$  UFC/ml a las 48 h. que era solo el 18% de las células *Vibrio* en el grupo de control (CG) en el mismo momento. Los autores concluyeron que este resultado demostró que la existencia de células de levadura *Rhodospiridium sphaerocarpum* inhibía la supervivencia de las células de *Vibrio* en el agua de cultivo.

#### **5.8.1. Metodologías empleadas para el uso de las levaduras en la disminución de Vibrios**

Las metodologías empleadas en estudios científicos por parte de Nimrat et al. (2019), para el uso de levaduras en la disminución de Vibrios varían según los objetivos específicos de investigación y las condiciones experimentales, a continuación, se presentan algunas de las metodologías comunes que se han utilizado en estudios para evaluar la eficacia de las levaduras en la reducción de Vibrios:

- Aislamiento y selección de levaduras: Se recolectan muestras de agua, sedimentos u organismos acuáticos y se aíslan levaduras marinas, estas levaduras son seleccionadas en función de su capacidad para inhibir Vibrios en pruebas preliminares.
- Pruebas de antagonismo in vitro: Se realizan pruebas de laboratorio donde las levaduras y los Vibrios se cultivan en condiciones controladas, se evalúa la capacidad

de las levaduras para inhibir el crecimiento de los Vibrios en medios de cultivo específicos.

- Pruebas de co-cultivo: Se establecen cultivos mixtos de levaduras y Vibrios en sistemas acuáticos simulados, como biorreactores o sistemas de flujo continuo, se monitorea la dinámica de las poblaciones y se evalúa si las levaduras tienen un efecto inhibitorio sobre los Vibrios.
- Ensayos en sistemas acuáticos reales: Se aplican levaduras en sistemas acuáticos reales, como piscinas camaroneras o estanques de cultivo, y se monitorea la población de Vibrios a lo largo del tiempo, se miden parámetros como la carga bacteriana, la salud de los organismos acuáticos y la calidad del agua.
- Análisis de metabolitos: Se investiga la producción de metabolitos antimicrobianos por parte de las levaduras y su capacidad para inhibir directamente los Vibrios. Se utilizan técnicas de cromatografía y espectrometría para identificar y cuantificar los compuestos producidos.
- Estudios de expresión genética: Se analiza la expresión de genes en las levaduras marinas que pueden estar involucrados en la inhibición de Vibrios, esto puede proporcionar información sobre los mecanismos moleculares subyacentes.
- Pruebas en condiciones in vivo: Se realizan pruebas en organismos acuáticos, como camarones, donde se administra levadura a través de la dieta o el agua de cultivo, se evalúa el impacto en la resistencia a infecciones por Vibrios y en la salud general de los organismos.

- Análisis microbiológico y molecular: Se utilizan técnicas microbiológicas, y moleculares para cuantificar la población de Vibrios y levaduras, así como para investigar interacciones a nivel genético y molecular.

Estas metodologías se utilizan de manera complementaria para abordar los diversos aspectos de la relación entre levaduras y Vibrios en entornos acuáticos, cada enfoque proporciona información valiosa para comprender los mecanismos de acción y la eficacia potencial de las levaduras en la disminución de Vibrios en la acuicultura.

### **5.9. Aspectos prácticos y económicos del uso de levaduras marinas en la acuicultura**

La implementación de levaduras marinas en la acuicultura involucra consideraciones prácticas y económicas que son fundamentales para evaluar la viabilidad y eficacia de esta estrategia, en lo práctico se debe identificar y seleccionar las cepas adecuadas de levaduras marinas, tomando en cuenta aquellas con propiedades probióticas y capacidad de inhibición de patógenos.

Determinar la dosis óptima de levaduras y la frecuencia de aplicación en el sistema acuícola es esencial para lograr los resultados deseados, deben ser compatibles con otros enfoques de manejo acuícola y productos químicos utilizados en el sistema. Decidir si las levaduras se administrarán a través del agua de cultivo, la alimentación de los organismos acuáticos o alguna otra vía, y cómo se aplicarán de manera efectiva, se debe establecer un plan de monitoreo constante para evaluar la eficacia de las levaduras y realizar ajustes en la dosificación o la aplicación según sea necesaria (Nimrat et al., 2019).

Para los aspectos económicos hay que evaluar los costos asociados con la producción de las levaduras marinas, incluyendo medios de cultivo, equipamiento, mano de obra y otros

insumos, además de considerar los gastos iniciales para establecer la producción de levaduras, que pueden incluir la adquisición de equipo de laboratorio e instalaciones adecuadas. Evaluar los beneficios económicos derivados del uso de levaduras, como la reducción de costos de medicamentos y productos químicos para el control de enfermedades, así como el aumento en la productividad y la salud de los organismos acuáticos. Realizar un análisis financiero exhaustivo para determinar si los beneficios esperados superan los costos asociados con la implementación de las levaduras marinas, estimando el tiempo requerido para recuperar la inversión inicial y comenzar a obtener ganancias a través de la mejora de la productividad y la reducción de pérdidas. Considerar factores externos como fluctuaciones en los precios de los insumos, cambios en la demanda del mercado y regulaciones gubernamentales que puedan impactar la viabilidad económica (Sarlin & Philip, 2016).

#### **5.10. Costos asociados a la implementación de levaduras marinas**

Según Hernández et al. (2018), la implementación de levaduras marinas en la acuicultura conlleva diversos costos asociados a la producción, aplicación y monitoreo, estos costos pueden variar dependiendo de factores como el tamaño de la operación acuícola, la región geográfica y los métodos de aplicación utilizados. A continuación, se presentan algunos de los costos típicos que pueden estar involucrados:

- Investigación y Desarrollo: Los gastos relacionados con la investigación y desarrollo para identificar cepas de levaduras eficaces, estudiar sus mecanismos de acción y optimizar su producción pueden ser significativos.
- Infraestructura y Equipamiento: Establecer un laboratorio y/o instalaciones de producción para cultivar levaduras marinas puede requerir inversión en equipos de cultivo, fermentación y esterilización, así como en instalaciones de control de calidad.

- Medios de Cultivo: Los medios de cultivo para propagar levaduras pueden constituir un gasto importante, estos medios pueden incluir ingredientes como nutrientes, sustratos y suplementos específicos para el crecimiento de las levaduras.
- Personal: Los salarios y beneficios para el personal involucrado en la producción, monitoreo y aplicación de levaduras marinas deben ser considerados.
- Producción de Levaduras: Los costos operativos para mantener cultivos de levaduras marinas incluyen energía, agua, suministros de laboratorio, entre otros.
- Formulación y Aplicación: Si las levaduras se aplican a través de la alimentación, se deben desarrollar formulaciones adecuadas y considerar los costos asociados con la producción de alimentos con levaduras incorporadas.
- Monitoreo y Pruebas: Establecer un programa de monitoreo para evaluar la eficacia de las levaduras y ajustar su dosificación según sea necesario implica gastos en pruebas de laboratorio y análisis.
- Capacitación: Capacitar al personal en las técnicas de producción, aplicación y monitoreo de levaduras marinas puede requerir recursos financieros y de tiempo.
- Regulaciones y Cumplimiento: Cumplir con regulaciones ambientales y de seguridad alimentaria puede implicar costos asociados con pruebas de seguridad y aprobaciones regulatorias.
- Logística y Distribución: Si las levaduras deben ser transportadas a las instalaciones acuícolas, los costos de transporte y almacenamiento deben ser considerados.
- Seguimiento a largo plazo: Mantener un programa sostenible de aplicación de levaduras a lo largo del tiempo puede requerir inversión continua en recursos y personal.

- **Análisis de Costo-Beneficio:** Realizar análisis financiero y de costo-beneficio para evaluar si los beneficios esperados, como la reducción de enfermedades y el aumento de la producción, superan los costos asociados.

### **5.11. Perspectivas futuras: avances tecnológicos y nuevas investigaciones**

Las perspectivas futuras en relación a los avances tecnológicos y nuevas investigaciones en el uso de levaduras marinas en la acuicultura son prometedoras y abren un campo amplio de posibilidades, a medida que la industria acuícola busca métodos más sostenibles y eficientes para enfrentar desafíos como las enfermedades y la gestión ambiental, las levaduras marinas podrían desempeñar un papel crucial. El avance en la identificación y selección de cepas específicas de levaduras marinas con propiedades probióticas y antimicrobianas altamente efectivas, la ingeniería genética podría utilizarse para mejorar aún más sus características beneficiosas. Investigar y aislar compuestos metabólicos específicos producidos por levaduras que tienen efectos antimicrobianos y estimulan el sistema inmunológico de los organismos acuáticos, explorando cómo la nanotecnología puede ser utilizada para encapsular y entregar levaduras y sus metabolitos de manera más eficiente en el entorno acuático (Ochoa & Vázquez, 2004).

Se requiere comprender mejor cómo las levaduras marinas interactúan con otros microorganismos en el entorno acuático y cómo estas interacciones pueden influir en su eficacia, investigar a nivel molecular los mecanismos de acción de las levaduras marinas, incluyendo cómo compiten con patógenos y cómo estimulan respuestas inmunológicas en los organismos huéspedes.

Desarrollar métodos de producción más eficientes y escalables para levaduras marinas, lo que podría hacer que su implementación sea más viable desde el punto de vista económico, investigando la efectividad de las levaduras marinas en diferentes especies acuáticas, no solo camarones, para ampliar su aplicación en la acuicultura. Diseñar sistemas de liberación controlada que permitan la entrega continua de levaduras y sus metabolitos en el entorno acuático, utilizando modelos matemáticos y de simulación para predecir y optimizar los efectos de las levaduras marinas en entornos acuícolas. Realizar estudios a gran escala en entornos reales de acuicultura para evaluar la eficacia y los impactos a largo plazo de las levaduras marinas en la reducción de enfermedades y en la producción (Mahdy et al., 2022). Estos avances tecnológicos y nuevas investigaciones tienen el potencial de transformar la forma en que se abordan los desafíos de enfermedades y manejo ambiental en la acuicultura. A medida que se desarrolle una comprensión más profunda de los mecanismos y aplicaciones de las levaduras marinas, es posible que estas se conviertan en una herramienta fundamental para lograr una acuicultura más sostenible y resiliente (Mahdy et al., 2022).

### **CAPITULO III**

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Ubicación del área de estudio.**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, la cual se encuentra ubicada en el Cantón Machala, Provincia de El Oro, con las siguientes coordenadas: -3,2914037 y -79,9137593





*Figure 1. Ubicación del área de estudio Fuente: Google Earth (2023)*

## **Materiales**

- Cajas Petri
- Vasos de precipitación
- Recipientes plásticos
- Mechero
- Asa de Drigalski
- Envases de plástico
- Espátula
- Tubos de ensayo
- Papel aluminio
- Pipetas
- Rotuladores
- Fundas

- Mascarilla
- Mandil

### **Equipos**

- Autoclave
- Cámara de flujo
- Estufa
- Balanza
- Incubadora

### **Sustancias**

- Alcohol industrial (90%)
- Agua destilada
- Agar Saboraud
- TCBS agar
- Melaza

## **6.2. Metodología**

Para el desarrollo de la siguiente investigación se realizaron ensayos para evaluar el efecto antagónico de las levaduras marinas sobre *Vibrios sp.* en agua de mar esterilizada y agua de camarón madurada en laboratorio.

### **6.2.1. Obtención de las muestras de sedimento**

Para la siguiente investigación se obtuvieron muestras de sedimento de manglar tal como indica Solorzano-Reyes & Velásquez-López (2021), donde recolectaron muestras de 500 g

del sedimento del manglar g tomadas a 10 cm de la capa superior, que fueron colocadas en recipientes esterilizados, y cerrados herméticamente. Las muestras se mantuvieron a temperaturas entre 4 y 10°C, hasta llegar al laboratorio.

### **6.2.2. Desinfección del área de estudio**

Antes de empezar con el análisis de las muestras obtenidas, se desinfectó tanto la Cámara de flujo como también el mesón donde se colocaron las muestras, estufa y medios de cultivo, para así poder prevenir cualquier tipo de infección que se podría llegar a obtener en el laboratorio. Se utilizó alcohol industrial (90%) como desinfectante.

### **6.2.3. Aislamiento y cultivo de levadura**

Para el aislamiento y cultivo de la levadura desarrolló la secuencia de cultivo como lo indica Solorzano-Reyes & Velásquez-López (2021) donde se colocó 1 ml de solución fresca en placas de Agar Sabouraud Dextrosa y fueron incubadas a 30°C durante dos días. Al final del período de incubación y después de la aparición de las colonias microbianas, algunas de las unidades formadoras de colonias fueron transferidas a tubos de ensayo que contenían una solución concentrada de peptona. De esta forma se obtuvo el caldo de levadura primaria. Para la propagación de la levadura se realizó desde el cultivo madre de 250 ml hasta intermedios de 1 y 3 litros.

La levadura se cultivó en un medio que consistirá en una solución preparada a partir de agua destilada, donde se añadió al agua los nutrientes (superfosfato de sodio y urea), 10ml la melaza y 0.8 ml ácido muriático

### **6.2.4. Aislamiento de *Vibrio sp.* mediante agar TCBS**

La preparación del inóculo original *Vibrio sp.* (M1) se realizó en un tubo 10 ml de agua destilada con 0,02 de sal marina, en los que se incluyó un concentrado de colonias de Vibrios extraídos de una placa posteriormente propagada de Vibrio con TCBS, la cual fue sembrada con una muestra de agua del Estero Huaylá. Posteriormente, se agitó el tubo para homogenizar el contenido y fue sellado hasta la siembra en placa luego de 24 horas.

El medio de cultivo utilizado para todos los casos fue el agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa.

#### **6.2.4.1. Replicación de *Vibrio sp.* en la primera siembra.**

La siembra se realizó tomando 100 microlitros de los cuales fueron inoculados en una caja Petri. Con la ayuda de un asa de vidrio se lo extendió por toda la superficie, hasta que el inóculo se absorba en la superficie del agar. Se realizaron tres siembras: Una siembra directa, una dilución de  $10^{-1}$  y una dilución de  $10^{-2}$ .

Una vez completada la siembra, las placas fueron sostenidas a temperatura ambiente durante 24 horas.

#### **6.2.4.2. Replicación de *Vibrio sp.* en la segunda siembra.**

La segunda siembra se realizó tomando 100 microlitros del inóculo M1 después de 48 horas de haber sido preparado. El inóculo fue colocado en la superficie del agar TCBS, y con la ayuda de un asa se esparció la muestra sobre la superficie del medio hasta secarse, para luego ser mantenida a temperatura ambiente. Aquí se realizó una siembra directa.

#### **6.2.4.3. Replicación de *Vibrio sp.* en la tercera siembra.**

Para la tercera siembra, se llevaron a cabo dos diluciones distintas en tubos de ensayo partiendo de las diluciones  $10^{-2}$  y siembra directa de M1. En un tubo de ensayo se colocaron colonias de Vibrios verdes, mientras que en el segundo tubo se introdujeron colonias de

Vibrios amarillos, los mismos que fueron obtenidos previamente de las placas  $10^{-2}$  y siembra directa. El procedimiento empleado fue idéntico al utilizado con anterioridad, consistente en la adición de 10 ml de agua destilada con 0,02 de sal marina, junto con las respectivas colonias de Vibrios amarillos y verdes en cada uno de los tubos. Cada tubo con la dilución de vibrios se lo denominó M2 para la dilución con vibrios verdes y M3 para la dilución con vibrios amarillos. Luego de 26 horas se realizó la siembra directa con las dos muestras.

#### **6.2.5. Sostenimiento de vibrios**

La masificación de los Vibrios se llevó a cabo en un matraz, donde se añadieron 500 ml de agua de mar esterilizada junto con un concentrado de colonias de Vibrios obtenidas de una placa previamente sembrada. Se agregaron 10 gramos de azúcar como nutriente para el desarrollo de los Vibrios. Después de homogeneizar la muestra, se selló e incubó a 30 °C durante aproximadamente 64 horas antes de sembrar en placas.

Para determinar la concentración bacteriana en esta muestra, se realizaron siembras en placas con tres diluciones:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se tomó una muestra de 100 microlitros, la cual se inoculó en una caja Petri. Con la ayuda de un asa de siembra, se extendió el inóculo por toda la superficie del agar hasta que se absorbió. Estas placas se mantuvieron incubadas a 30 °C durante 24 horas.

#### **6.2.6. Preparación de medios de cultivo**

El medio de cultivo que se utilizará será agar TCBS. Este es un medio selectivo, el cual servirá para el aislamiento de ciertas especies de vibrios presentes en el agua. Para esto se seguirán las indicaciones del producto para poder preparar el medio de cultivo. Se van a suspender 89.1 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se dejará reposar 5 minutos. Luego,

se calentará con agitación frecuente y se llevará a ebullición para disolución total. Una vez enfriado, se procederá a distribuirlo en placas de Petri estériles.

#### **6.2.7. Plaqueo en cajas petri**

Luego de obtener el medio líquido, dejará reposar por un minuto y se colocará las placas de Petri en la cámara de flujo. Después de colocar las cajas, se agregarán 10 mL de agar a cada caja usando un vaso de precipitado dejando solidificar de 10 a 15 minutos. Este proceso se realizará diariamente para cada punto de investigación.

#### **6.2.8. Diluciones seriadas**

Para las diluciones, se tomarán 200 ml de agua de mar filtrada, se colocarán 9 ml de esta solución en tubos de ensayo; una vez sellados todos se los llevará hacia el autoclave por un tiempo de 1h -1h 30 min para esterilizar dichos instrumentos.

#### **6.2.9. Tasa de crecimiento microbiano**

Para el cálculo de la tasa de crecimiento específico ( $\mu_{\max}/h^{-1}$ ) vamos a determinar el número de unidades formadoras de colonias (UCF) en función del tiempo. La ecuación que se emplea para su determinación es la siguiente:

$$K = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde:  $\ln(N_2)$  es el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (UFC). Medidas en el tiempo  $t_2$ .  $\ln(N_1)$  es el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias en el  $t_1$ .

#### **6.2.10. Preparación de unidades experimentales**

**6.2.10.1. Ensayo para identificar el efecto de levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de mar esterilizada.**

Para el experimento se obtuvo una concentración de *Vibrio sp.* de 1000 UFC/ml, por tanto, frente al modelo experimental de estableció una relación Vibrios-Levaduras, se ejecutaron experimentos con las siguientes relaciones:

Relación 1:1 (1000 UFC/ml de Vibrios y 1000 cel/ml de levaduras marinas)

Relación 1:10 (1000 UFC/ml de Vibrios y 10000 cel/ml de levaduras marinas)

En el ensayo se utilizaron 9 tubos de ensayo con una capacidad 50 ml. Estos comprendieron 4 réplicas para dos tratamientos (T1 y T2) y un tratamiento de control (T0). Para el primer tratamiento en cada tubo se colocaron 20 ml de agua de mar esterilizada, añadiendo una concentración aproximada de 1000 UFC/ml de Vibrios y 1000 cel/ml de levaduras marinas. Para el segundo tratamiento en cada tubo se colocaron 20 ml de agua de mar esterilizada, añadiendo una concentración aproximada de 1000 UFC/ml de Vibrios y 10000 cel/ml de levaduras marinas. Se evaluó el efecto de las levaduras sobre la concentración de vibrios en el agua.

El control del comportamiento de Vibrios frente a las levaduras marinas fue verificado en diferentes intervalos de tiempo: 2 horas (t1), 6 horas (t2) y 24 horas (t3).

**6.2.10.2. Ensayo para identificar el efecto de levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de camaronera**

Para el experimento se utilizaron 9 tubos de ensayo con una capacidad 50 ml. Estos comprendieron 4 réplicas para dos tratamientos (T1 y T2) y un tratamiento de control (T0). Para el primer tratamiento en cada tubo se colocaron 20 ml de agua de camaronera madurada,

añadiendo una concentración aproximada de 27500 UFC/ml de Vibrios y 27500 cel/ml de levaduras marinas. Para el segundo tratamiento en cada tubo se colocaron 20 ml de agua de mar esterilizada, añadiendo una concentración aproximada de 27500 UFC/ml de Vibrios y 275000 cel/ml de levaduras marinas. Se evaluó el efecto de las levaduras sobre la concentración de vibrios en el agua.

El control del comportamiento de Vibrios frente a las levaduras marinas fue verificado en diferentes intervalos de tiempo: 2 horas (t1), 6 horas (t2) y 24 horas (t3).

### **6.2.11. Diseño Experimental**

El diseño experimental utilizado en la investigación consistirá en tubos de ensayo de 50 ml de capacidad, dispuestos ordenadamente en un ambiente controlado. El factor de estudio será el efecto de las levaduras marinas en la reducción de Vibrios, los cuales fueron inoculados en el agua de cada ensayo. Los datos obtenidos se basaron en el conteo de bacterias en el agua en función de cada tratamiento.

#### **6.2.11.1. Ensayo experimental 1 con agua de mar esterilizada (AME)**

Se trabajó con dos tratamientos y cuatro réplicas (2x4), con un tratamiento de control

- Tratamiento 1 (T1): 1000 UFC/ml de vibrios con 1000 cel/ml de levaduras. (Relación Vibrio-Levadura 1:1)
- Tratamiento 2 (T2): 1000 UFC/ml de vibrios con 10000 cel/ml de levaduras. (Relación Vibrio-Levadura 1:10)
- Tratamiento control (T0): 1000 UFC/ml de vibrios

#### **6.2.11.2. Ensayo experimental 2 con agua de camaronesa madurada (AC)**

Se trabajó con dos tratamientos y cuatro réplicas (2x4), con un tratamiento de control



- Tratamiento 1 (T1): 27500 UFC/ml de vibrios con 27500 cel/ml de levaduras.  
(Relación Vibrio-Levadura 1:1)
- Tratamiento 2 (T2): 27500 UFC/ml de vibrios con 275000 cel/ml de levaduras.  
(Relación Vibrio-Levadura 1:10)
- Tratamiento control (T0): 27500 UFC/ml de vibrios

#### **6.2.12. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico del presente trabajo fue ejecutado utilizando el software IBM SPSS Statistics versión 25, con un intervalo de confianza del 95%. Se aplicó el método estadístico de ANOVA para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos. Se aplicará la prueba de rango y comparaciones múltiples de Tukey (Post Hoc).

## **CAPITULO IV**

### **7. RESULTADOS**

#### **7.1. Replicación de *Vibrio sp.***

Todas las replicaciones de *Vibrio sp.* obtenidas en el presente trabajo partieron de una muestra de agua de mar del Estero Huaylá de la ciudad de Machala, provincia de El Oro.

## 7.2. Replicación de *Vibrio sp.* en la primera siembra.

En la Figura 1 se muestra los resultados de la replicación de *Vibrio sp.* de la primera siembra en el aislamiento de *Vibrio sp.*, donde muestra que después de transcurridas las 24 horas se observó el crecimiento de *Vibrio sp.*, determinando el 100% de colonias amarillas en la siembra directa, alcanzando una concentración aproximada de 3260 UFC/ml. En las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  no se detectó crecimiento bacteriano, presuntamente por la temperatura.

Luego de 48 horas, en la siembra directa se observó un cambio en el color de colonias de *Vibrio sp.* determinándose la presencia de un 70% de colonias amarillas y un 30% de colonias verdes. En las diluciones se observó el crecimiento de *Vibrio sp.* determinándose el 100% de colonias amarillas.

A las 120 horas de inoculación, en la siembra directa las colonias verdes predominaron con un 90% y con la presencia de 10% de colonias amarillas. En las diluciones se mantuvieron el 100% de Vibrios amarillos. Es decir que, a este tiempo, las condiciones del tipo de colonias se mantuvieron iguales a lo observado previamente.

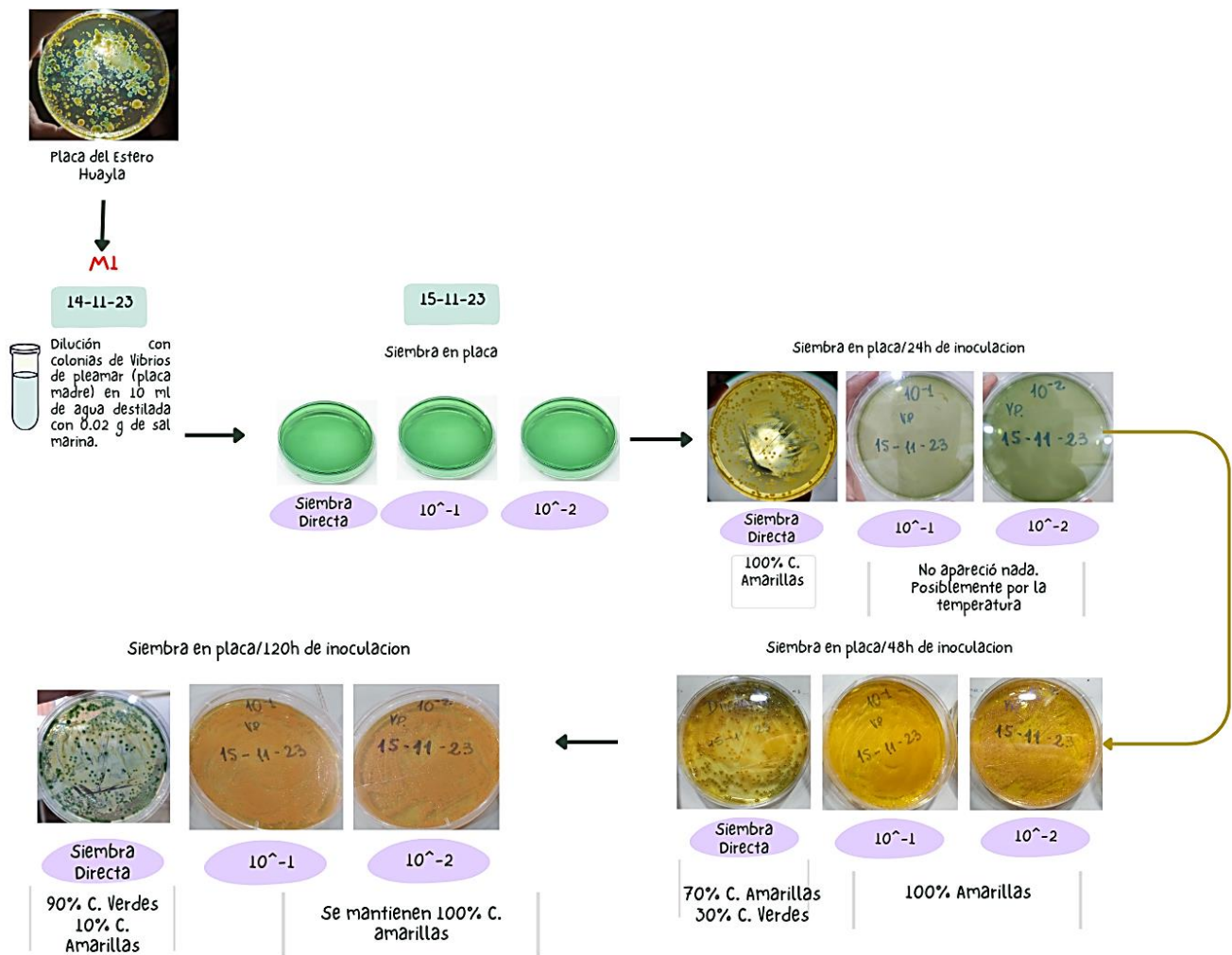


Figure 2. Resultados de la primera siembra en el aislamiento de *Vibrio* sp. mediante agar TCBS

### 7.3. Replicación de *Vibrio* sp. en la segunda siembra

La figura 2. Muestra que, al transcurrir 24 horas de haber realizado la segunda siembra, se observó que crecieron 100% de colonias amarillas, cuya concentración no pudo determinarse debido a su cantidad incontable. A las 96 horas después de la inoculación, todas las colonias amarillas experimentaron una transición completa y se transformaron en colonias verdes (100%).

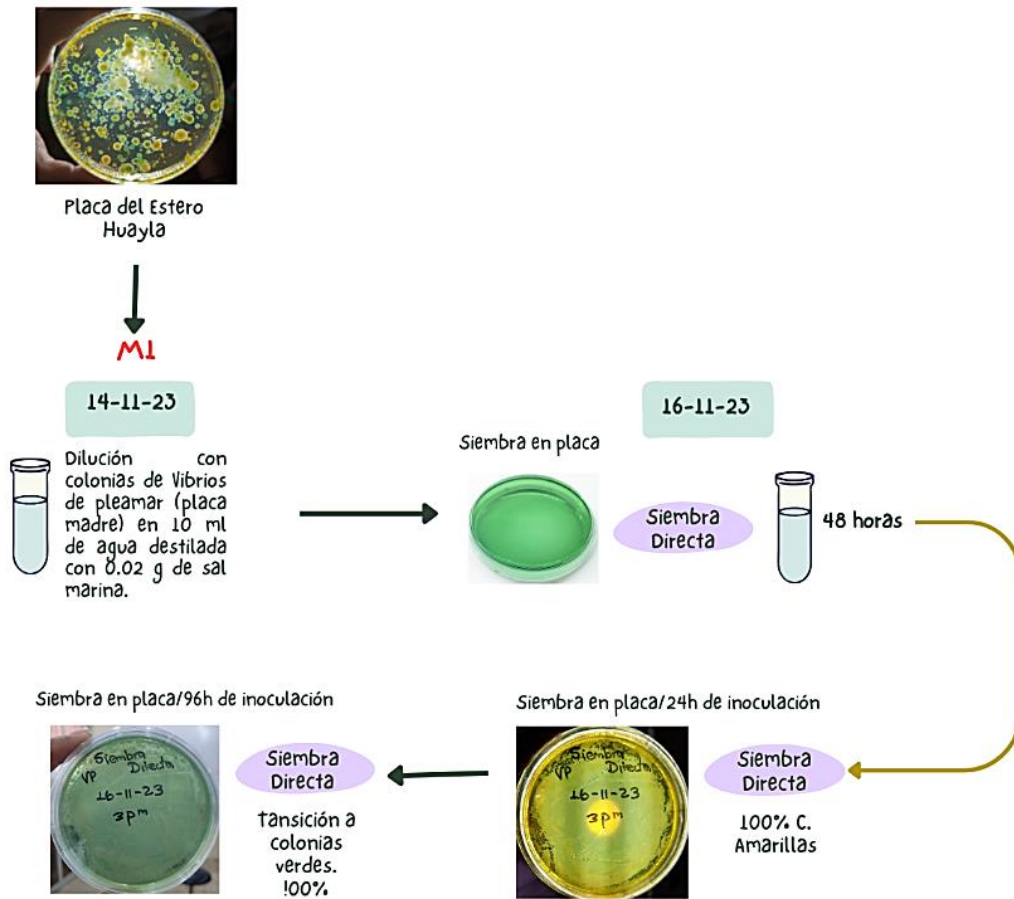


Figure 3. Resultados de la segunda siembra en el aislamiento de *Vibrio* sp. mediante agar TCBS

#### 7.4. Replicación de *Vibrio* sp. en la tercera siembra

La figura 3. Describe que, tras 12 horas de la siembra, la placa inoculada con Vibrios verdes exhibió un crecimiento incontable de colonias de Vibrios verdes, mientras que en la placa inoculada con Vibrios amarillos no se detectó crecimiento bacteriano. Después de 24 horas desde la siembra, en la placa con Vibrios verdes se observó una transformación completa, pasando del 100% de Vibrios verdes al 100% de Vibrios amarillos. Por otro lado, en la placa con Vibrios amarillos se evidenció crecimiento bacteriano con un 100% de Vibrios amarillos, aunque la cantidad era incontable.

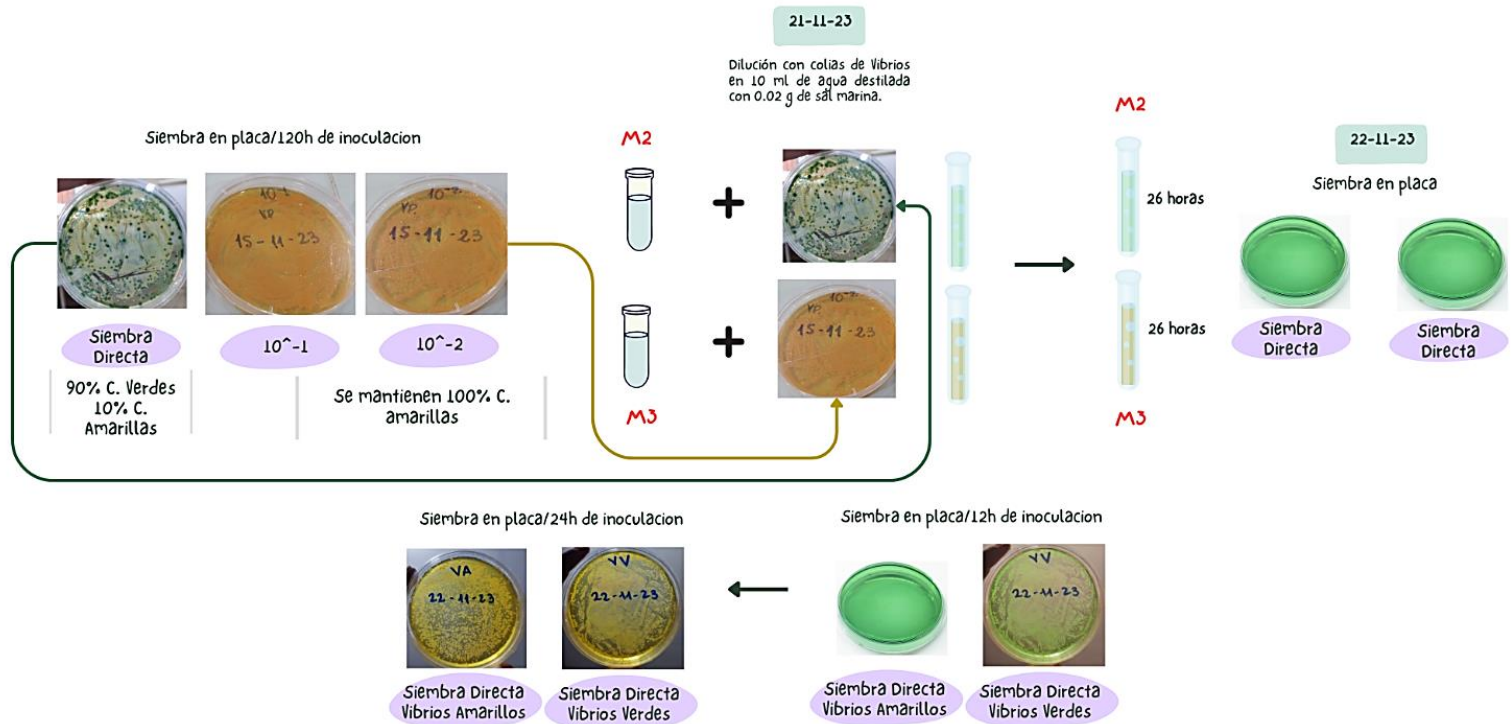


Figure 4. Resultados de la tercera siembra en el aislamiento de *Vibrio sp.* mediante agar TCBS

## 7.5. Sostenimiento de *Vibrio sp.*

La propagación de *Vibrio sp.* mediante la replicación de una muestra original obtenida del Estero Huaylá, de la ciudad de Machala, provincia de El Oro, fue desarrollada con éxito, obteniéndose a las 24 horas, en la primera dilución de  $10^{-1}$  una concentración de aproximadamente 10,000 UFC/ml de *Vibrio sp.*

## 7.6 Ensayos experimentales para la reducción de *Vibrio sp.* con levaduras

### 7.6.1 Efecto de las levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de mar esterilizada

En esta investigación después de transcurridas dos horas se observó el crecimiento de *Vibrio sp.* para la relación Vibrio-Levadura 1:1 y 1:10, determinando una concentración de 490 UFC/ml de vibrios para la relación 1:1 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio). Lo que demuestra que existe el 51% de reducción con esa concentración de levaduras.

En la relación 1:10 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio) se determinó una concentración de 284,25 UFC/ml de vibrios, demostrando que hubo el 71,58 % de reducción de vibrios para esa concentración de levaduras

Luego de 6 horas, se observó una concentración de *Vibrio sp.* de 6260 UFC/ml para el para la relación 1:1 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio), lo que indica que comienza a manifestarse el crecimiento por parte de los vibrios y que la acción de las levaduras se está minimizando. El mismo comportamiento ocurre en la relación 1:10 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio), donde se llega a una concentración de 7872,50 UFC/ml de vibrios.

A las 24 horas hubo un crecimiento mayor en comparación con los otros tiempos en las dos relaciones, teniendo un crecimiento de vibrios de 33125 UFC/ml para la relación 1:1 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio) y 48375 UFC/ml para relación 1:10 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio). Es decir que, a este tiempo, las condiciones del medio se volvieron ideales para la proliferación de vibrios.

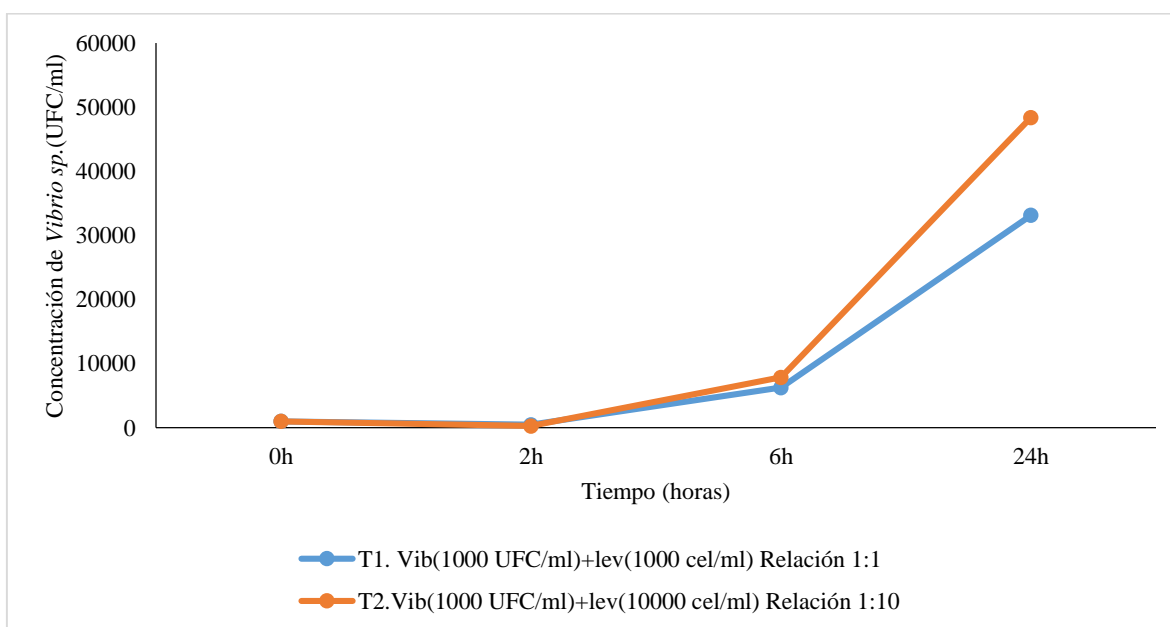


Figure 5. Comparación de las concentraciones de *Vibrio sp.* frente a diferentes concentraciones de levaduras marinas en agua de mar esterilizada

### **7.6.2. Efecto de las levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de camaronera**

En esta investigación, tras dos horas de transcurrido el experimento, se observó el crecimiento de *Vibrio sp.* en ambos tratamientos, alcanzando una concentración de 17969,5 UFC/ml para la relación 1:1 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio). Este resultado refleja una reducción del 30% en la concentración de vibrios en presencia de levaduras. En cuanto a la relación 1:10 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio), se determinó una concentración de 16047,5 UFC/ml de vibrios, lo que indica una reducción del 37,56% de la concentración, mostrando que no existen diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos.

En la sexta hora del experimento, se observó una concentración de *Vibrio sp.* de 21113,5 UFC/ml para la relación 1:1 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio), lo que representa una reducción del 17,85%. Este hallazgo sugiere que el crecimiento de los vibrios comienza a manifestarse, mientras que la acción de las levaduras se está minimizando. Un patrón similar se observa en la relación 1:10 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio), donde se alcanza una concentración de 28215 UFC/ml de vibrios.

A las 24 horas de la interacción de vibrios con levaduras en agua de camaronera madurada hubo un crecimiento mayor en comparación con los tiempos de 2 y 6 horas, en las dos relaciones, alcanzando un crecimiento de vibrios de 77883,25 UFC/ml para la relación 1:1 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio) y 64839,75 UFC/ml para para la relación 1:10 (concentración de 1000 UFC/ml Vibrio). Estadísticamente, los promedios de la concentración de vibrios en las 2 y 6 horas resultaron significativamente diferentes. Es decir que, a este tiempo, las condiciones del medio se volvieron ideales para la proliferación de vibrios.

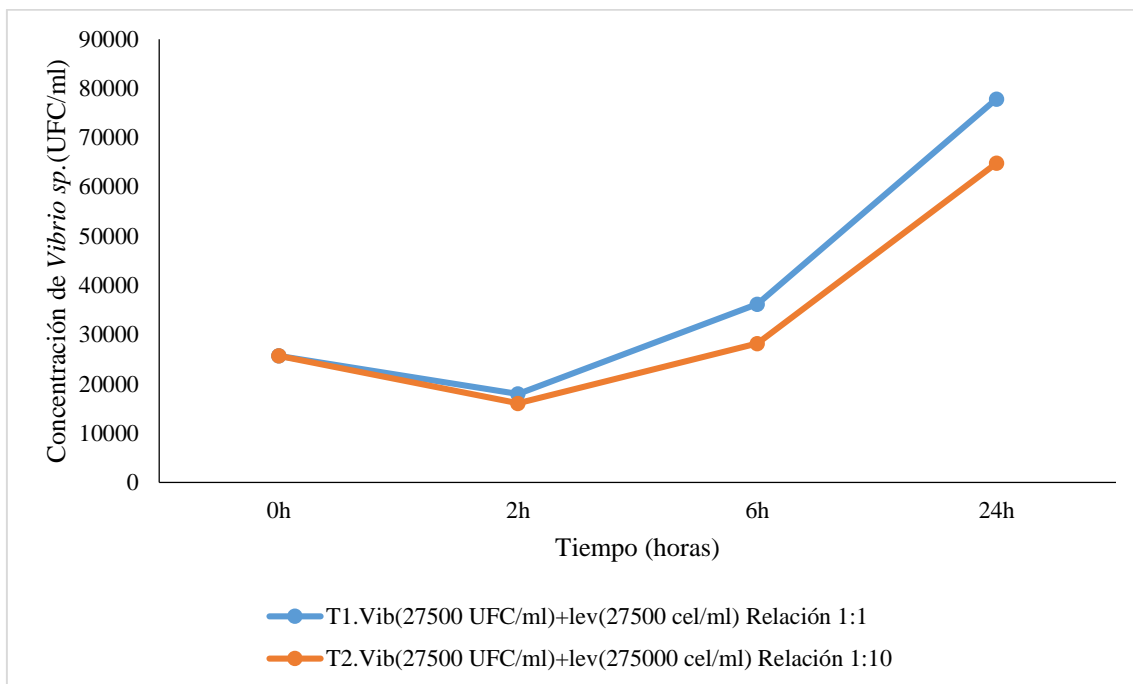


Figure 6. Comparación de las concentraciones de *Vibrio sp.* frente a diferentes concentraciones de levaduras marinas en agua de camaronera madurada

### 7.7. Porcentaje de reducción

La prueba de rango de comparaciones múltiples de Duncan ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) evidencian que el porcentaje de reducción de la concentración de *Vibrio sp.* en agua de mar esterilizada y agua de camaronera madurada, resultó significativamente diferentes detectándose dos grupos claramente definidos. El primer grupo con el 71,58 % de reducción perteneciente a AME con la Relación 1:10 (1000 UFC/ml vibrios y 10000 cel/ml levaduras). El segundo grupo con el 37,56 % y 30,08 % de reducción de *Vibrio sp.* compuesto por ACM con la Relación 1:10 (27500 UFC/ml vibrios y 275000 cel/ml levaduras) y ACM con la Relación 1:1 (27500 UFC/ml vibrios y 27500 cel/ml levaduras) respectivamente. Se identificó un grupo con el 51% de reducción cuyo valor fue entre los dos grupos descritos anteriormente, compuesto por AME con la Relación 1:1 (1000 UFC/ml vibrios y 1000 cel/ml levaduras).



El grupo b está conformado por los dos tratamientos de agua de camaronera madurada. En cambio, el grupo a estuvo conformado por los dos tratamientos de agua de mar esterilizada. El resultado del análisis estadístico también demostró que el tratamiento de agua de mar esterilizada que tuvo una relación Vibrio 1:1 (1000 UFC/ml de vibrios con 1000 cel/ml de levaduras) fue estadísticamente similar para los dos grupos anteriormente descritos.

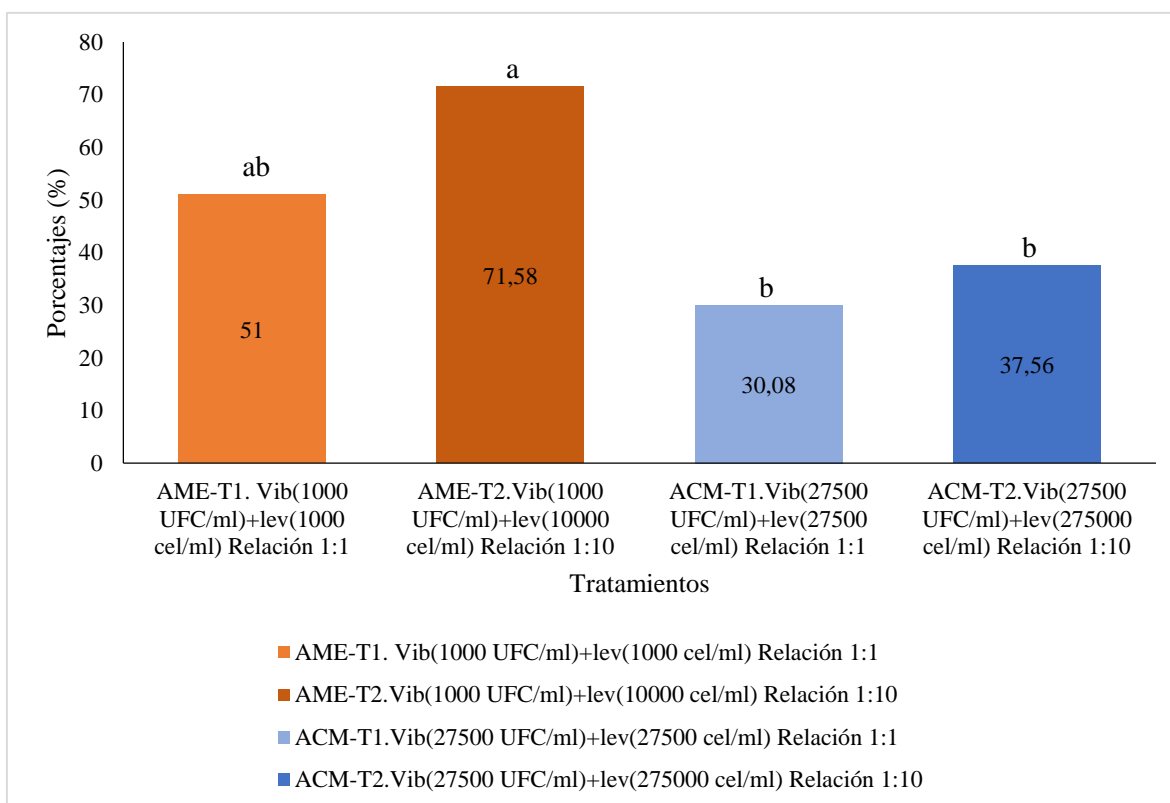


Figure 7. Porcentajes de reducción de la concentración de Vibrio sp. en agua de mar esterilizada y agua de camaronera madurada

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Aislamiento y sostenimiento de *Vibrio sp.* mediante agar TCBS

En esta investigación durante la replicación de *Vibrio sp.* después de transcurridas las 24 horas se observó el crecimiento de *Vibrio sp.* en la siembra directa resultando el 100% de colonias amarillas. Sin embargo, a las 48 horas se observó un cambio en el color de colonias de *Vibrio sp.* determinándose la presencia de un 70% de colonias amarillas y un 30% de colonias verdes. Finalmente, a las 120 horas de inoculación, las colonias verdes predominaron con un 90% y con la presencia de 10% de colonias amarillas. El cambio de color de las colonias de *Vibrio sp.* es atribuido a varios factores. Por ejemplo, Hara-Kudo et al., 2001, explican que los ácidos producidos por las bacterias que fermentan la sacarosa se difunden a través del agar, provocando un cambio de color de verde a amarillo en el área circundante a las colonias fermentadoras de sacarosa o incluso en toda la placa de agar con el tiempo. El estudio de Hara-Kudo et al., 2001 se centró en la obtención a *V. parahaemolyticus*, encontrándose una alteración en el color de las colonias que transitaron de verde a amarillas o a amarillo verdoso, lo que según estos investigadores dificulta la diferenciación precisa de *V. parahaemolyticus* y de otras bacterias mediante el color.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, el cambio de color podría atribuirse al agotamiento de los indicadores (azul de timol y azul de bromotimol) por el tiempo en que las placas con agar se mantuvieron a temperatura ambiente en las primeras siembras, primero 120 y luego 96 horas para la segunda siembra. Sin embargo, en la tercera siembra, se observó un cambio de color después de 12 horas de la siembra, y tras 24 horas se observó una transformación completa, pasando del 100% de Vibrios verdes al 100% de Vibrios amarillos.

Se ha postulado que la evolución bacteriana depende de dos fuerzas opuestas, la preservación de la información genética para adaptarse al entorno y la variación genética que les permite explorar nuevos ambientes. El estrés, como la falta de nutrientes o el uso constante de antibióticos, puede aumentar la tasa de mutación, por lo que hay una mayor proporción de bacterias mutantes con un potencial elevado para desarrollar resistencia antibiótica (Galán et al., 2006). De estos resultados se puede comprender que la coloración de colonias puede ser el indicador de una reacción del microorganismo ante la fuente de nutritiva en la que se encuentran desarrollando (agar) pero no define la especie y género específico. Por tanto, para los ensayos posteriores que resultaron del presente trabajo nos referiremos como vibrios totales. El efecto de cambio de color de las colonias de *Vibrio sp.* que se ha observado durante su propagación no influyo en los resultados del efecto de las levaduras sobre la reducción de estos microorganismos patógenos.

## **8.2 Interacción levaduras - *Vibrio sp.***

El presente estudio identificó la interacción Vibrio-Levadura durante 24 horas en dos tipos de agua; agua de mar esterilizada y agua de camaronera madurada en laboratorio. Esta interacción se evidencia en un proceso de reducción de *Vibrio sp.* por efecto de la presencia de levaduras y posteriormente un incremento de *Vibrio sp.* en cada tipo de agua.

Con el uso de agua de mar esterilizada se obtuvo una disminución en el crecimiento de *Vibrio sp.* a las dos horas de interacción en presencia de levaduras. La relación 1:1 Vibrio – levadura demostró efecto en el control de *Vibrio sp.* mostrando una reducción del 51%, mientras que en la relación 1:10 exhibió una reducción del 71.58%. En agua de camaronera, la reducción en el crecimiento de los vibrios fue del 37.56% cuando hubo una relación 1:10, mientras que en la relación 1:1 la reducción fue del 30%. Estos resultados indican que cuando

la presencia de levaduras es altamente superior a la de vibrios, como por ejemplo lo observado en el presente trabajo en la relación 1:10 Vibrio-levaduras la competitividad fue más efectiva causando una reducción del crecimiento de los vibrios en el agua. Estos resultados están respaldados por un estudio previo realizado por Yun et al., (2021), donde se observó una disminución en la concentración de vibrios de  $4.6 \times 10^4$  UFC/ml al inicio a  $6.8 \times 10^3$  UFC/ml con una concentración de levaduras de  $2 \times 10^7$  UFC/ml a las 48 horas. Esto implica que la concentración de levaduras utilizadas por estos investigadores es aproximadamente 435 veces mayor que la concentración de vibrios, centrándonos en que esta cuantificación esta expresada en una unidad de medida similar. En comparación con los resultados obtenidos en este estudio, donde la concentración de levaduras (cel/ml) se duplicó 10 veces a la concentración de *Vibrio sp.* (UFC/ml). Esto demuestra que no se debe subreestimar el efecto de las levaduras, por el contrario, es esencial establecer una relación óptima entre las concentraciones de levaduras y vibrios para que las levaduras puedan ejercer una acción efectiva sobre los vibrios y así disminuir las concentraciones de estas bacterias patógenas en el agua de cultivo. Es importante indicar que el efecto reductor de *Vibrio sp.* con el uso de levaduras fue más significativo en agua de mar esterilizada que en agua de camaronera que había sido madurada en laboratorio. Este efecto se explica por las condiciones del agua, ya que el agua de mar esterilizada está limpia y posiblemente los vibrios pueden crecer fin efecto competitivo, contrario a la condición de agua de camaronera madurada en laboratorio, misma que contendría abundante comunidad microbiana, y materia orgánica disuelta.

En la interacción Vibrios – levaduras analizadas en el presente estudio, también se pudo observar un crecimiento de *Vibrio sp.* a las 6 horas tanto en la relación 1:1 como en la relación 1:10 y en los dos tipos de agua sea esterilizada o de camaronera. Esto sugiere un posible

efecto por el metabolismo de las levaduras y vibrios, permitiendo un crecimiento exponencial de los vibrios a las 6 horas de exposición alcanzando una tasa de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de 0.67 en una relación 1:1 y una tasa de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de 0,86 en la relación 1:10 en presencia de agua de mar esterilizada. En cambio, en presencia de agua de camaronera madurada, en la relación 1:1 la tasa de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) fue 0.27, mientras que en la relación 1:10 no hubo crecimiento. Estos resultados indican que en agua de mar esterilizada el crecimiento como producto de metabolismo celular fue más evidente en comparación con el agua de camaronera madurada. Es posible que el efecto de crecimiento en base a sustancias metabólicas propias de levaduras y o vibrios contribuyó al sucesivo crecimiento exponencial de vibrios en agua esterilizada. El crecimiento de vibrios en agua de camaronera parece que fue mitigado posiblemente por existencia de materia orgánica y otros microorganismos, aspecto que requiere más investigación.

## 9. CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados obtenidos de los experimentos realizados para evaluar el efecto de las levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en agua de mar esterilizada y agua de camaronera madurada en laboratorio revelaron hallazgos significativos. En primer lugar, se observó que la presencia de levaduras demostró tener un impacto inicial en la reducción de la concentración de *Vibrio sp.* en ambos tipos de agua, como se evidenció por la disminución de la concentración de la bacteria en las primeras horas del experimento. Sin embargo, con el paso del tiempo, se evidenció un incremento en la concentración de *Vibrio sp.*, indicando una disminución en la efectividad inhibitoria de las levaduras. Este fenómeno puede atribuirse a una posible reducción de levaduras en el medio causando una concentración

subóptima de levaduras y a la actividad metabólica de las levaduras durante las 24 horas de exposición.

La eficacia inhibitoria de las levaduras sobre *Vibrio sp.* está directamente influenciada por la proporción de células por mililitro de levaduras con respecto a las unidades formadoras de colonias por mililitro de vibrios. Se observa que, a una mayor concentración de levaduras, se obtiene un efecto inhibitor más pronunciado, tanto en agua de mar esterilizada como en agua de camaronera.

Por otro lado, al comparar los porcentajes de reducción de la concentración de *Vibrio sp.* con el inóculo de levaduras en agua de mar esterilizada y agua de camaronera madurada, se detectaron diferencias significativas. A las dos horas los tratamientos con agua de camaronera madurada mostraron una reducción menos efectiva en la concentración de *Vibrio sp.* en comparación con los tratamientos en agua de mar esterilizada. Este hallazgo sugiere que las características específicas del agua de camaronera madurada pueden reducir el efecto inhibitor de las levaduras sobre *Vibrio sp.* al existir microorganismo compitan por espacio y alimento.

Estos resultados proporcionan información valiosa sobre la eficacia de las levaduras en la reducción de *Vibrio sp.* en diferentes tipos de agua en condiciones de laboratorio. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender mejor los mecanismos subyacentes y optimizar el uso de levaduras como agentes de control de *Vibrio sp.* en entornos acuáticos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Rodríguez-Fuentes, G., Escalante-Herrera, K. S., & Gaxiola, G. (2019). A vibriosis outbreak in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc and clear seawater. *Journal of Invertebrate Pathology*, 167. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107246>
- Aguirre Chanta, L. E., Sánchez-Suárez, H. A., Ordinola-Zapata, A., 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), 19386. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I4.19386>
- Aguirre-Guzman, G., Campa-Cordova, Á. I., & Salinas-Chavira, J. (2023). Uso de Levaduras Activas en Nutrición de Camarón. *Revista MVZ Cordoba*, 28(2). <https://doi.org/10.21897/rmvz.2929>
- Ayiku, S., Shen, J., Tan, B. ping, Dong, X. hui, & Liu, H. yu. (2020). Effects of reducing dietary fishmeal with yeast supplementations on *Litopenaeus vannamei* growth,

- immune response and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Microbiological Research*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126554>
- Berrocal, C. A., & Weil, E. (2022). The influence of thermic stress on the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. In *University of Puerto Rico*. <https://hdl.handle.net/20.500.11801/2994>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C. G., & Navarrete, P. (2015). Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 165045. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01093/BIBTEX>
- Galán, J. C., Baquero, R., Morosini, I., & Baquero, F. (2006). Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *Infectio*, 10(1).
- Gonzabay, C., Ámbar, N., Cevallos, V., & Harry, A. (2021). Analysis of shrimp production in Ecuador for export to the European Union in the 2015-2020 period. *Polo Del Conocimiento*, 6(9), 1040–1058. <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/3093>
- Guillermo Hernández Montiel, L., Rivas García, T., Romero Bastidas, M., Josué, C., Contreras, C., Higinio, F., Espinoza, R., & Gregorio, R. (2018). Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.VOI20.1000>
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., & Kumagai, S. (2001). Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5819-5823.2001>
- Hernández Montiel, L. G., Rivas García, T., Romero Bastidas, M., Chiquito Contreras, C. J., Ruiz Espinoza, F. H., Chiquito Contreras, R. G., Hernández Montiel, L. G., Rivas García, T., Romero Bastidas, M., Chiquito Contreras, C. J., Ruiz Espinoza, F. H., &



- Chiquito Contreras, R. G. (2018). Potencial antagonico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatogénos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(SPE20), 4311–4321. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.VOI20.1000>
- Hernández, N. (2021). Las levaduras y su ecología: ¿existen las levaduras marinas? *Recursos Naturales y Sociedad*, 7(1).
- Loo, K. Y., Letchumanan, V., Law, J. W. F., Pusparajah, P., Goh, B. H., Ab Mutalib, N. S., He, Y. W., & Lee, L. H. (2020). Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 12, Issue 4, pp. 2590–2608). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12460>
- Luna G., D., De León L., J., Vallejo I., A., & Velásquez L., G. (2003). Evaluación de la resistencia bacteriana frente a tres antibióticos usados en la maduración del camarón marino (*Litopenaeus vannamei*). *Revista MVZ Córdoba*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.515>
- Mahdy, M. A., Jamal, M. T., Al-Harb, M., Al-Mur, B. A., & Haque, M. F. (2022). Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 10(5), 59–65. <https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100507>
- Mendoza Noblecilla, G., & Ordinola-Zapata, A. (2022). El extracto de *Mentha piperita* incrementa la supervivencia del camarón *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 33(3). <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i3.21178>
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Saad, M. Z., Yasin, I. S. M., Zulkipli, N. A., Mustafa, M., & Nasruddin, N. S. (2019). Virulence-associated genes and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* spp. isolated from cultured marine fishes in Malaysia. *BMC Veterinary Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1907-8>
- Morales-Cristóbal, Y., Cortés-Jacinto, E., Saucedo, P. E., Méndez-Martínez, Y., Ledea-Rodríguez, J. L., Guzmán-Murillo, M. A., Sánchez-Ortiz, A. C., Aguirre-Guzmán, G., Cadena-Roa, M., & Campa-Córdova, A. I. (2022). Dietary enrichment with crude protein content and feed additives (*Bacillus* spp. and yeast strains) improves growth performance, survival and circulating hemocytes in juvenile white shrimp, *Litopenaeus*

- vannamei. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 57(1).  
<https://doi.org/10.22370/rbmo.2022.57.1.3361>
- Nimrat, S., Khaopong, W., Sangsong, J., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2019). Dietary administration of Bacillus and yeast probiotics improves the growth, survival, and microbial community of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. <https://doi.org/10.1080/10454438.2019.1655517>, 33(1), 15–31.  
<https://doi.org/10.1080/10454438.2019.1655517>
- Ochoa, J. L., & Vázquez, R. (2004). *Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas*. 39–50. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15409906>
- Palma Gorziglia, V. I. (2021). Efecto de las levaduras *Debaryomyces hansenii* 97 y *Yarrowia lipolytica* 242 en la motilidad del patógeno *Vibrio anguillarum*. *Universidad de Chile*.  
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/184066>
- Parrado, M., Salas, M., Hernández Arévalo, G., Ortega, P., & Yossa Perdomo, M. (2014). Variedad bacteriana en cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. *Orinoquia*, 18(2).
- Reddy, G. V. S. (2017). Efficacy of the Marine Yeast *Debaryomyces Hansenii* on Growth of the Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, V(IX). <https://doi.org/10.22214/ijraset.2017.9225>
- Reyes-Becerril, M., Alamillo, E., & Angulo, C. (2021). Probiotic and Immunomodulatory Activity of Marine Yeast *Yarrowia lipolytica* Strains and Response Against *Vibrio parahaemolyticus* in Fish. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1292–1305.  
<https://doi.org/10.1007/S12602-021-09769-5>
- Rubio, M., Silveira, R., Hernández, D. A., Pérez, A., & Pozo, M. (2020). Prevalencia de enfermedades en el camarón de cultivo *L. vannamei* en Cuba. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*.
- Sahandi, J., Sorgeloos, P., Xiao, H., Wang, X., Qi, Z., Zheng, Y., & Tang, X. (2019). The use of selected bacteria and yeasts to control *Vibrio* spp. in live food. *Antibiotics*, 8(3).  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8030095>

- Sánchez-Ulloa, A., & Palma-Macías, G. (2023). Análisis de las exportaciones de la industria camaronesa en la provincia de El Oro, período 2020 – 2021. *593 Digital Publisher CEIT*, 8(3). <https://doi.org/10.33386/593dp.2023.3.1654>
- Sarlin, P. J., & Philip, R. (2016). Marine yeasts as feed supplement for Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*: Screening and Testing the Efficacy. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(1), 55–70. <https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2016.501.005>
- Solorzano-Reyes, F., & Velásquez-López, P. C. (2021). Eficiencia de absorción en postlarvas de camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, alimentadas con una dieta de levadura marina de marismas de manglar. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 50(2), 73–90. <https://doi.org/10.25268/BIMC.INVEMAR.2021.50.2.1012>
- Thompson, C. M., Marsden, A. E., Tischler, A. H., Koo, J., & Visick, K. L. (2018). A genetic analysis reveals that a trio of regulators prevents biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01257-18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030225>
- Valentina, L., 1, M.-C., Armando, J., 2, S., & Celis-Ramírez, A. M. (2020). Caracterización de levaduras marinas y su potencial fermentador. *Universidad de Los Andes*. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/44508>
- Yun, L., Wang, W., Li, Y., Xie, M., Chen, T., Hu, C., Luo, P., & Li, D. (2021). Potential application values of a marine red yeast, *Rhodospiridium sphaerocarum* YLY01, in aquaculture and tail water treatment assessed by the removal of ammonia nitrogen, the inhibition to *Vibrio* spp., and nutrient composition. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246841>