



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“VALIDACIÓN DE ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS EN  
LARVICULTURA DEL CAMARÓN *Penaeus vannamei* EN LA  
PROVINCIA DE SANTA ELENA, MAR BRAVO”  
TRABAJO DE TITULACIÓN.**

**Previo a la obtención del título de  
BIÓLOGO**

**AUTOR:**

Muñoz Acosta Dayan Andrea

**TUTOR:**

Acui. Sonnya Patricia Mendoza Lombana. Ph.D.

**LA LIBERTAD, ECUADOR.**

**2022**

UNIVERSIDAD PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“VALIDACIÓN DE ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS EN  
LARVICULTURA DEL CAMARÓN *Penaeus vannamei* EN LA  
PROVINCIA DE SANTA ELENA, MAR BRAVO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN.**

**Previo a la obtención del título de**

**BIÓLOGO**

**AUTOR:**

Muñoz Acosta Dayan Andrea.

**TUTOR:**

Acui. Sonnya Patricia Mendoza Lombana. Ph.D.

LA LIBERTAD, ECUADOR.

2022

UPSE

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo se lo dedico a Dianita, mi mamá, como recompensa de su gran labor como madre y padre, gracias a ese apoyo fundamental, el amor y los grandes valores que me inculcó y he aquí el resultado de sus enseñanzas.

A mis tres retoños Bryan, July y Mateo que sin importar las circunstancias siempre estuvieron conmigo.

Y aquellas figuras paternas, que fueron mi principal inspiración Alix y Francisco, gracias por su infinito amor.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradecer a Dios por darme la oportunidad de culminar una etapa más en esta vida y permitirme compartir junto a mi familia.

A la empresa DULODER S.A, que me abrió las puertas de sus instalaciones y me apoyo en el desarrollo de la tesis.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena y sus maestros de la carrera de biología, gracias por las enseñanzas durante estos años.

A la Acuicultura Sonnya Mendoza, por su paciencia, apoyo, tiempo y motivación que me dio durante el proceso de la realización de la tesis.

A mis compañeros de trabajo Jean y Cecilia y sin olvidar al Christel y Heydi por toda la ayuda recibida por parte de ellos.

Aquella persona que su presencia fue esencial y siempre estuvo conmigo, Pilar Muñoz parte de este logro es dedicado a ti.

A mi familia y amigos que estuvieron presentes en el proceso, Samanta y Patricia por ayuda, motivación, por las aventuras e historias vividas juntas. A Marlon por su persistencia a mi lado, consejos y la motivación que siempre me ha dado.

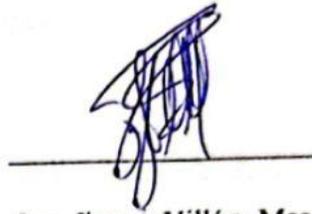
Sin olvidarme de Rhonny Mera, hombre del cual mi admiración es grande y que sin importar nada siempre será considerado más que un amigo, mi padre.



## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



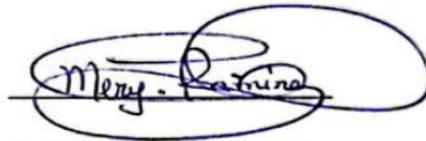
**Blgo Richard Duque, MSc**  
Decano  
**Facultad de Ciencias del Mar**



**Ing. Jimmy Villón, Msc**  
Director de carrera  
**Carrera de Biología**



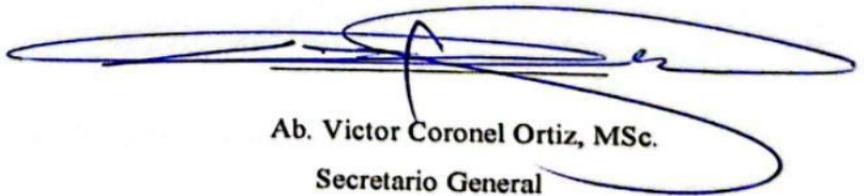
**Blga. Tanya González MSc**  
Docente de Área



**Q. F. Mery Ramírez, MSc**  
Docente de Área



**Acui. Sonnya Mendoza Ph.D**  
Docente Tutor



**Ab. Victor Coronel Ortiz, MSc.**  
Secretario General

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por la idea y resultados expuestos en esta tesis de grado me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



**Dayan Muñoz Acosta**

**CI: 1725676447**

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	20
INTRODUCCIÓN .....	22
JUSTIFICACIÓN .....	25
OBJETIVOS.....	28
HIPÓTESIS .....	29
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO .....	30
1. 1. DESARROLLO LARVARIO .....	30
1.2 PRINCIPALES PATOLOGIAS BACTERIANAS EN LARVICULTURA.....	34
1.2.1. SINDROME DE BOLITAS: .....	34
1.2.2. SÍNDROME DE ZOEAL.....	35
1.2.3 SINDROME DE LA MORTALIDAD TEMPRANA (EMS o AHPND).....	37
1.2.4 HEPATOPANCREATITIS NECROTISANTE (NHP). .....	38
1.3. CONSECUENCIAS DE LAS ALTAS BACTERIAS EN CULTIVOS ACUÍCOLAS.....	40
1.4. ESTRATEGIAS DE DESINFECCIÓN EN SISTEMAS LARVARIOS. ....	42
1.4.1. ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS PARA EL CONTROL DE PATOLOGÍAS BACTERIANAS .....	43
1.4.2 PROFILAXIS CON PROBIÓTICOS. ....	45
1.4.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS .....	47
1.4.4. PROFILAXIS CON ÁCIDOS ORGÁNICOS .....	49
1.4.5. PRINCIPALES ÁCIDOS ORGÁNICOS EMPLEADOS .....	50
1.4.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGANICOS SOBRE LAS BACTERIAS PATÓGENAS .....	51
1.1.7 PROFILÁXIS CON ACEITES ESENCIALES .....	51

1.4.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS. ....	54
1.5. CONTROL BACTERIOLOGICO.....	55
.....	56
1.5.1. HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO DE VIBRIOS. ....	56
1.5.2 TÉCNICAS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO .....	58
1.5.2.1. METODO TRADICIONAL:.....	58
1.5.3. MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS .....	60
1.6. TÉCNICAS DE AISLAMIENTOS PARA OBTENER CULTIVOS PUROS .....	61
1.6.1 TÉCNICA DE INOCULACIÓN.....	61
1.7. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	62
1.7.2 TINCIÓN DE GRAM.....	63
1.7.3 MORFOLOGÍA DE COLONIAS .....	64
1.7.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS. ....	65
1.7.5. MÉTODO API 20E V4,1.....	65
1.8. CONCETRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA .....	66
1.9. ANTIBIOGRAMA .....	66
1.10. PROTOCOLOS DE MANEJO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN LARVARIA. ....	67
CAPITULO 2. MARCO METODOLÓGICO.....	68
2.1 TIPO DE ESTUDIO .....	68
2.2 ÀREA DE ESTUDIO .....	68
Laboratorio D: 2°14'57.0"S 80°56'46.6"W.....	70
Laboratorio A: con las siguientes coordenadas: 2°14'56.2"S 80°56'46.6"W .....	70
Laboratorio B: con las siguientes coordenadas <b>2°14'33.9"S 80°57'07.7"W</b> .....	71
2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA:.....	72
2.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA:.....	73
2.5 LABORATORIO DE REALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS.....	76
2.6. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	77
2.7 OBSERVACIÓN DIRECTA DE MUESTRAS .....	78
2.8 METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ORGANISMOS.....	80
2.8 CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA.....	83

2.9 ANTIBIOGRAMA.....	86
2.10 ANÁLISIS DE PATOLOGÍA EN FRESCO. ....	87
2.11 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA MEDIANTE LA METODOLOGÍA API 20 E .....	89
CAPITULO 3. RESULTADOS.....	90
3.1 ANOMALÍAS EN LARVAS. ....	90
3.2 CONTEO BACTERIOLÓGICO .....	91
3.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	105
3.4 PROBIÓTICOS COMERCIALES Y CEPAS PATÓGENAS.....	106
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	108
3.5.1 MEDIA DE COLONIAS AMARILLAS Y VERDES EN ESTADIO ZOEAL DE LOS CUATRO LABORATORIOS.....	109
3.5.2 MEDIA DE CARGA BACTERIANA EN EL ESTADIO DE MYSIS EN LOS CUATRO LABORATORIOS.....	110
3.5.3 MEDIA DE LAS CARGAS BACTERIANAS EN ESTADIO PL DE LOS CUATRO LABORATORIOS. ....	111
3.5.4 IDENTIFICACION BIOQUÍMICA.....	111
CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y DISCUSIONES .....	113
4.1 DISCUSIONES .....	113
4.2 CONCLUSIONES.....	115
CAPITULO 5 BIBLIOGRAFÍA .....	117

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Nauplio.....	30
Figura 2. Zoea.....	31
Figura 3. Mysis .....	32
Figura 4. Post larva.....	33
Figura 5. Síndrome de bolitas.....	35
Figura 6. Síndrome de Zoea 2.....	36
Figura 7. Juveniles, al lado izquierdo con EMS y lado derecho norma .....	38
Figura 8. Juveniles, animal de laparte inferior afectado por NHP.....	39
Figura 9. <i>L acidophylus</i> Figura 10. <i>L bulgaris</i> .....	45
Figura 11. <i>B bificham</i> Figura 12. <i>B inanius</i> .....	46
Figura 13. Principales géneros de bacterias probióticas.....	46
Figura 14. Bacteria HGS-7      Figura 15. AQUASTAR.....	48
Figura 16. Pond Plus      Figura 17. Pondtox.....	48
Figura 18. Playa de Mar Bravo.....	69
Figura 19. Laboratorio A .....	70
Figura 20. Laboratorio B .....	71
Figura 21. Laboratorio C .....	71
Figura 22. Laboratorio D.....	72
Figura 23. Área de estudio Laboratorio DULODER S.A (derecha); extensión Mar bravo (izquierda).....	76
Figura 24. Recolección de muestras .....	77

Figura 25. Nauplio.....	78
Figura 26.Mysis .....	79
Figura 27. Post larva.....	79
Figura 28.Placa de microelisa.....	85
Figura 29.MIC (medio sólido).....	85
Figura 30. Antibiograma.....	86
Figura 31. Equipos para realizar patología en fresco .....	87
Figura 32. Carta de colores, metodología API E20 .....	89
Figura 33.Zoea-Laboratorio A.....	92
Figura 34.MYSIS-LABORATORIO A.....	93
Figura 35.POST LARVA LABORATORIO A.....	94
Figura 36.ZOEA-LABORATORIO B .....	95
<i>Figura 37.MYSIS-LABORATORIO B.....</i>	<i>96</i>
Figura 38. POST LARVA-LABORATORIO B      Fuente: Autor, 2022 .....	97
Figura 39. ZOEA-LABORATORIO C .....	98
Figura 40.MYSIS-LABORATORIO C.....	99
Figura 41.POST LARVA-LABORATORIO C.....	100
.....      Figura 42.ZOEA-LABORATORIO D	
.....	101
Figura 43.MYSIS-LABORATORIO D.....	101
Figura 44. POST LARVA-LABORATORIO D .....	102
Figura 45.COMPARACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN EL ESTADIO DE ZOEA	
.....	103
Figura 46.COMPARACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN EL ESTADIO MYSIS	
.....	104
Figura 47.COMPARACIÓN BACTERIANA DE POST LARVA .....	104
Figura 48. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA .....	105
Figura 49. PRPBIÓTICO 1 vs PATÓGENOS .....	106
Figura 50.PROBIÓTICO 2 vs PATÓGENOS .....	107

Figura 51.PROBIÓTICO vs PATÓGENOS .....	107
Figura 52.PROBIÓTICO vs PATÓGENOS .....	108

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. características físicas de los principales ácidos orgánicos .....	50
Tabla 2. Grados de severidad de UFC en larvas y postlarvas de camarón .....	82
Tabla 3. Formato para realizar patología en fresco .....	88
Tabla 4.CARGA BACTERIOLÓGICA-ZOEA .....	109
Tabla 5.CARGA BACTERIANA MYSIS.....	110
Tabla 6. CARGA BACTERIANA PL .....	111
Tabla 7.IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA .....	112

## **GLOSARIO.**

### **Ácidos orgánicos**

Grupo de biomoléculas que generalmente no se disuelven en agua, sino en cloroformo, éter o benceno. Inhiben el crecimiento de determinados microorganismos digestivos patógenos, ya que reducen el pH del tracto digestivo y además tienen actividad bactericida y bacteriostática.

### **Acuicultura**

Conjunto de métodos, técnicas, protocolos de producción y actividades cuyo objetivo es el cultivo en cautiverio de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos, reptiles o algas). Es el control de crecimiento y producción de especies susceptibles a ser cultivadas en un medio acuático.

### **Calidad de agua**

Son las características físicas, químicas y biológicas del agua, así como factores bióticos y abióticos, que influyen en un cuerpo de agua en función al desempeño de las especies

<b>Patología</b>	<p>Estudio de las causas y efectos de una enfermedad o lesión.</p> <p>Estudio de la enfermedades, incorporando una amplia gama de campos de investigación en biología y prácticas médicas.</p>
<b>Patógeno</b>	<p>Organismo que causa una enfermedad. También puede denominarse agente infeccioso o simplemente germen .</p>
<b>Síndrome</b>	<p>Un síndrome es un conjunto de signos y síntomas médicos que se correlacionan entre sí y, a menudo, se asocian con una enfermedad o trastorno en particular .</p>
<b>Sintomatología</b>	<p>Signos observados o detectables y los síntomas experimentados de una enfermedad, lesión o afección. Un signo, por ejemplo, puede ser una temperatura más alta o más baja de lo normal, una presión arterial alta o baja o una anomalía que se muestra en un análisis minucioso.</p>
<b>Supervivencia</b>	<p>Cantidad de organismos que resisten diferentes fases en su ciclo de vida como cambios climáticos, patologías, etc. durante el tiempo de cultivo en medio acuático.</p>

## **ABREVIATURAS.**

ATP	Adenosín Trifosfato.
BMNV	Virus de la Necrosis de la Glándula del Intestino Medio por Baculovirus .
CNA	Camara Nacional de Acuicultura.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
EMS	Síndrome de Mortalidad Temprana.
FCA	Factor de conversión Alimenticia.
g	Gramo.
ha	Hectarea.
HSD	Diferencia Honestamente Significativa ( Honestly significant difference).
IHHNV	Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética.
Kg	Kilogramo.

pH	Potencial Hidrogeno.
TA	Tratamiento A.
TB	Tratamiento B.
TSV	Virus del Sindorme de Taura.
WFS	Síndrome de las Heces Blancas.
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.
YHV	Virus de la Enfermedad de la Cabeza Amarilla.
TSA	Tryptona Soja
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
UFC	Unidad formadora de colonias
mm	Milímetros



## RESUMEN

Las patologías bacterianas en la producción larvaria de la Península de Santa Elena, han producido mortalidades de un cien por ciento hasta la fecha, esto ha sido generalizado en las diferentes provincias, teniendo un mayor impacto en la zona de Mar Bravo. Se ha calificado a las bacterias del género *Vibrio* como las responsables de enfermedades como síndrome de bolitas, síndrome de zoea y de mortalidad temprana (EMS), causadas por serotipos de bacterias *V. Harveyi*, *V. Vulnificus* y *V. Parahaemolyticus* respectivamente. Los laboratorios por el intento de recuperar la estabilidad de sus producciones, han implementado de manera rutinaria mejoras en los sistemas de bioseguridad y uso de profilácticos como una herramienta clave para producciones exitosas. Los principales productos incluidos en los protocolos de larvas de camarón, han sido los ácidos orgánicos, aceites esenciales y probióticos, los que en diferentes presentaciones y concentraciones han dado respuestas equivalentes superiores a los 2500 ppm, de manera individual o en mezcla. Se indica que algunos de estos productos no deben ser usados en simultáneo o de manera alternada para evitar la mortalidad de los probióticos, sin embargo, se han podido encontrar concentraciones que permitieron trabajar de manera sinérgica en una mezcla con todos, manifestando los mecanismos de acción de una manera letal, sobre las bacterias causantes de enfermedades.

Indudablemente las concentraciones mínimas inhibitoria de los profilácticos ensayados, demostraron controlar las cargas de bacterias patógenas, activar en el caso

de los probióticos su sistema inmune y sobre todo permitieron recuperar los records de producción. Para las 216 muestras analizadas dentro los cuatro laboratorios se empezó con cargas bacterias altas en los primeros estadios, que fueron identificadas mediante exámenes de patología en fresco, con la administración de probióticos en las larvas se logró bajar la carga bacteriana un 20% promedio. En cuanto a las identificaciones bioquímicas realizadas todas las cepas fueron patógenas, las mismas que fueron enfrentadas a probióticos, ácidos orgánicos y aceites esenciales para tener resultados de las concentraciones mínimas para administración en tanques.

## INTRODUCCIÓN

La explotación del camarón en el litoral ecuatoriano se origina al final de la década del sesenta referenciando los sectores beneficiarios como pioneros en provincia de El Oro. Dentro de la geografía orense, el cantón Santa Rosa fue el primer sector con producción y exportación del rubro en 1972. A partir de estas fechas, la producción comercial del camarón se diseminó por el litoral ecuatoriano llegando a mantener una industria que cronológicamente se ha ido manteniendo hasta la actualidad.(Delgado Samaniego, 2019).

Ecuador es un reconocido productor de camarón en el mundo, situándose como el primer productor a nivel de latino américa y en la actualidad el primer productor a nivel mundial, representa el segundo rubro más importante con mayor volumen exportable con 506 TM y 3.234 millones de dólares en 2018, año récord para la exportación nacional (Cámara Nacional de Acuicultura, 2019).

El camarón ecuatoriano que se explotaba en cautiverio pertenece a la clase *Litopenaeus vannamei*. Para la producción en cautiverio es necesario darle condiciones adecuadas de salinidad y temperatura, nutrientes, lo que estableció mejores opciones para su supervivencia. Estas condiciones deben prevalecer durante su estado de nauplios hasta

la cosecha sobre todo permitiendo combatir a los problemas bacterianos.(Procuador, 2019).

El camarón *L. vannamei*, fue considerada una de las principales especies cultivables de interés mundial, lo que ha con llevado a un incremento exponencial en su producción, esto llevó a restricciones en la industria camaronera gracias a inconvenientes de estrés que limitan el aumento, potencializan patologías infecciosas y no infecciosas; incrementando en enorme medida los recursos económicos invertidos en el proceso de producción (Dawood, M., & Koshio, 2016; Dawood, et al., 2018).

En algunas ocasiones las patologías fueron generadas gracias a las altas densidades de animales, en los estanques de cultivo que produjeron una mala calidad de agua y/o suelos que proporcionaron el desarrollo de patógenos oportunistas. Los síndromes y patologías son, en gran medida, la problemática que provocaron las pérdidas más sustanciales dentro del cultivo del camarón blanco, debido a las altas mortalidades. Estas fueron las enfermedades provocadas por bacterias, hongos y virus que produjeron patogénesis en los especímenes de cultivo, limitando el rendimiento de la industria del *L. vannamei*. (Cortes., 2021).

Es de relevancia destacar que la mayor producción de Postlarvas de camarón blanco se encuentra concentrada dentro de la provincia de Santa Elena, específicamente en los sectores de Mar Bravo y Punta Carnero pertenecientes al Cantón Salinas, aunque se ha extendido a otras comunidades a lo largo del perfil costero de la Provincia. (José, 2018), donde han sufrido los últimos años, mortalidades por el *Vibrio parahemolyticus* responsable del Síndrome de la mortalidad temprana (EMS), lo que ha conllevado a que este sector sea afectado económicamente.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen diversos productos de uso acuícola disponibles que han reemplazado a los antibióticos, los que eran utilizados para el control de bacterias patógenas. La prohibición de estos antibióticos en los estadios larvarios como la enrofloxacin, el cloranfenicol, nitrofuranos entre otros; debido a la amplia resistencia que han presentaron las bacterias han sido eliminados en la acuicultura.

Sin embargo antibióticos de amplio espectro como la enrofloxacin, que funcionaba de manera bactericida contra las bacterias del género *vibrio*, fueron prohibido su uso en acuicultura en todas las etapas de producción de camarones, lo que ha forzado a los productores a buscar productos amigables con el ambiente y con los sistemas productivos, que presenten la misma eficacia de control de bacterias patógenas incluso con la capacidad de disminuir la resistencia, la misma que se encontró bastante elevada.

Estrategias de productos profilácticos han sido los más aptos para reemplazar a los antibióticos, entre los que encontramos a los ácidos orgánicos de cadenas cortas, aceites esenciales y probióticos, los que con sus mecanismos de acción demostraron ser eficientes para atenuar las patologías en estadios iniciales. No obstante, la información

sobre el uso de estos productos en producción en su mayoría se manejó con dosis recomendadas por las empresas de producción de insumos acuícolas. El intercambio de información entre los vendedores y los técnicos de laboratorio se basaron en recomendaciones de interés comercial, donde se recomendaron concentraciones tan altas que no necesariamente han sido las dosis adecuadas para controlar las bacterias y menos para ayudar a las larvas. Algunas recomendaciones se suministraron dosis superiores a 15 o 20 mil ppm en alimentos balanceados o de 1 a 5 gramos por ton. de agua de tanques de larvicultura. Dichas concentraciones pudieron causar laceraciones a nivel de tracto digestivo, volviéndolos susceptibles a descamaciones de las paredes, siendo presa fácil de las bacterias que causan los síndromes más comunes en estadios de Zoea, impidiendo que las larvas coman y mueren por inanición.

Es de vital importancia conocer las concentraciones mínimas inhibitorias exactas, en las que se puedan controlar las bacterias patógenas, y sobre todo que no causen daños en la integridad fisiológica de los nauplios o larvas en los cultivos. Con tantos productos comerciales, algunos improvisados se desconoce la dinámica de acción que tienen estos compuestos orgánicos sobre las poblaciones de patógenos y como contribuyen a la sobrevivencia en los cultivos de *L. vannamei*, razón por la que metodologías microbiológicas y de M.I.C son las tecnologías correctas para poder evaluar y buscar la dosis correcta para cada laboratorio de larvas y evaluar la eficacia de dichas estrategias profilácticas. Es así que el objetivo de este trabajo es determinar

las evaluaciones de los productos profilácticos en dosis en las que podamos controlar

las bacterias patógenas asegurando corridas exitosas para beneficios de la industria

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Validar las estrategias profilácticas empleadas en larvicultura para el control de patologías bacterianas presentes mediante análisis de observación directa y microbiológicos.

### **Objetivos específicos**

- Identificar las posibles anomalías patológicas que se manifiestan en los diferentes estadios larvarios por patología en fresco.
- Cuantificar las bacterias presentes en los animales de cultivo evidenciando sus características morfológicas y bioquímicas.
- Comparar la carga bacteriana de Vibrios en los estadios muestreados
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los profilácticos frente a bacterias patógenas.
- Comprobar la capacidad antagónica de los probióticos analizado

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis De Trabajo**

Las estrategias profilácticas empleadas en los laboratorios son adecuadas para controlar las posibles bacterias patógenas y asegurar un buen estado de salud y calidad.

### **Hipótesis Alternativa**

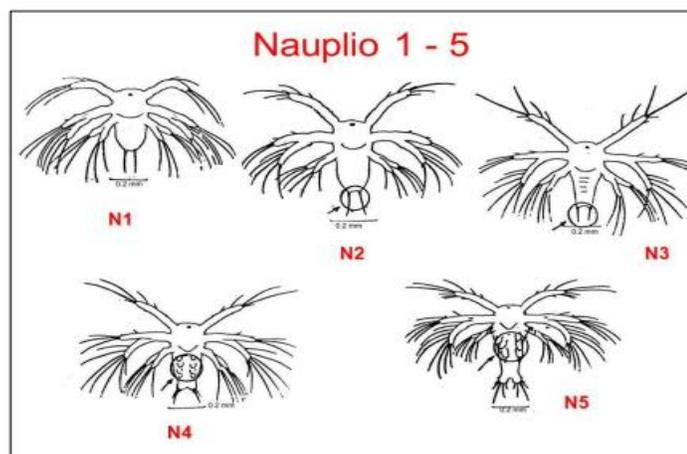
Las estrategias profilácticas empleadas en los laboratorios no son las adecuadas para controlar las posibles bacterias patógenas y asegurar un buen estado de salud y calidad.

## CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

### 1. 1. DESARROLLO LARVARIO

#### NAUPLIO:

Después de haberse llevado acabo la eclosión de los huevos dentro de 10-14 horas, el siguiente estadio larval se lo denomina nauplio, el mismo que a su vez tiene 5 subestadios (nauplio 1, 2, 3, 4, 5), toda esta fase dura aproximadamente de 40 - 50 horas, se caracterizan por tener una longitud de 0.5 mm y un ancho de 0.2 mm compuestos por un solo ocelo. Durante esta etapa se alimentan fundamentalmente de las reservas del vitelo (huevo) (FERNANDEZ, 2011)



*Figura 1. Nauplio*

*Fuente: Marcillo, 2014*

## ZOEA

Al concluir la etapa del estadio nauplio 5, los organismos vienen el estadio de zoea con sus tres subestadios (zoea 1, 2, 3), se los diferencia del estadio anterior por presentar cefalotórax, tiene una duración de 3 - 4 días, es decir aproximadamente un día por subestadios, su alimentación de basa fundamentalmente de micro algas presentes en el agua (por no presentar cavidad bucal desarrollada) (Aquino., 2013).



*Figura 2. Zoea*

*Fuente: Ángel, 2018*

## MYSIS

En este estadio se observa el cuerpo encorvado en la zona abdominal y nado mediante contracciones abdominales, este estadio posee tres subestadios con duración total de tres días, su alimentación se basa en alimento vivo, en este estadio ya pueden comenzar a consumir alimentos sólidos (Villacres., 2016).

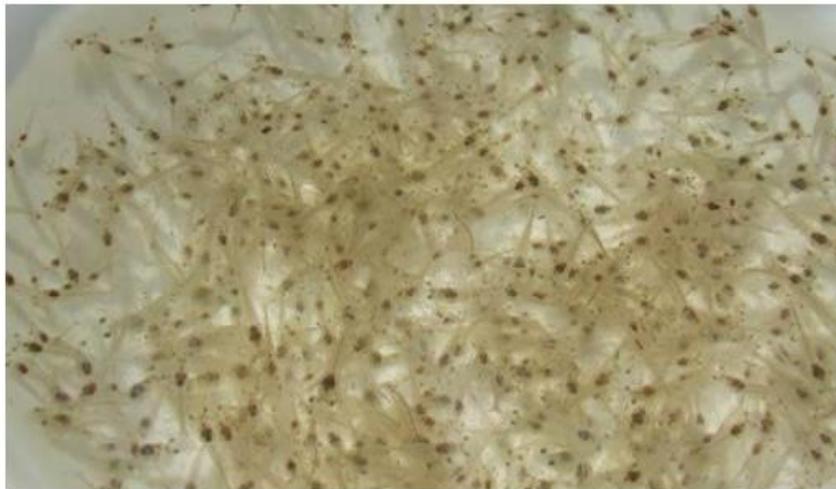


*Figura 3. Mysis*

*Fuente: Central Michigan University*

## POST LARVA

El último estadio se lo otorga para post larva, tienen duración de 20 días hasta que se los considera camarones (post larvas 1; 20), su tiempo aproximado es de 20 días es decir un día por subestadio, son animales totalmente funcionales similares a camarones en miniatura, poseen pereiópodos para agarrarse y arrastrarse, su alimentación se basa en alimento sólido y Artemia (Carvajal, 2016).



*Figura 4. Post larva*

*Fuente: Sagarpa, 2014*

## **1.2 PRINCIPALES PATOLOGIAS BACTERIANAS EN LARVICULTURA.**

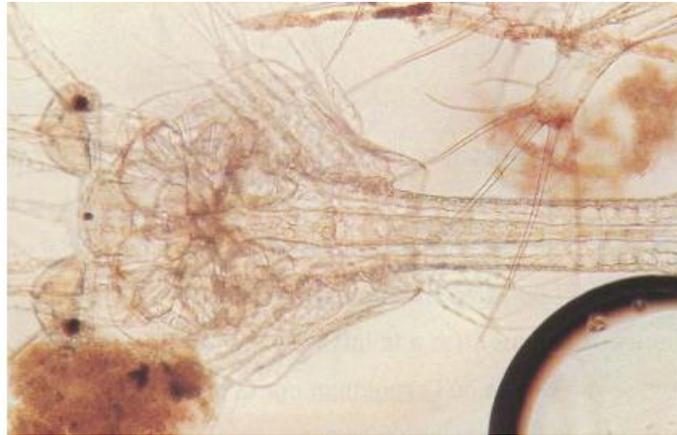
### **ENFERMEDADES BACTERIANAS EN LA LARVICULTURA DE *Litopenaeus vannamei*.**

Varias enfermedades han afectado a la producción de los laboratorios ecuatorianos, especialmente a los de mayor tamaño. Los gérmenes pueden ser de naturaleza viral, bacteriana, parasitaria o micótica (Tulio & Prado , 2017). Las bacterias están implicadas en enfermedades y mortalidades de peneidos cultivados, especialmente en los estadios de larva, postlarva y juvenil. Las infecciones bacterianas en camarones, pueden tomar tres formas generales: erosión de la cutícula cubriendo la superficie del cuerpo, branquias y apéndices (necrosis bacteriana y enfermedades cuticulares); lesiones localizadas dentro del cuerpo y septicemias generalizadas (Monrroy, 2015).

#### **1.2.1. SINDROME DE BOLITAS:**

Sin duda, la enfermedad más común, conocida como “bolitas” ha provocado desde su aparición en 1987 elevados porcentajes de mortalidad en los laboratorios afectados. Los síntomas observados consisten en una descamación de las células de las paredes del hepatopáncreas e intestino de las larvas, que mueren en pocas horas, pudiendo perderse casi el 100% de la población (Siñoes., 2007). Esta enfermedad, es causada por

una bacteria identificada mediante pruebas bioquímicas como *Vibrio harveyi*, se ve agravada por factores como los altos recuentos bacterianos en los tanques, las bajas temperaturas o nauplios débiles.



*Figura 5. Síndrome de bolitas*

*Fuente: Hernández, 2007*

### **1.2.2. SÍNDROME DE ZOEIA.**

Esta caracterizado por la reducción en la tasa de alimentación, incapacidad para la metamorfosis seguido de altas mortalidades, varios estudios microscópicos revelaron anomalías sistémicas en las larvas afectadas y manifestaciones patológicas en el hepatopáncreas e intestino. En los análisis microbiológicos se revela que la predominancia de *Vibrio vulnificus* afectando a los organismos.

En un examen histológico en el hepatopáncreas y el intestino revelaron vacuolización, desprendimiento de células epiteliales y desintegración de la membrana peritrófica del epitelio intestinal (Kumar, 2017).



*Figura 6. Síndrome de Zoea 2*

*Fuente: Morales, 2017*

### **1.2.3 SÍNDROME DE LA MORTALIDAD TEMPRANA (EMS o AHPND).**

Recientemente una de las enfermedades que ha afectado al camarón blanco, es conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS), que viene generando pérdidas significativas entre los productores de mayor peso como es en China (2009), Vietnam (2011) y Tailandia (2012). Los principales signos clínicos en camarones enfermos con EMS se encuentran; el nado errático, crecimiento reducido, coloración pálida o blanquecina y manchas en la hepatopáncreas, tamaño de la hepatopáncreas reducido, textura blanda del exoesqueleto, intestino con frecuencia entrecortada de alimento o sin alimento. (OSPESCA, 2013).

Las estimaciones anteriores del impacto económico acumulativo de AHPND han oscilado entre \$ 8 mil millones (EE.UU.) para Asia y \$ 4 mil millones para Estados Unidos. Sin embargo, en los últimos años, la producción de camarón ha mejorado en países previamente afectados por AHPND, ya que los productores han probado, mejorado y adaptado prácticas de cría que mitigan importantes factores de riesgo ambiental, y a medida que han evolucionado el conocimiento de las características moleculares, los métodos de detección y las opciones para el manejo de AHPND. (Araguren ., 2020) En los laboratorios de producción larvaria, las zoeas, mysis, y hasta las poslarvas que presentan infección bacteriana, con o sin luminiscencia, se observan con intestinos vacíos, nado errático, acumulación de materia orgánica en branquias,

con la subsecuente melanización y necrosis de los apéndices, las mortalidades reportadas en estos cultivos pueden variar desde el 20% al 90% (CNA, 2017).



*Figura 7. Juveniles, al lado izquierdo con EMS y lado derecho norma*

*Fuente: Cuéllar, 2015*

#### **1.2.4 HEPATOPANCREATITIS NECROTISANTE (NHP).**

Esta enfermedad se encuentra distribuida mundialmente y se la puede reportar en laboratorios de larva, así como, en camaroneras; varias investigaciones determinan que las condiciones de estrés en los organismos son el primer causante para que existan patologías.

En el campo patológico existen bacterias de acción patógena dadas por toxinas y otras que infectan al interior de la célula eucariota, los investigadores han dado importancia a dos aspectos: el mecanismo de entrada de las bacterias a las células y la manera que la que pueden sobrevivir al interior. Cuando una bacteria está dentro de la célula eucariota esta se vuelve mucho más resistente a los antibióticos. Entre los géneros pertenecientes están *Brucella*, *Legionella*, *Mycobacterium* y *Salmonella*. (Sanjuan., 2013). Reciente estudios han demostrado que, aunque no sea una enfermedad totalmente detectada en larvicultura la incidencia puede darse y los ácidos orgánicos aceites esenciales han demostrado ser una alternativa para su control.



*Figura 8. Juveniles, animal de la parte inferior afectado por NHP*

*Fuente: GLOBAL SEAFOOD*

### **1.3. CONSECUENCIAS DE LAS ALTAS BACTERIAS EN CULTIVOS ACUÍCOLAS**

Algunas de las enfermedades de los *Peneidos* son consecuencia del sistema de cultivo empleado (intensivo, semi-intensivo y extensivo) (FAO, 2004 ). Por ejemplo, una de las posibles causas de la proliferación bacteriana, es la alta densidad de camarones (sistema intensivo), lo que permite la adaptación y selección de cepas virulentas de bacterias oportunistas asociadas al camarón y cepas patógenas que se encuentran normalmente en el medio acuático. Además, estas condiciones de cultivo pueden estresar a los animales, afectar su fisiología y su capacidad inmunitaria, trayendo como consecuencia la sensibilidad de los animales a bacterias oportunistas y normalmente poco patógenas (Guarnner., 2018).

Dentro del ecosistema “artificial” que constituye el criadero, se instala una microflora diferente a la del medio marino natural. Las poblaciones bacterianas de tipo “primario”, dan paso a una microflora de “regeneración”, característica de los medios ricos en materia orgánica. (Suquilanda., 2017).

La utilización de antibióticos también altera la microflora de las piscinas, pues puede provocar una reducción de la diversidad bacteriana que puede ser en detrimento de

ciertas bacterias favorables y contribuye al desarrollo de bacterias patógenas (Guarnner., 2018).

En la acuicultura, se puede tener no solamente la aparición de numerosas cepas patógenas sino también su dispersión debido a la ausencia de medidas profilácticas y de diagnóstico. Otro riesgo está relacionado a las perturbaciones del medio ambiente, debido a que los animales cultivados no se pueden adaptar tan rápidamente como los microorganismos.

Algunos casos de septicemia se han presentado en tanques que han tenido varios ciclos completos de producción seguidos, sin espacios de tiempo de secado, lo que provee el tiempo necesario para la selección de cepas bacterianas virulentas (Jimenez, 1992).

Dentro del ecosistema “artificial” que constituye el criadero, se instala una microflora diferente a la del medio marino natural. Las poblaciones bacterianas de tipo “primario”, dan paso a una microflora de “regeneración”, característica de los medios ricos en materia orgánica.

La utilización de antibióticos también altera la microflora de las piscinas, pues puede provocar una reducción de la diversidad bacteriana que puede ser en detrimento de ciertas bacterias favorables y contribuye al desarrollo de bacterias patógenas (Guarnner., 2018).

En la acuicultura, se puede tener no solamente la aparición de numerosas cepas patógenas sino también su dispersión debido a la ausencia de medidas profilácticas y de diagnóstico. Otro riesgo está relacionado a las perturbaciones del medio ambiente, debido a que los animales cultivados no se pueden adaptar tan rápidamente como los microorganismos.

#### **1.4. ESTRATEGIAS DE DESINFECCIÓN EN SISTEMAS LARVARIOS.**

En los laboratorios comerciales del Ecuador, la mayoría de las prácticas de manejo tuvieron como objetivo controlar el desarrollo de bacterias patógenas, mediante la desinfección del agua (tratamiento con UV, cloración, filtración, etc.), utilización de stocks de algas estériles, limpieza de Artemia y prácticas de higiene tales como desinfección del equipo, baños para pies, etc. Además, para prevenir o combatir las enfermedades provocadas por bacterias, se ha hecho uso de los antibióticos, los cuales utilizados en pequeñas dosis y sobre largos periodos de tiempo, han permitido un

incremento del número de poblaciones bacterianas resistentes haciendo dificultoso un tratamiento efectivo, fenómeno que ha sido ampliamente descrito en medicina humana y animal. Al parecer la mayoría de las bacterias que afectan al camarón son patógenos oportunistas que forman parte de su microflora normal (Molina. C. , 2021). Los vibrios han sido identificados como el género dominante en la flora bacteriana normal de muchos crustáceos marinos y también como las principales bacterias involucradas en las enfermedades del camarón (SanMiguel, 1996).

#### **1.4.1. ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS PARA EL CONTROL DE PATOLOGÍAS BACTERIANAS**

La profilaxis tuvo como objetivo la prevención de enfermedades a través de medidas y procesos para mantener un ambiente estable y equilibrado para el cultivo, por lo tanto, para lograr la profilaxis se pueden hacer uso de microorganismos benéficos como también productos que provienen de animales. Esto ayudó y mejoró el crecimiento como la supervivencia del organismo en cultivo, sin causar algún efecto perjudicial y residual en el medio ambiente haciendo de esta una actividad amigable con el ecosistema. (Vega., 2019)

Para ello, existieron tratamientos idóneos para sanar los cultivos, los autores (Gutiérrez., 2015), ayudaron también el uso de alimentos a base algas, proteínas que

ayudan a promover el crecimiento y la buena digestión. Las algas permitieron incrementar la resistencia del camarón contra cualquier infección bacteriana, por lo consecuente también aumentaron la supervivencia entre otros síntomas patógenos como la mancha blanca entre un 40% a 96% de enfermedades virales.

El primordial componente limitante para el triunfo de la camaronicultura mundial, radicó en la actualidad en el control de las infecciones, primordialmente las de procedencia viral. Las altas densidades poblacionales comúnmente usadas en los cultivos, proporcionaron la inmediata propagación de los agentes infecciosos, resultando principalmente en mortalidades masivas y provocando, como resultado, males económicos incalculables. En la actualidad, la profilaxis y el control de las patologías en los cultivos se circunscriben fundamentalmente a la práctica correcta del funcionamiento y el decrecimiento de las condiciones de estrés, una vez que los componentes que determinaron el estado de salud de los camarones, aún son bastante poco conocidos. (Cuéllar., 2018)

El cultivo de crustáceo, sobresale en este entorno como una fundamental opción para la producción instantánea y en enorme escala de alimento para consumo humano, contribuyendo además con la defensa de las poblaciones naturales de una desmesurada sustracción. En la actualidad, cerca del 30% de los camarones consumidos en el planeta

son provenientes del cultivo y las especies marinas más cultivadas son los penaeidos *Litopenaeus vannamei* (40,66%), *Penaeus monodon* (37,41%) y *Fenneropenaeus chinensis* (10,97%). (FAO, 2017)

#### 1.4.2 PROFILAXIS CON PROBIÓTICOS.

Innumerables son los beneficios que se le atribuyen al uso de productos naturales como son los probióticos ya que son catalizadores que favorecen el crecimiento y desarrollo de los animales de cultivo, mejoran la resistencia inmunológica poblando el tracto digestivo como huéspedes y desplazando las bacterias patógenas, entre ellos tenemos algunas especies *Lactobacillus acidophilus*, *L bulgaris*, *Bifidobacterium bifidum*, y *B. infantis* (Milian, 2005).

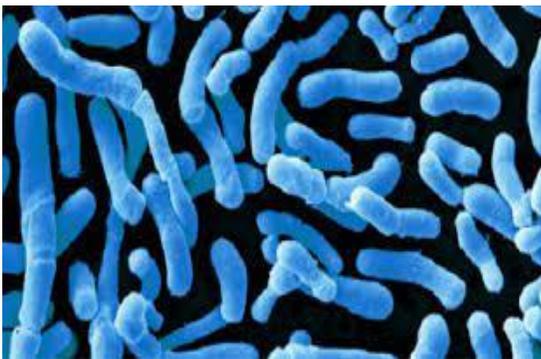


Figura 9. *L acidophilus*



Figura 10. *L bulgaris*

Fuente: García, 2016

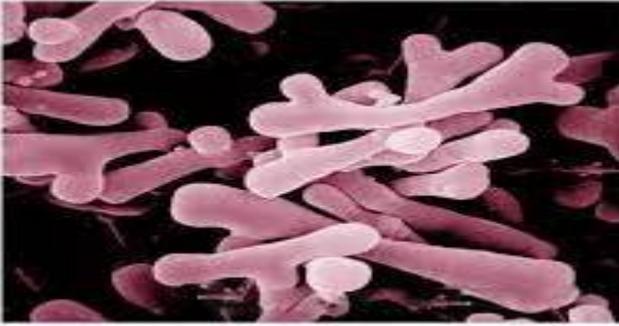


Figura 11. *B. bifidum*

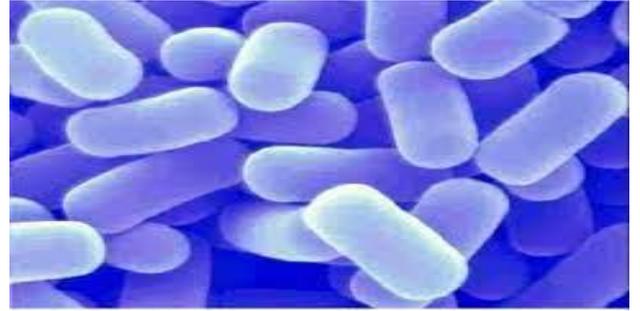
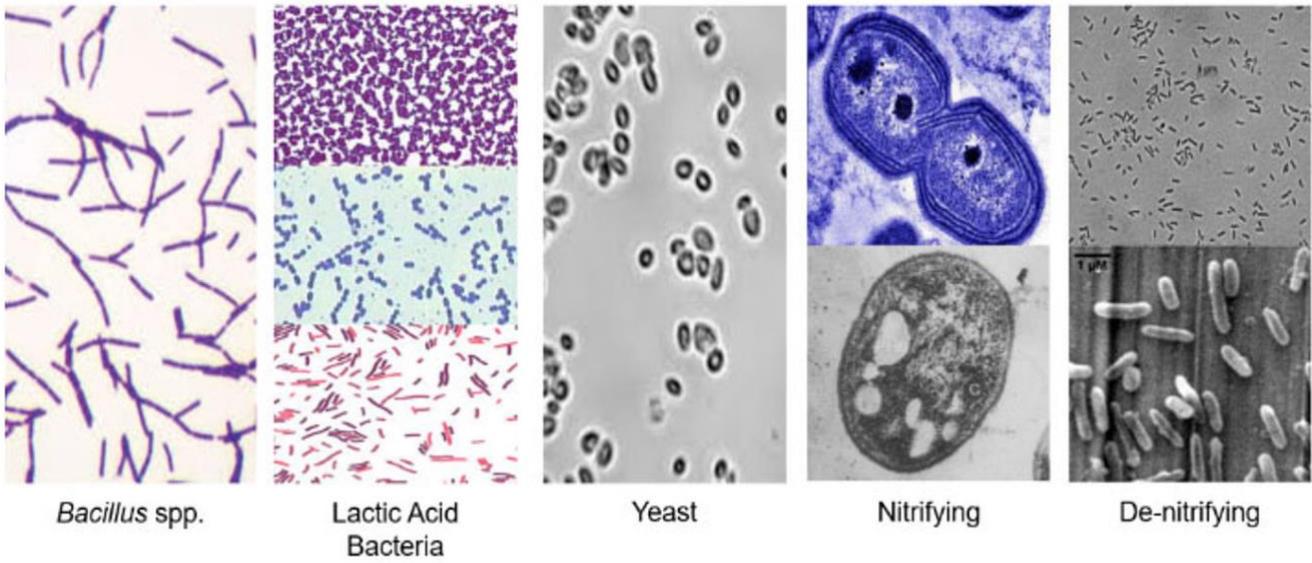


Figura 12. *B. inanius*

Fuente: García, 2011



*Bacillus* spp.

Lactic Acid  
Bacteria

Yeast

Nitrifying

De-nitrifying

Figura 13. Principales géneros de bacterias probióticas

Fuente: Biomin. 2008

Los probióticos originan sustancias inhibidoras que se interrelacionan con patógenos virales y bacterianos en donde producen nutrientes adaptando a condiciones físicas en el ambiente de la piscina, desarrollando la producción enzimática componente idóneo al aumento digestivo, el alimento puede contaminarse de patógenos en el proceso de la producción, almacenamiento, utilización de productos utilizados como ingredientes en el alimento y transporte. Los riesgos biológicos que pudieron encontrarse por una mala práctica en el manejo o también por el ambiente son virus, bacterias, hongos y parásitos. (Trujillo, 2015). Estos pudieron ser suministrados por varias vías como agua, suelo alimento también en combinación con otras sustancias benéficas. (Toledo, 2018).

### **1.4.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS**

Estas bacterias benéficas ayudan en el cultivo larvario de la siguiente manera:

- Incluyen inducción a pH inferior a 4
- Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas
- Producción de ácido láctico
- Disminución de la permeabilidad intestinal
- Aumento de la actividad de la lactasa
- Efecto competitivo en otras bacterias patógenas
- Efectos sobre la inmunidad

Entre los probióticos más usados tenemos:



*Figura 14. Bacteria HGS-7*

*Fuente: Agripac, 2019*



*Figura 15. AQUASTAR*

*Fuente: Biomin, 2009*



*Figura 16. Pond Plus*



*Figura 17. Pondtox*

*Fuente: Ecuquímica, 2011*

#### **1.4.4. PROFILÁXIS CON ÁCIDOS ORGÁNICOS**

Los ácidos orgánicos son compuestos seguros, utilizados como antimicrobianos en la industria de alimentos para el cultivo de organismos (Defoirdt et al., 2009). Los ácidos orgánicos pudieron mejorar el rendimiento de los cultivos, aumentando la eficiencia de la utilización de nutrientes y modificando la microbiota intestinal, ayudando a controlar las enfermedades causadas por bacterias, y parásitos intestinales (da Silva et al., 2014).

La acción antimicrobiana primaria de los ácidos orgánicos altera el pH celular de las bacterias, inhibiéndolas, reduciendo así las bacterias dañinas dentro del tracto gastrointestinal del animal huésped, con lo cual frenan la colonización por posibles patógenos y sus compuestos metabólicos virulentos (Kumar *et al.*, 2016). Entre los principales ácidos orgánicos tenemos: el ácido propiónico. Ácido butírico. Ácido cítrico, ácido fumárico, entre otros, empleados con productos comerciales en el Ecuador con bastante éxito.

En la actualidad las sustancias naturales usadas con efecto antimicrobiana, como el ácido láctico que permitieron cuidar la salud del camarón ante diferentes tipos de enfermedades de forma natural sin usar componente químicos abrasivos que contaminen la calidad del agua. Según (Uña, 2017) detallan al uso de los *Lactobacillus* suministrando en una dosis adecuada al estaque según la densidad del agua cada 24

horas para aumentar el desarrollo de las enzimas optimizando indicadores cuantificables en el aspecto inmunológicos.

#### 1.4.5. PRINCIPALES ÁCIDOS ORGÁNICOS EMPLEADOS

Entre los principales ácidos orgánicos empleados en la acuicultura podemos citar entre los principales ácidos fórmicos, ácido propiónico, ácido láctico, ácido acético, ácido sórbico o ácido cítrico, tienen una estructura alifática y representan una fuente de energía para las células. El ácido benzoico, en cambio, está construido sobre un anillo aromático y tiene diferentes características metabólicas y de absorción. (Tabla 1)

Con el adiconamiento de estos ácidos en los camarones ha demostrado mejorar la tasa de conversión alimenticia y han reducido la colonización de los patógenos en el intestino. (Magazine, 2021)

Ácido	Masa molar (g/mol)	Densidad (g/ml)	Estado físico	pKa
Fórmico	46.03	1.220	líquido	3.75
Láctico	90.08	1.206	líquido	3.83
Acético	60.05	1.049	líquido	4.76
Sórbico	112.14	1.204	sólido	4.76
Propiónico	74.08	0.993	líquido	4.88
Benzoico	122.12	1.270	sólido	4.20

*Tabla 1. características físicas de los principales ácidos orgánicos*

*Fuente: Krish, 2010*

#### **1.4.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LAS BACTERIAS PATÓGENAS**

Los ácidos orgánicos actúan ante las bacterias patógenas de la siguiente manera:

- 2 Potencial reemplazo de antibióticos para el control de bacterias patógenas
- 3 Mejoran la palatabilidad y ayudan a la ingesta de alimento
- 4 Mejoran el metabolismo intermedio mediante el aprovechamiento energético
- 5 Mejora la palatabilidad del alimento asegurando su ingesta
- 6 Quelan ciertos minerales en el alimento balanceado incrementando su absorción.
- 7 Inhibición de la microflora autóctona Gram negativa en el trasto intestinal.
- 8 Mediante la liberación de iones de hidrogeno tiene una reducción del pH, activando el pepsinógeno para formar pepsina y mejorando la digestibilidad de las proteínas.
- 9 Capacidad amortiguadora, así como los efectos antibacterianos y anti fúngicos en el alimento. (Magazine, 2021)

#### **1.1.7 PROFILÁXIS CON ACEITES ESENCIALES**

Estos compuestos son líquidos lipofílicos producidos como metabolitos secundarios, que contienen sustancias responsables del aroma de las plantas, atracción de polinizadores y resistencia a una amplia variedad de patógenos; de ahí que fueron considerados como posibles antibacteriales, su accionar se basó en destruir la pared celular y membrana citoplasmática de las bacterias, modificaron la estructura de la

pared celular afectando la permeabilidad, bloqueando la síntesis de proteínas, ATP y ADN, inhibir la secreción de enzimas e interferieron con la comunicación bacteriana vía quorum sensing. (Molina., 2021).

La caracterización es por incremento de carácter d atributos antimicrobianos el cual serian el carácter hidrófilo o hidrófobo que dio a la alteración y penetración de la estructura lipídica en la pared celular, ocasionando desnaturalización y eventualmente la muerte celular. También esta los compuestos químicos intervinieron en la translocación de protones y fosforilación del ATP. Y por último el ataque a las bacterias Gram negativas las cuales tuvieron mejor susceptibilidad a diferencia de las Gram positivas in-Vitro. (Ortega., 2018 ).

Existen varios aceites esenciales que son utilizados en el área de acuicultura, entre los primordiales están:

- Aceite esencial de *Organum vulgare* (EOOv),
- Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (EOMa)
- Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (EOCc)
- Aceite esencial de *Cinnamomum verum* (EOCv)
- Aceite esencial de *Thymus vulgaris* (EOTv).



Figura. *Organum vulgare*



Figura. *Melaleuca alternifolia*

Fuente: Zamora,2016



Figura. *Cymbopogon citratus*



figura. *Cinnamomum verum*

Fuente: Zamora,2016



Figura. *Thymus vulgaris*

*Fuente: Zamora,2016*

#### **1.4.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS.**

Los aceites mediante los principios activos pueden inhibir este sistema de comunicación es una estrategia prometedora que controló las bacterias patógenas, por lo tanto, interfieren con el *quorum sensing* bacteriano a concentraciones mucho más bajas que las necesarias para destruir a las bacterias. (Guitierrez, 2018)

Entre los mecanismos de acción tenemos:

- Toxicidad en la pared celular
- Acción sobre la síntesis de proteínas
- Reducción de los niveles intracelulares de ATP

- Reducción del ph intracelular
- Cambios en el citoplasma (Guitierrez, 2018)

### **1.5. CONTROL BACTERIOLOGICO.**

Los principales productores primarios en ecosistemas acuáticos son: bacterias autótrofas, bacterias heterótrofas, macroalgas, fitobentos, fitoplancton y fanerógamas marinas. De las comunidades mencionadas las que aportan en los estanques de cultivo de camarón principalmente con respecto a biomasa es el fitoplancton, no obstante, las bacterias contribuyen significativamente en el proceso del cultivo (Fennuci, 2006).

Cuando se sospechó de problemas de enfermedades en un cultivo es necesario realizar un análisis bacteriológico del camarón, el se basó en sembrar muestras de larvas para comprobar si existe o no crecimiento de bacterias patógenas en diferentes medios de cultivo y nos sirve como aporte para realizar el diagnóstico de enfermedades en camarones.

Si existe un incremento del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo seleccionado se realizó el conteo de colonias, las mismas que se pueden hacer mediante dos métodos

de observación: a trasluz o con un aparato especial para conteo. Los valores se dan en unidades formadoras de colonias (UFC) tomando en cuenta que en estadios larvarios o pos larvales los valores son en UFC/g o a su vez por cada “X” número de organismos y si se toma muestras de hemolinfa o agua, los resultados se dan en UFC/ml (Morales & Cuéllar, Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos (Segunda ed.), 2014).

.

### **1.5.1. HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO DE VIBRIOS.**

Puede ser basado en el aislamiento del *Vibrio spp.* del tejido o de la hemolinfa colectados asépticamente de camarones moribundos, estas bacterias pueden ser aisladas en agar TCBS, agar Soya Trypticase o agar de sangre, suplementando con 0.5 a 3% de CINa o agar Marino Zobell. La bacteria aislada puede ser identificada usando la rutina mediante el examen bioquímicos, y morfológicos. El diagnostico de Vibriosis basado en el aislamiento de la bacteria *Vibrio* proveniente de camarones moribundos puede ser confirmado con los resultados de estudios microscópicos o histopatológicos (Soluap, 2019).

Se basó en el aislamiento de las especies de vibrios a partir de macerados de huevos que no han eclosionados, nauplios y larvas de camarón, de igual forma macerados de nauplios de artemia, aguas, etc. Muestras que deberán ser sembradas en Agar TCBS TSA, Marino o Agar sangre adicionado de cloruro de sodio al 3%. Las colonias de

*Vibrio parahaemolyticus* en el agar TCBS y después de una incubación de 18 a 24 horas a 30 – 32°C son pequeñas de color azul verdosa debido a las propiedades alcalinas (pH 8.2) que necesita para su crecimiento (Soluap, 2019).

El *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginus* degradado y fermentado, la sacarosa que tiene el agar TCBS produciendo una acidez dando colonias de color amarillo, que para el *V. alginolyticus* son grandes, ligeramente mucosas y brillantes, mientras que *V. anguillarum* y *V. alginus* son de carácter pastosas y más pequeñas (Soluap, 2019).

Otras pruebas para la identificación son las pruebas bioquímicas y confirmatorias para un diagnóstico certero de estas especies. Es con la ayuda de medios de cultivos diferenciales como el agar TSI adicionado de ClNa, pruebas de mortalidad, indol, rojo de metilo utilización del citrato, de la urea, fermentación de los azúcares, test de catalasa y oxidasa, pruebas del metabolismo respiratorio oxidativo como fermentativo, crecimiento a diferentes concentraciones de sal, etc. (Soluap, 2019). La prevención de la Vibriosis y otras infecciones implica condiciones favorables del cultivo como ser una densidad apropiada de animales, buenas condiciones de calidad de agua, adecuada nutrición y un correcto uso de agentes químicos (Soluap, 2019).

## **1.5.2 TÉCNICAS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO**

### **1.5.2.1. METODO TRADICIONAL:**

Este método microbiológico clásico, descrito por (Carrasco ., 2004) tiene las siguientes fases:

- (1) Dilución de la muestra,
- (2) Cultivo en medios de cultivos generales, los mismos que proporcionan las condiciones de crecimiento para todos los microorganismos de la muestra,
- (3) Cultivo en medios específicos; para la selección de grupos de organismos,
- (4) Conteo e
- (5) Identificación taxonómica mediante la evaluación de parámetros bioquímicos.

Para lograr estudiar las bacterias es necesario que cultivarlas en un medio ya sea líquido ó sólido y así obtener un crecimiento. Estos medios de cultivo contienen una variedad de nutrientes que van desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Se usa esto para el asilamiento o purificación una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización. (Pozo., 2005)

Debido a que el mundo de las bacterianas es inmenso y a que estas tienen rasgos, formas, colores muy parecidos; en ocasiones resulta complicado distinguir las a simple vista o con el uso del microscopio; en este caso, para identificar cada tipo de bacteria, se estudian sus características bioquímicas sembrándolas en medios de cultivo especiales. Así, algunos medios contienen un producto que inhibe el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas, pero no la del tipo que deseamos averiguar si está presente. (Vega., 2019).

El método tradicional es ventajoso por varias razones como ser sencillo en su manejo y uso económico lo que permite estimar la diversidad bacteriana en sistemas de cultivos mediante conteos directos o cultivo de bacterias viables en placas (Kirk, L.A. Beaudette, & P. Moutoglis, 2005).

Según (Pozo., 2005), existen varios tipos de medios de cultivos que son utilizados según el requerimiento del microorganismo, estos medios se clasifican según:

### **Medios Selectivos**

Permite el desarrollo de un grupo de bacterias, inhibiendo al mismo tiempo el crecimiento de otros grupos.

### **Medios Diferenciales**

Estos medios permiten diferenciar determinadas características metabólicas que presentan ciertos grupos bacterianos.

### **1.5.3. MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS**

Algunas bacterias pueden crecer satisfactoriamente en cualquier medio de cultivo, otras necesitan medios especiales. Entre los requerimientos para el crecimiento microbiano tenemos requerimientos físicos como temperatura, pH, presión osmótica y requerimientos químicos del agua, fuentes de carbono, contenido de nitrógeno y oxígeno. (Pozo., 2005)

Otros medios de cultivo contienen determinados azúcares que sólo pueden utilizar algunas bacterias. En algunos medios se añaden indicadores de pH que cambian de color cuando uno de los nutrientes del medio es fermentado y se generan catabolitos ácidos. En otros casos si las bacterias son capaces de producir fermentación, generan gases que pueden ser apreciados cuando el cultivo se realiza en un tubo cerrado (Carvana., 2019).

- Agar Thiosulfato Citrato Sales Biliares (Thiosulfate Citrate Bile Salt, TCBS)

Medio selectivo y diferencial para el desarrollo de vibrios patógenos por aislamiento, según (Kobayashi, 2018), este medio inhibe el crecimiento bacteriano para algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Pseudomona* y bacterias gram

positivas debido al pH 8,6 y al 0,5% de NaCl que contiene, este medio ayuda a la identificación por medio de la diferenciación de especies que fermentan la sucrosa es empleado para aislamientos de muestras ambientales y como medio diferencial para *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ya que estos fermentan básicamente la sacarosa. (L, 2017)

## **1.6. TÉCNICAS DE AISLAMIENTOS PARA OBTENER CULTIVOS PUROS**

### **1.6.1 TÉCNICA DE INOCULACIÓN**

Es una técnica usada para el aislamiento de colonias permite el recuento de bacterias viables en la muestra si se conoce exactamente el volumen de la muestra sembrada. (Pozo., 2005). Si la siembra se ha realizado de forma correcta podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma color y textura (Carvana., 2019).

Existen varios métodos para el aislamiento:

- (1) Sembrado por estrias en medio sólido,
- (2) Incorporación en medio sólido fundido (vertido en placas),
- (3) Dilución en un medio líquido,
- (4) Cultivo y agitación agar (“roll tubes”),
- (5) Aislamiento a partir de una sola célula. (Carvana., 2019)

## **1.7. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

Esta prueba se realizó con el objetivo de identificar el agente etiológico que es el responsable de un agente infeccioso, con el cual se determinó los procesos o implicaciones patogénicas o patológicas. En la microbiología se aplican una serie de procesos que dan una asignación del microorganismo encontrado.

### **1.7.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas. Los laboratorios deben elaborar y realizar un proceso de identificación normalizado en su actividad diaria, que utilice de forma secuencial o simultánea un conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie y que incluya la mayoría de las bacterias desde el punto de vista infeccioso. (Cercenado., 2013)

En el proceso de identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento:

- Todas las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación, pero en principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar, como la morfología en la tinción de Gram u otras tinciones, crecimiento en diferentes atmósferas de incubación, crecimiento en varios tipos de medios de cultivo, oxidasa y catalasa.
- El segundo nivel de identificación debe especificar el género al que pertenece el microorganismo.
- Por último, la conclusión debe hacerse con la identificación a nivel de especie.

### **1.7.2 TINCIÓN DE GRAM**

Las tinciones más utilizadas e imprescindibles son la del azul de metileno y la de Gram. La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso. (Cercenado., 2013)

Estos son algunos de los términos utilizados para preparaciones teñidas:

- tinción: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
- Forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.

- Cápsula: presente o ausente
- Endosporas: ovals, esféricas, terminales, subterminales
- Tamaño: cortos, largos, etc.
- Bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares
- Extremos: redondeados, puntiagudos
- Disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.
- Formas irregulares: variación en forma y tamaño, ramificados, fusiformes, etc.

### **1.7.3 MORFOLOGÍA DE COLONIAS**

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación bacteriana ya que es el paso que nos permite la diferenciación de los microorganismos; para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos, así como, es importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color. (La Scola., 2015)

#### **1.7.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas. (Bizzini A, 2010).

#### **1.7.5. MÉTODO API 20E V4,1**

Es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 test bioquímicos miniaturizados, así como una base de datos. Se compone de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados, en estos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye. A partir de las reacciones producidas durante el periodo

de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la Tabla de Lectura, y la identificación se obtiene con la ayuda del Catálogo Analítico o del software de identificación. (BioMerux, 2010).

## **1.8. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA**

Se la define como la concentración más baja (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de un probiótico, ácido o aceite esencial que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana, esta técnica es utilizada habitualmente para la prueba de sensibilidad in vitro ha sido la difusión en agar (método de Kirby-Bauer). (IDEXX, 2018). En el campo de la acuicultura es usada para determinar la concentración ideal de dicho producto, sea este probiótico, aceite esencial o ácido orgánico ante las principales cepas patógenas que existen en el medio ambiente.

## **1.9. ANTIBIOGRAMA**

La sensibilidad antimicrobiana se midió utilizando el método de Bauer et al., (1962), recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Para ello se resembraron las cepas aisladas haciendo agujeros en el agar sólido dentro

de la placa Petri, para poder medir la respuesta de sensibilidad mediante la formación de un halo de inhibición en milímetros.

#### **1.10. PROTOCOLOS DE MANEJO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN LARVARIA.**

La distribución de los laboratorios en la Provincia de Santa Elena, es considerada como la zona de abastecimiento a todo el sector de piscinas de engorde, estos en los últimos años han tenido un crecimiento exponencial, lo que ha incrementados la cercanía entre ellos.

Es ya conocido que Mar Bravo, ha sido conocida como la que mayores impactos patológicos ha presentado, especialmente por bacterias patógenas. Este sector en la actualidad con más de 120 laboratorios de cultivos semi intensivo en funcionamiento, con 116 de larviculturas, 12 maduraciones, 2 reserva de reproductores y 12 laboratorios integrales. Para el área de estudio en el sector Mar Bravo se reportaron 45 laboratorios (8 maduraciones, 5 integrales y 38 de semicultivo), con un sistema de manejo semi intensivo con una producción superior a los 3000 millones de nauplios de siembra por corrida entregando más de 200 millones diarios a los laboratorios aledaños. (CNA, 2019).

## **CAPITULO 2. MARCO METODOLÓGICO**

### **2.1 TIPO DE ESTUDIO**

El enfoque planteado para el desarrollo de esta investigación fue cuantitativo de aplicación directa a la producción, permitiéndonos mantener el enfoque cuantitativo, experimental, correlacional, permitiendo conocer mediante mediciones comparativa de los tanques que tuvieron la aplicación de los productos profilácticos a medir.

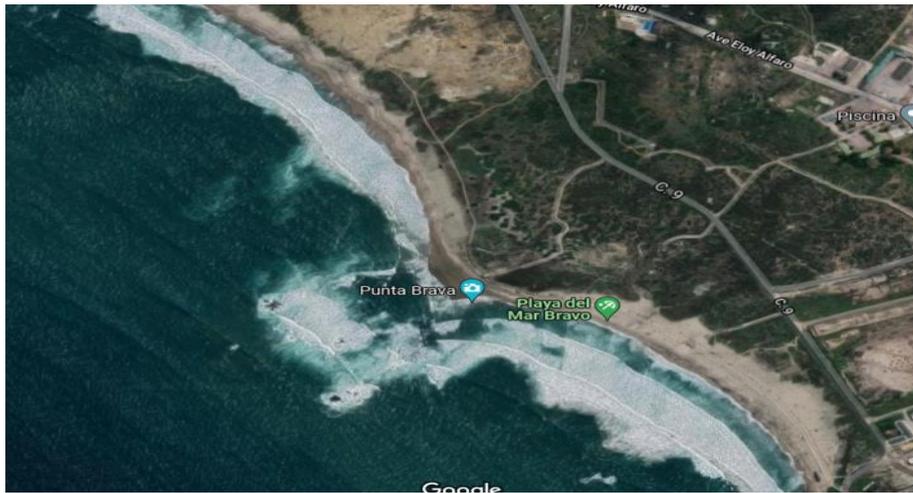
De acuerdo a las diferentes mediciones es un estudio transversal, en la determinación de la variable dependiente en determinar la carga bacteriana, por el número de veces en que estas fueron medidas.

El muestreo fue realizado en la época del año correspondiente a la etapa estacional considerada como transitoria o de cambio de estación, comprendiendo los meses de octubre, noviembre, diciembre y parte de enero.

### **2.2 ÀREA DE ESTUDIO**

La playa de estudio la zona de Mar Bravo se encuentra ubicada en Latitud 2° 11' 31.22"S, Longitud 81° 00' 15.16" O, una longitud de 17 kilómetros aproximadamente,

su distancia con relación a la playa de salinas se encontró a 163 km, la característica del afluente principal es la tener un oleaje fuerte, lo que implica problemas en los sistemas de bombeo de agua, tipo puntas de succión enterradas en la arena.



*Figura 18. Playa de Mar Bravo*

*Fuente: Google Earth*

La población de estudio fue distribuida en 4 diferentes laboratorios, que fueron categorizados con la siguiente nomenclatura A, B, C y D; con la siguiente georreferenciación:

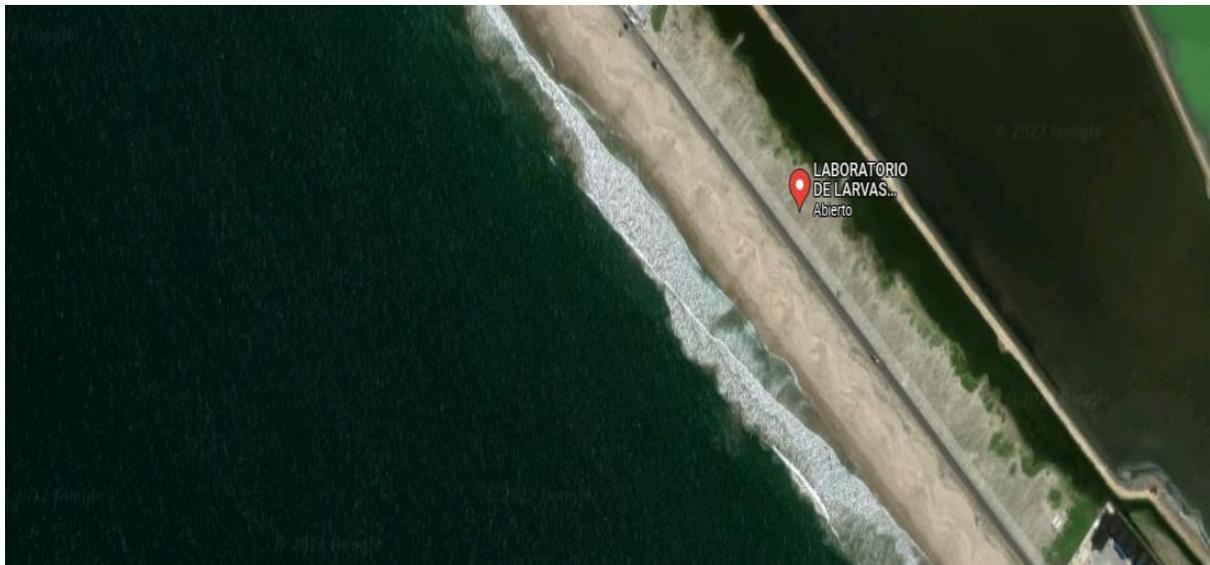
Laboratorio A: 2°14'56.2"S 80°56'46.6"W

Laboratorio B: 2°14'33.9"S 80°57'07.7"W

Laboratorio C: 2°18'24.7"S 80°54'01.5"W

Laboratorio D: 2°14'57.0"S 80°56'46.6"W

Laboratorio A: con las siguientes coordenadas: 2°14'56.2"S 80°56'46.6"W



*Figura 19. Laboratorio A*

*Fuente: Google Earth*

Laboratorio B: con las siguientes coordenadas  $2^{\circ}14'33.9''S$   $80^{\circ}57'07.7''W$



*Figura 20. Laboratorio B*

*Fuente: Google Earth*

Laboratorio C: con las siguientes coordenadas  $2^{\circ}18'24.7''S$   $80^{\circ}54'01.5''W$



*Figura 21. Laboratorio C*

*Fuente: Google Earth*

Laboratorio D: con las siguientes coordenadas: 2°14'57.0"S 80°56'46.6"W



*Figura 22. Laboratorio D*

*Fuente: Google Earth*

### **2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

Las muestras de larvas fueron tomadas de los diferentes laboratorios empleados como soportes para el desarrollo de esta investigación. Se tomaron muestras de cuatro laboratorios de la zona. Según la ubicación pre establecida en el ítem anterior.

Los muestreos se efectuaron en periodos semanales, tomando los estadios de seguimiento en las corridas, como Nauplios, Zoeas, Mysis y Postlarvas.

Las unidades experimentales de cada laboratorio fueron establecidas en 50 muestras por laboratorio, dando un total de 200 muestras total analizadas.

Las muestras de larvas fueron colectadas vivas para los análisis microbiológicos, en fundas de 1 libra con agua limpia del reservorio, una cantidad de 1 gramo en los estadios de post larvas y para los estadios iniciales como nauplio, mysis y zoea, en cantidades de 0.2 gramos o su aproximado.

Las muestras fueron trabajadas por triplicado, aplicando las metodologías estándar para la respectiva siembra.

#### **2.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA:**

Un esquema en el cuadro inferior donde se enfocó un resumen de los muestreos y la selección de las muestras indicando la secuencia que se realizaron en el desarrollo de este proyecto de tesis. Las muestras fueron relacionadas en base a las variables del gran problema, las mismas que proporcionaron los diferentes datos que permitieron mediante análisis estadísticos determinaron si existió o no inter relación en la solución de la medición de la profilaxis contra la carga bacteriana de las larvas de la zona de Mar Bravo. Los muestreos se realizaron y se esquematizaron, para definir la capacidad de trabajo realizado en las diferentes manipulaciones que fueron realizadas.

<b>Población</b>	<b>Provincia de Santa Elena</b>	<b>Zona de mar Bravo</b>
<b>Alcance</b>	Mar Bravo	Zona de laboratorios de larvas de camarón
<b>Tiempo duración del estudio</b>	Época de transición estacional	Octubre a Enero 2022
<b>Elementos a medir microbiología</b>	Muestras realizadas por los 4 laboratorios	4 laboratorios x triplicado x2 tanques x 3 estadios x 3 meses = <b>216 muestras</b>
<b>Tamaño de la muestra MIC</b>	Este procedimiento se lo realizó enfrentando los productos comerciales y las cepas patógenas	En los 4 laboratorios, se hizo una prueba de MIC a los productos, dando un total de 50 muestras
<b>Número de productos profilácticos empleados</b>	En los 4 laboratorios se dio una similitud de cuatro productos utilizados durante la corrida	Se enfocó en el uso de 4 productos primordiales para los estadios analizados.

<p><b>Tamaño de la muestra</b></p> <p><b>Identificación</b></p> <p><b>Bioquímica</b></p>	<p>Las bacterias seleccionadas fueron de la siembra de TCBS.</p>	<p>Durante el tiempo de muestreo se logró seleccionar 50 muestras de identificación bioquímica.</p>
<p><b>TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS:</b></p>		<p><b>216 MICROBIOLÒGICAS, 50 IDENTIFICACIONES Y 50 MICS.</b></p>

Fuente: Autora, 2022

## 2.5 LABORATORIO DE REALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS.

El laboratorio DULODER S.A., se encuentra ubicado en la provincia de Guayas, sector la Garzota II. y posee una extensión para realzar la zona de Mar Bravo Provincia de Santa Elena (Anexo figura 23)



*Figura 23. Área de estudio Laboratorio DULODER S.A (derecha); extensión Mar bravo (izquierda).*

*Fuente: Google Earth.*

## 2.6. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para la obtención de las muestras se las procedió a realizar el muestreo desde el primer estadio que es nauplio (V), seguido por zoea (I, II y III), mysis (I, II y III) y finalmente post larva (X).

La recolección de la muestra se la hace por medio del personal de cada laboratorio, que con la ayuda de una red o cedazo captura a las larvas, se las coloca en un recipiente de vidrio y son transportadas al área de microbiología.



*Figura 24. Recolección de muestras*

*Fuente: Autor, 2021*

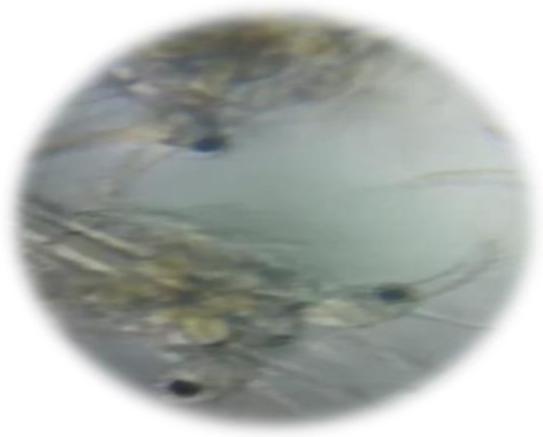
## 2.7 OBSERVACIÓN DIRECTA DE MUESTRAS

La observación de los estadios se lo hace a través del microscopio, con la ayuda de una cámara portátil es conectada al computador para lograr tener una mejor visión de las posibles anomalías en la larva. Una vez hecho esto se procede a la siembra.



*Figura 25. Nauplio*

*Fuente: Autor,2022*



*Figura 26. Mysis*

*Fuente: Autor, 2022*



*Figura 27. Post larva*

*Fuente: Autor, 2022*

## **2.8 METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ORGANISMOS**

La microbiología tuvo como objetivo determinar las enfermedades perjudiciales y beneficiosas que se encuentran en los organismos. Para ello se conocen una serie de medios de cultivos fundamentales para su detección.

### **Preparación medio de cultivo para *Vibrios***

- **Agar TCBS:** permite identificar colonias amarillas, verdes y luminiscencia. Se prepara en una fiola 200 mL de agua destilada esterilizada, se pesa 17.70g de agar TCBS adicionando 4 g de cloruro de sodio, después calentar el preparado hasta su ebullición. (BioMerux, 2010)

### **Preparación de la muestra:**

Se empleó la cámara de flujo laminar (Air Tech Japan, Ltd. Mod. BCM-1002W), empleando la metodología estándar. Los análisis y siembras de las muestras se realizarán siguiendo la metodología tradicional según lo indicado en el método estándar, empleando diluciones sucesivas seriadas en una relación 1:10, con inclusión de agar al 2% para agar selectivo TCBS, y al 5% (v/v) para TSA, TCBS efectuando el conteo total de Unidades Formadoras de colonias UFC.ml.

La siembra de las muestras fue realizada por la metodología de de siembra en profundidad empleando un ml. por cada dilución trabajada. Las muestras fueron

trabajadas en las diluciones para obtener colonias puras de cuantificación bajo el estándar de 30 a 300 colonias por placa siguiendo metodología según (Urmeneta et al., 2000; Moreno, 2002 B.A.M.,1998.

Para ello se requiere 1 g de muestra, donde el medio debe estar desinfectado y esterilizado con una fuente calor; luego se procede a lavar la muestra con agua destilada y a recolectarla en un tubo eppendorf para ser macerada. Para la inoculación se utilizan 1000 µl y se coloca en la placa vacía, para posteriormente por vertido del agar líquido a 45 C, completar 12 ml, homogenizando en movimientos hasta que se solidifique.

Siembra en superficie: Otra metodología es la de emplear 100 ul de la muestra macerada y colocarla sobre la placa de agar sólido, esparcirla hasta que se seque por completo, se incuba durante 24 horas a 32 °C para su posterior conteo.

**Método de Identificación de colonias:** Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra, identificándose las bacterias, basados en que cada placa desarrolle una colonia visible con un color determinado para su identificación.

- ❖ **TCBS:** Diferenciación de colonias amarillas y verdes, basándose en la tonalidad de la tinción que tiene cada bacteria.

**Conteo:** se contaron todas las colonias existentes, luego se dividió los mililitros que se pusieron en la caja y se multiplicó por la dilución, así se obtuvo el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (Aguilar, Protocolo de Microbiología, 2018).

**UFC/gr** = Número de colonias x dilución / peso en gramos de la pl

**UFC/mL** = Número de colonias x dilución / ml

**UFC/larva** = Número de colonias x dilución / # larvas.

Todos los análisis bacteriológicos son determinados por los grados de severidad establecidos, en base a la experiencia de producción y resultados del departamento de microbiología (**Tabla 2**).

*Tabla 2. Grados de severidad de UFC en larvas y postlarvas de camarón*

MEDIO CULTIVO	DE COLONIAS	UFC/g		
		Normal	Elevado	Severo
TCBS	Tipo 1 (amarillas)	$\leq 10^2$	$> 10^3$	$> 10^5$
	Tipo 2 (verdes)	$\leq 10^2$	$> 10^3$	$> 10^5$

La muestra se diluyó para obtener colonias puras en las placas. El grado de dilución se consideró de gran importancia, ya que un exceso de dilución podría dar como resultado ningún crecimiento o en caso contrario el crecimiento excesivo haría

imposible de cuantificar las UFC. Para ello se siguieron las recomendaciones metodológicas donde la mejor dilución es aquella que permite que se obtengan entre 30 y 300 colonias por placa” (Urmeneta-Alonso *et al.*, 2000; Moreno, 2002)

- Ejemplo.

X = (1000  $\mu$ L \* si se empleó una dilución de exponente a la -3 y se recuperaron 30 colonias después del cultivo, el resultado fue:

X = 1 mL

UFC = 30 x (10<sup>-3</sup>) (1 mL) = 300.00/ mL  $\cong$  **3.0 x 10<sup>4</sup> UFC / mL ó g**

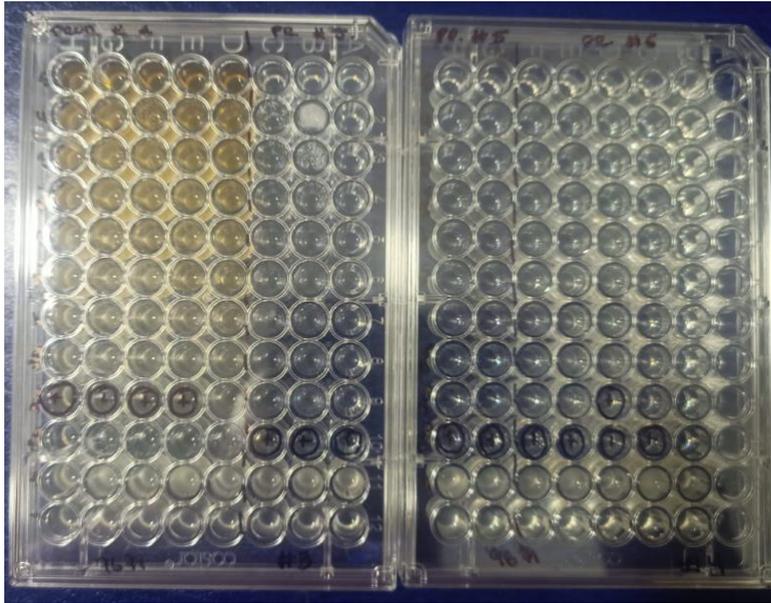
## 2.8 CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA

El área de microbiología constituye una de las herramientas necesarias para el diagnóstico de enfermedades. Está enfocado en la prestación de servicios para la industria acuícola; tales como análisis cuantitativos y cualitativos de muestras provenientes del sector , aislamiento e identificación por métodos bioquímicos de cepas bacterianas de interés, Análisis de Quórum Sensing, antibiogramas y concentración mínima inhibitoria (MIC), al descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos naturales como alternativa al uso de químicos en el cultivo de camarón y

al desarrollo de nuevos probióticos efectivos para el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*. (CENAIM, 2020)

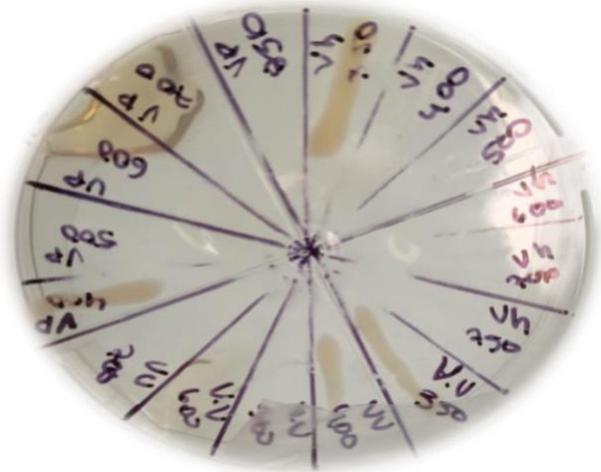
Para la realización de esta metodología se logra a partir de cálculos de las concentraciones en ppm de los productos comerciales que se empleen para el control de bacterias patógenas, empleando tubos eppendorf para los mismos, y posteriormente placas de micro Elisa para colocar 10 concentraciones diferentes enfrentadas a bacterias referenciales patógenas, para encontrar la dosis mínima del producto que mate por completo a la bacteria y disminuir los costos del producto en campo.

Para la manipulación de esta metodología se enfrentó a 5 probióticos comerciales, 5 aceites esenciales y 5 ácidos orgánicos, contra los cuatro patógenos: *V. parahemolyticus*, *V. harvery*, *V. vulnificus* y *Pseudomona*, utilizados en el laboratorio DULODER S.A.



*Figura 28. Placa de microelisa*

*Fuente: Autor, 2021*

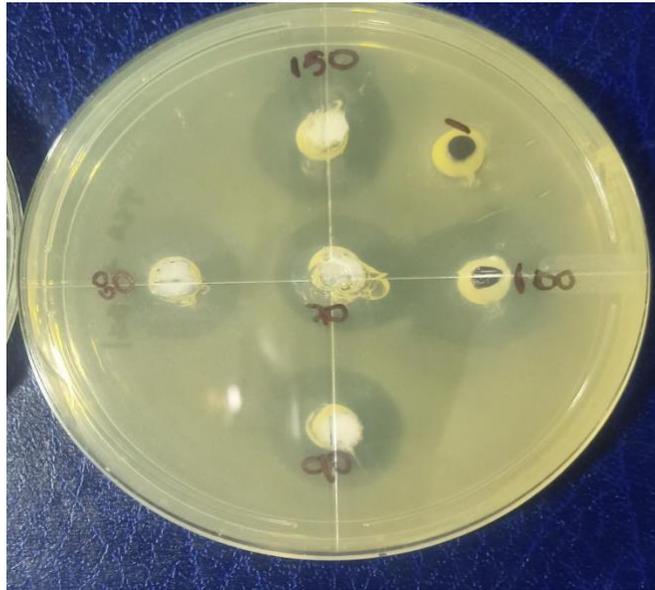


*Figura 29. MIC (medio sólido)*

*Fuente: Autor, 2021*

## 2.9 ANTIBIOGRAMA.

La sensibilidad antimicrobiana se midió utilizando el método de Bauer et al., (1962), recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Para ello se resembraron las cepas aisladas haciendo agujeros en el agar sólido dentro de la placa Petri, para poder medir la respuesta de sensibilidad mediante la formación de un halo de inhibición en milímetros. (Fig.6)



*Figura 30. Antibiograma*

*Fuente: Autor,2022*

## **2.10 ANÁLISIS DE PATOLOGÍA EN FRESCO.**

Análisis de patología en fresco de camarones en todos los estadios, nos permite emplear un formato que mide el grado de daños en órganos específicos, de esta manera se podrá relacionar esos daños con problemas bacterianos, de calidad de agua o de calidad de suelos. Dichas manifestaciones patológicas permiten tomar medidas adecuados y rápidos en producción. (Tabla.2 Análisis en fresco).



*Figura 31. Equipos para realizar patología en fresco*

*Fuente: Autor, 2021*

Tabla 3. Formato para realizar patología en fresco

No. _____ Fecha. _____			
Procedencia. _____			
Especie. _____			
Estanque No. _____		Tamaño de la muestra. _____	
No. de muertos. _____		No. de examinados. _____	
Estado de vida. _____		Peso promedio. _____ Tamaño promedio. _____	
CARACTERÍSTICAS EXTERNAS	OBSERVACIONES	CARACTERÍSTICAS INTERNAS	OBSERVACIONES
Actividad de los camarones		HEPATOPÁNCREAS	
Contenido del intestino		Atrofia	
Presencia de heces en forma de cadena o discontinua		coloración	
Presencia de epibiontes, bacterias y hongos en el camarón		Presencia de los virus: BP y MBV.	
Deformidades en el rostrum, antenas abdomen, telson, urópodos y pleópodos		Deformación de los túbulos	
Apéndices rotos		Color del fluido.	
Melanización (color café claro)		Presencia de gregarinas en todos sus estadios	
Coloración anormal		Túbulos melanizados	
Características de la cutícula		Presencia de masa de bacterias y cantidad de lípidos	
BRANQUIAS		INTESTINO	
Coloración		Presencia de gregarinas en todos sus estadios.	
Presencia de epibiontes		Masas melanizadas de hemocitos	
Nódulos de bacterias en las lámelas branquiales		Cuerpos de oclusión de BP	
Micosis (hifas, conidios)		MÚSCULO	
Cuerpos de inclusión de WSSV		Textura	
Materia orgánica		Color	
Presencia de melanización y necrosis		Microsporidios	
		Síndrome del encalambreamiento	

## 2.11 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA MEDIANTE LA METODOLOGÍA API 20 E

Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H<sub>2</sub>S, la determinación del hidrólisis de la gelatina. (APIWEB, 2010)

Permite la identificación de bacilos gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como por ejemplo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros. Es una galería conformada por 20 microtubos. Cuando se utiliza esta galería las cartas de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas son las siguientes: (Salazar., 2008).



Figura 32. Carta de colores, metodología API E20

Fuente: Salazar, 2009

## **CAPITULO 3. RESULTADOS**

### **3.1 ANOMALÍAS EN LARVAS.**

En el proceso del muestreo durante este periodo de los tanques, se administró probióticos para contrarrestar y regular la carga bacteriana. Mediante los exámenes patológicos en fresco durante los primeros estadios no se encontró evidencia de lesiones relacionadas a las enfermedades mencionadas.

Sin embargo, en el estadio de post larva se evidenció un ligero incremento a nivel bacteriológico.

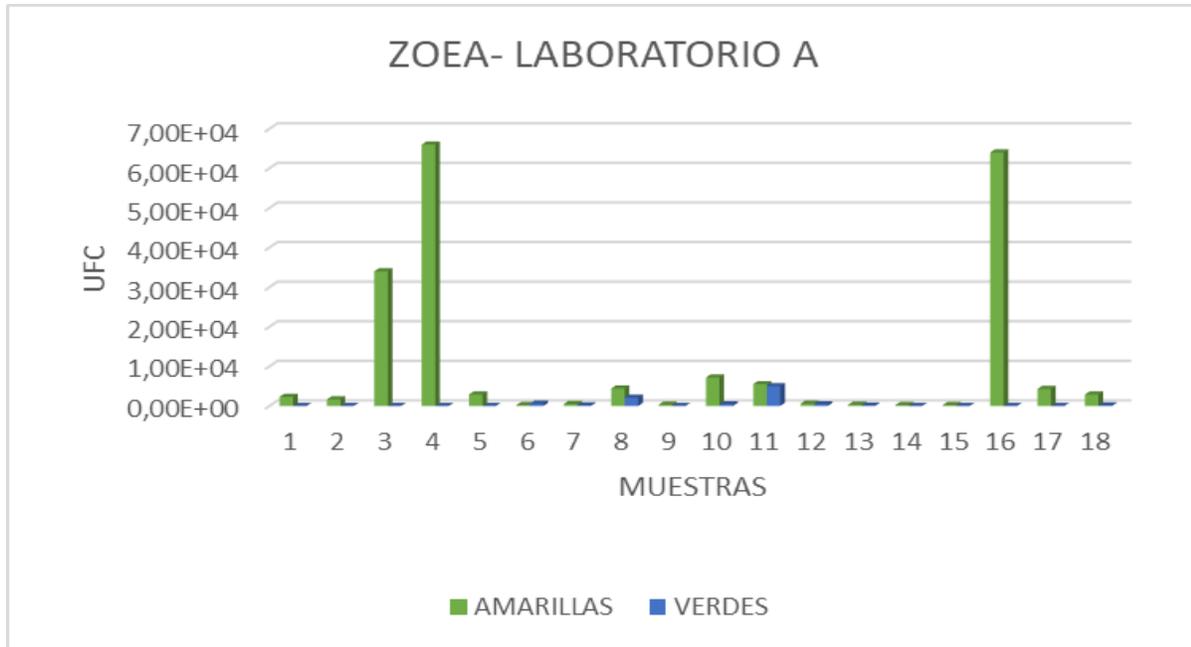
Para el estadio de zoea de un total de 56 muestras analizadas se encontró que 17,85% de las larvas presentó anomalías observadas microscópicamente a nivel de branquias. En el estadio de mysis del total muestreado el promedio de anomalías a nivel intestino fue del 41,07% que corresponden a 23 muestras. Y finalmente para el estadio de post larva, se obtuvo una menor tasa de anomalías debido a las prevenciones mediante probióticos, el promedio de afectaciones fue de 8,92%.

### **3.2 CONTEO BACTERIOLÓGICO**

Para realizar la toma de datos se trabajó con la herramienta digital de Excel, por la cual fueron tabuladas las muestras por laboratorio y después por cada estadio dándonos un total de 216 muestras en cuatro meses aproximadamente. Todas las muestras fueron sembradas en agar TCBS para la identificación de colonias amarillas y verdes.

Se detallan las gráficas a continuación:

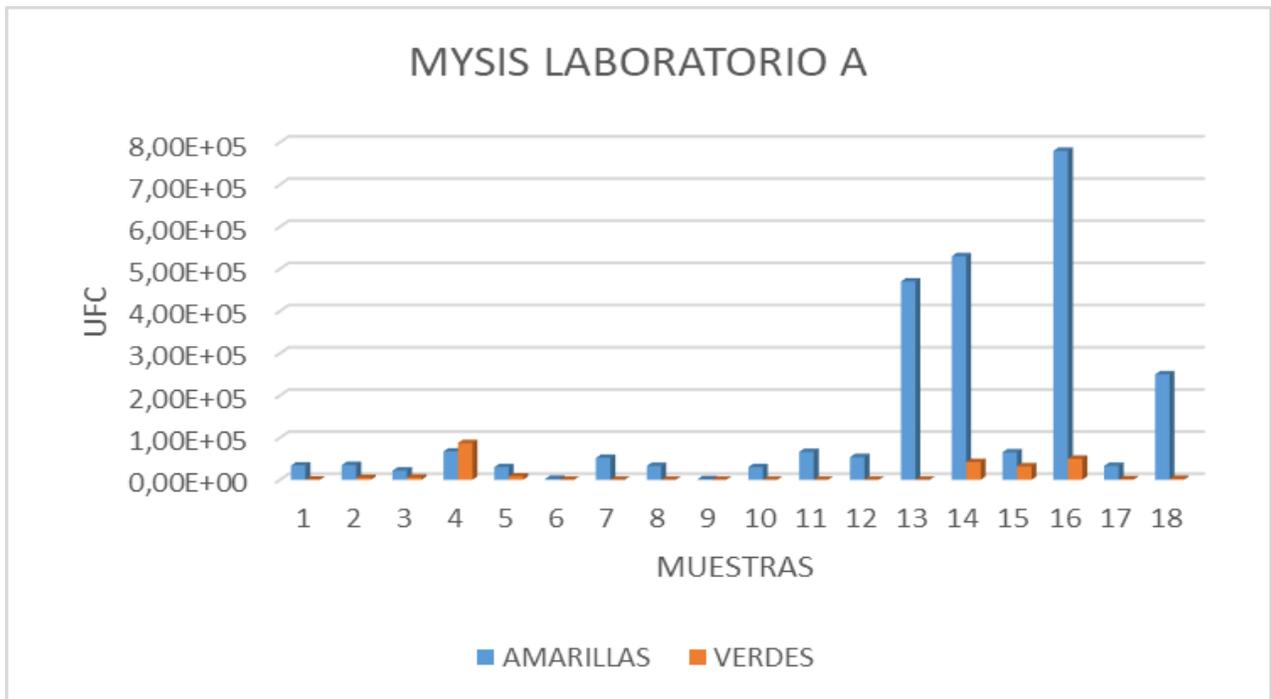
Laboratorio A: En el estadio de Zoea (Fig. 33), de las 18 muestras procesadas en el laboratorio A, se tuvo una variación bacteriana, en las muestras 3, 4 y 16; las colonias amarillas tuvieron el máximo exponente siendo el dato más alto  $6,40E+04$ , para las muestras 8, 10, 11, 17 y 18 hubo una disminución su exponente fue de  $7,20E+03$ . Para el caso de las colonias verdes en este estadio fue una carga bacteriana mínima, aun así en las muestras 8 y 11 se obtuvieron valores como  $8,00E+03$ .



*Figura 33.Zoea-Laboratorio A*

*Fuente: Autor, 2022*

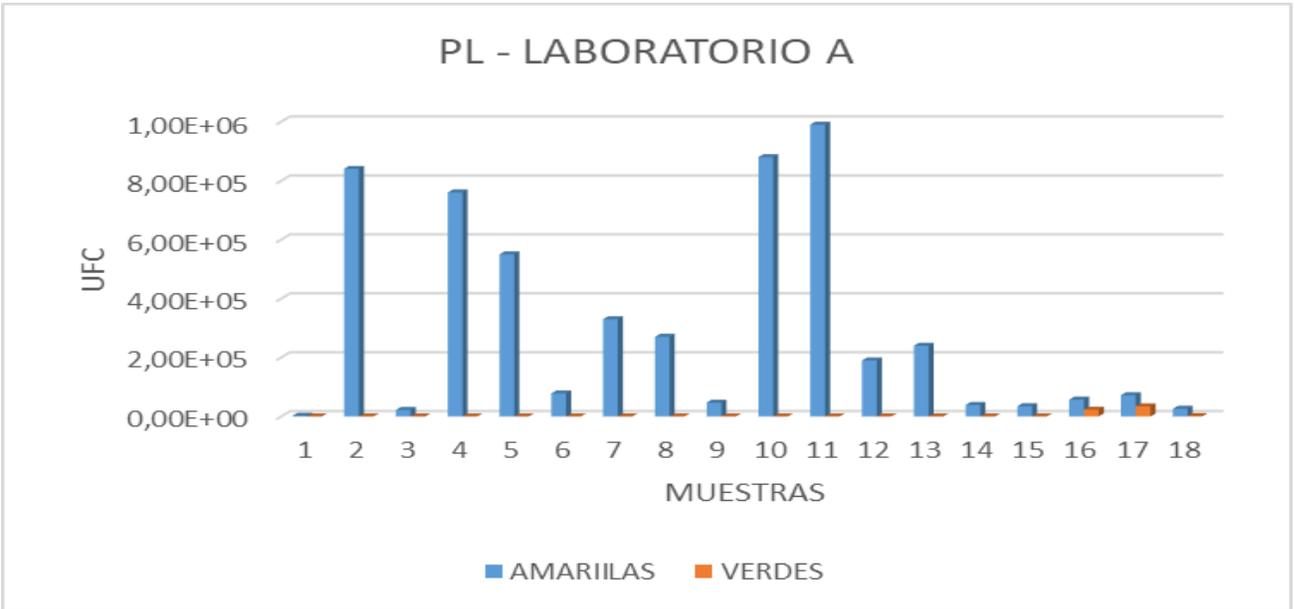
Para el estadio de Mysis en el laboratorio A, la carga bacteriana cambió los datos para las colonias amarillas incrementaron siendo el caso para las muestras 13, 14,16 y 18 con valores de 7,80E+05, en el caso de las colonias verdes se muestra una variación en los tanques 4, 14, 15 y 16, con un valor de 8,70E+04. (Figura 34)



*Figura 34.MYSIS-LABORATORIO A*

*Fuente: Autor, 2022*

Los datos para el estadio de post larva del Laboratorio A, solo las muestras 16, 17 y 18 tuvieron como resultado 3,40E+03 para colonias verdes, que en comparación del anterior estadio se demuestra una disminución en colonias verdes. En el caso de las bacterias amarillas para las muestras 2, 4, 10 y 11 fueron las más elevadas con valores de 9,90E+05 y para las muestras 5, 7, 8, 12 y 13 los valores fueron de 3.65E+04. (Figura 35).

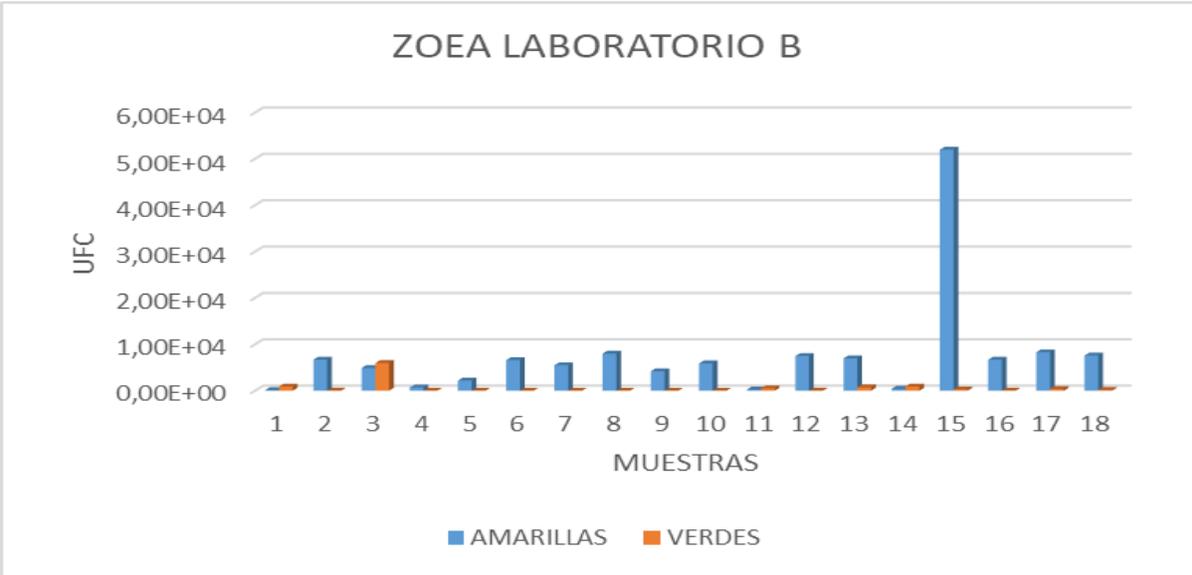


*Figura 35.POST LARVA LABORATORIO A*

*Fuente: Autor, 2022*

### Laboratorio B

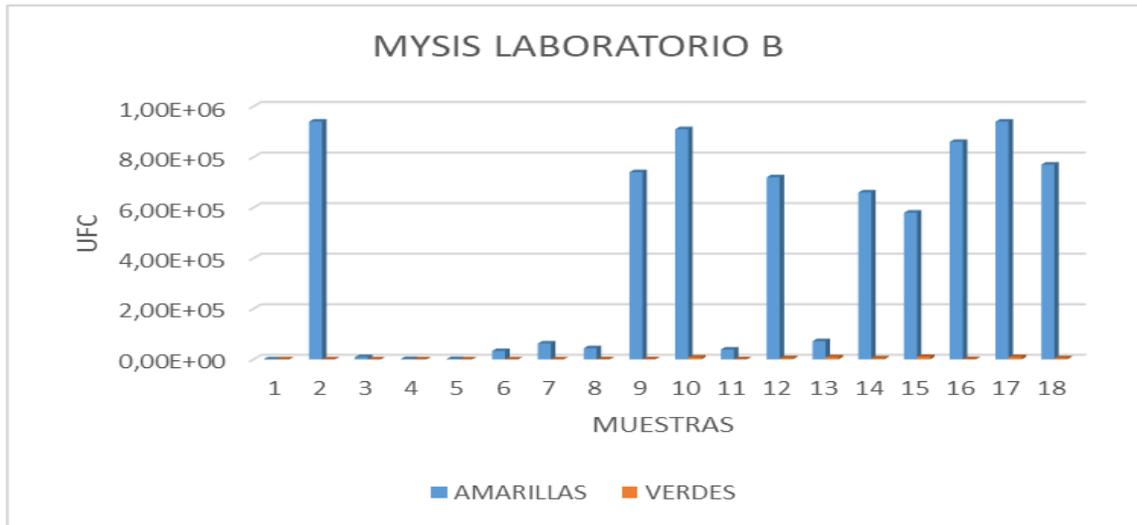
En el Laboratorio B, para Zoea solo la muestra 15 tuvo un dato alto en base a la carga bacteriana de colonias amarillas  $5,20 \text{ E}+04$  para las muestras 2, 6,7,8,9,10,12,13,16,17 y 18 los valores oscilaron en  $4,20\text{E}+03$ ; mientras que para las colonias verdes la muestra número 3 tuvo el valor máximo de carga bacteriana de  $6,0 \text{ E}+03$ . (Figura 36).



*Figura 36.ZOEALABORATORIO B*

*Fuente: Autor, 2022*

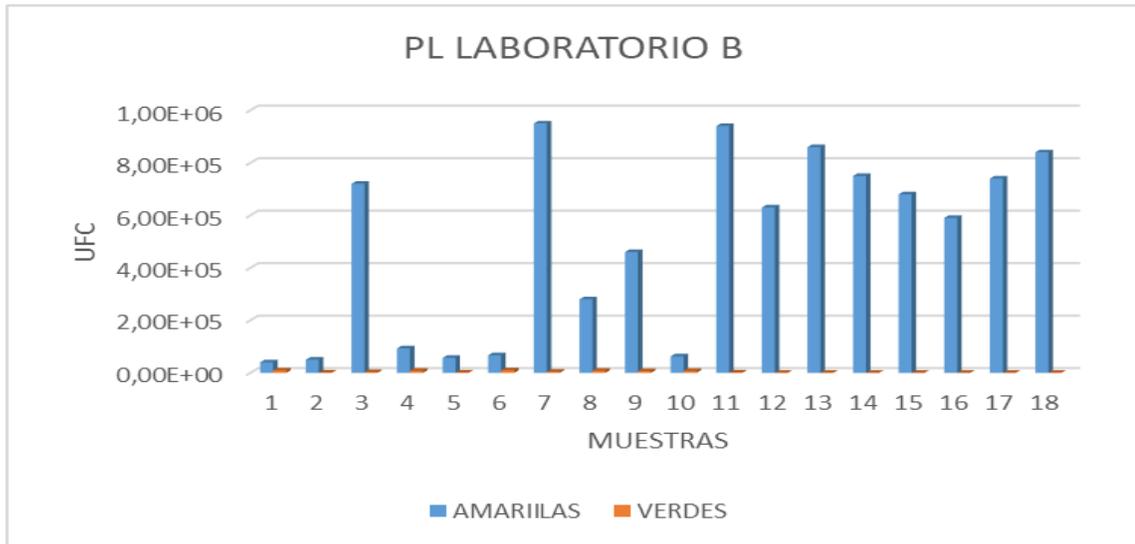
En el estadio de Mysis (Figura 37) en el laboratorio B, se registraron los siguientes valores  $9,05E+05$  colonias amarillas como valor máximo que llegó a ser alcanzado por las muestras 2,9,10,12,14,15,16 y 17, por otro lado, las colonias verdes tuvieron una incidencia menor a excepción de la muestra 13 con un valor de  $7,8E+03$  colonias verdes.



*Figura 37.MYSIS-LABORATORIO B*

*Fuente: Autor, 2022*

Continuando con el estadio de post larva del laboratorio B (Figura 38), se registró el valor máximo de  $9,50E+05$  en colonias amarillas que junto a las muestras 3,7,11.14.15.16 y 17 son las más altas, para las colonias verdes como valor máximo fue de  $9,20E+03$  de las muestra 1.

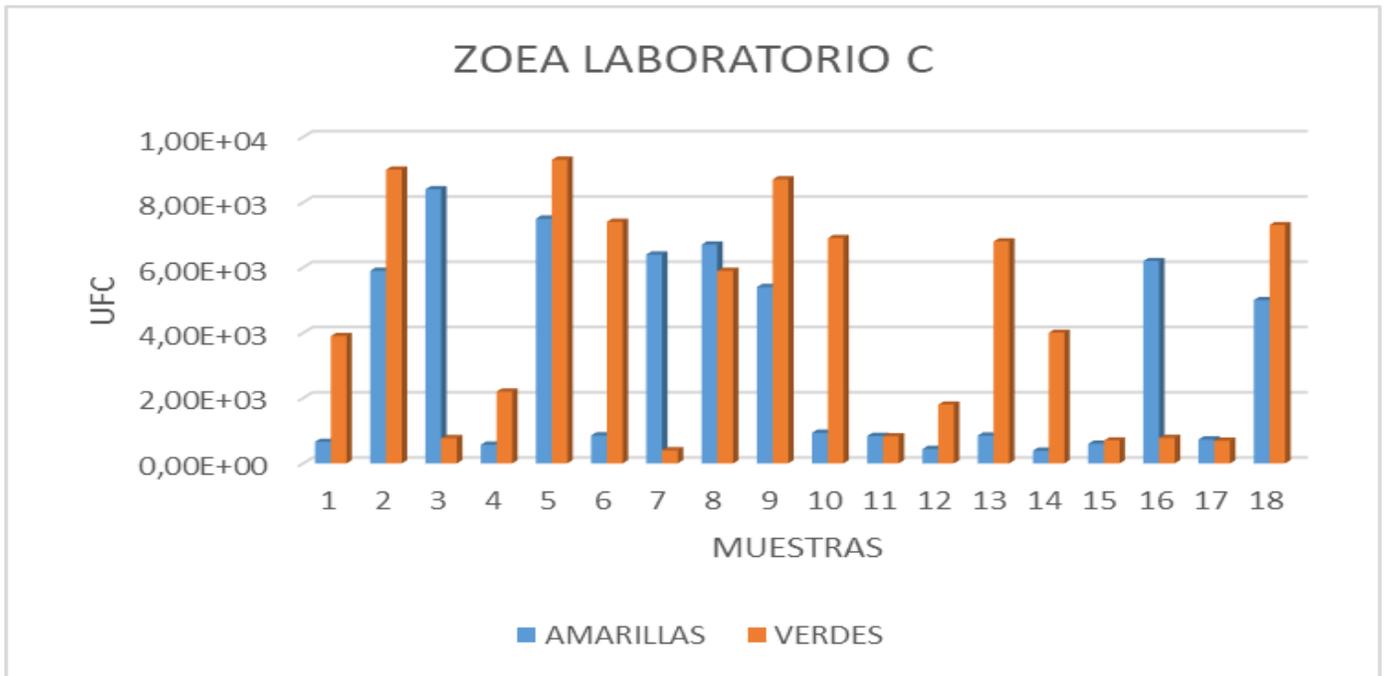


*Figura 38. POST LARVA-LABORATORIO B*  
*Fuente: Autor, 2022*

### Laboratorio C

Para el laboratorio C (figura. 39), el estadio de Zoea presentó valores con exponente 4 en las muestras 3,5,7,8 y en las colonias verdes se obtuvo una carga bacteriana alta como promedio de  $8,9E+04$  en las muestras 2,5,6,9,10,13y 18.

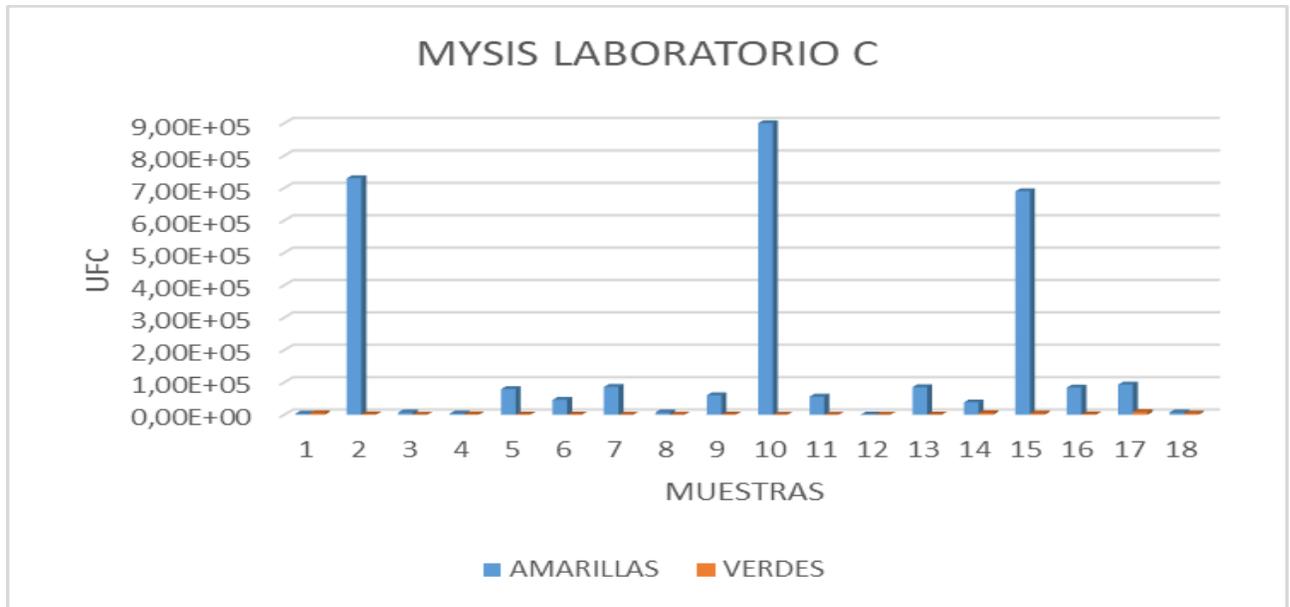
En el primer estadio, Zoea se obtuvieron los siguientes valores  $5,03E+03$  colonias amarillas y  $7,80E+02$  colonias verdes.



*Figura 39. ZOEALABORATORIO C*

*Fuente: Autor, 2022*

En Mysis para el laboratorio C, se registraron valores para colonias amarillas  $6,70E+05$  y  $3,40E+02$  en colonias verdes.

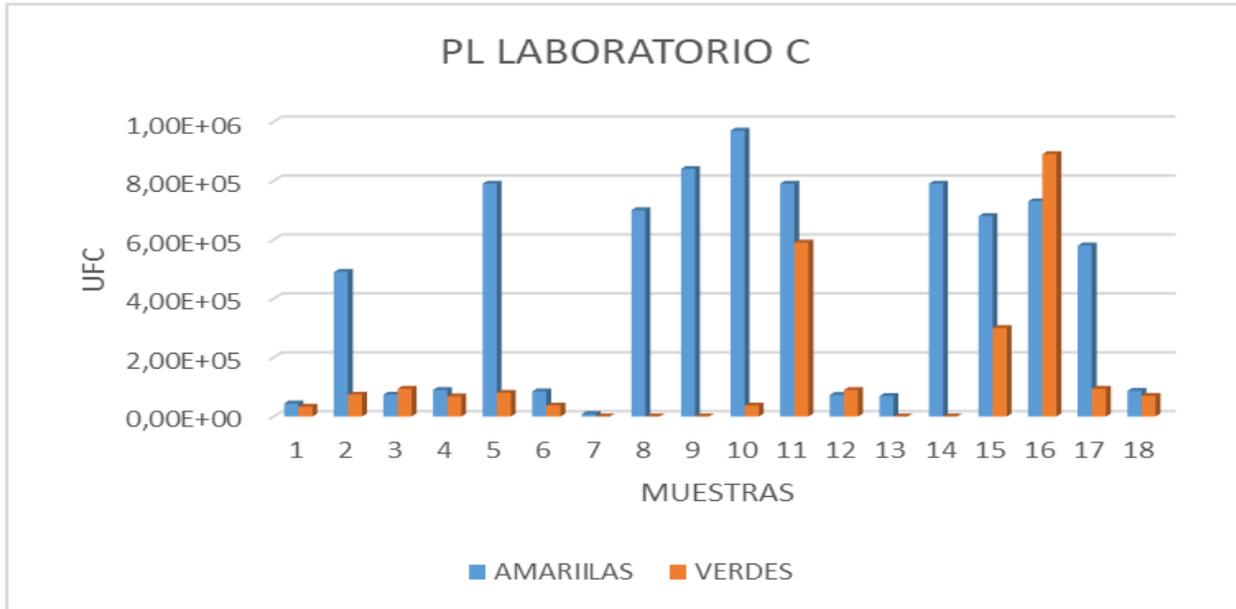


*Figura 40.MYSIS-LABORATORIO C*

*Fuente: Autor, 2022*

En el estadio de post larva para este laboratorio se obtuvieron los siguientes datos

9,76E+05 en colonias amarillas y 8,60E+04 para colonias verdes.



*Figura 41.POST LARVA-LABORATORIO C*

*Fuente: Autor, 2022*

#### Laboratorio D

En la corrida de este laboratorio para Zoea, se obtuvieron para colonias amarillas 8,90E+03 Y 2,3 E+03 en colonias verdes.

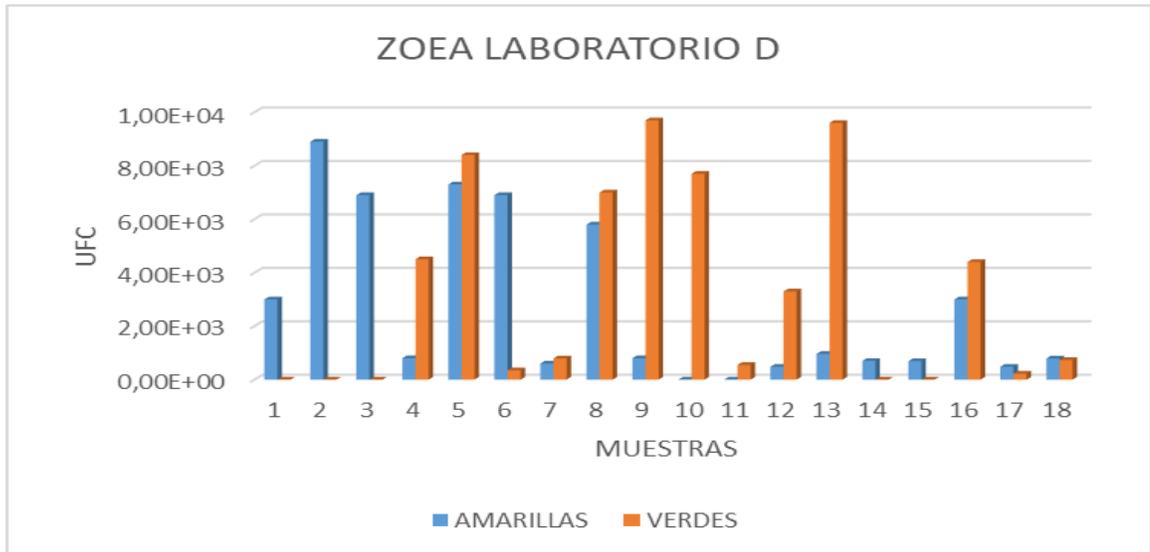


Figura 42.ZOEALABORATORIO D

Fuente: Autor, 2022

En Mysis se registró valores para colonias verdes de  $8,75E+03$  y en colonias amarillas  $9E+04$

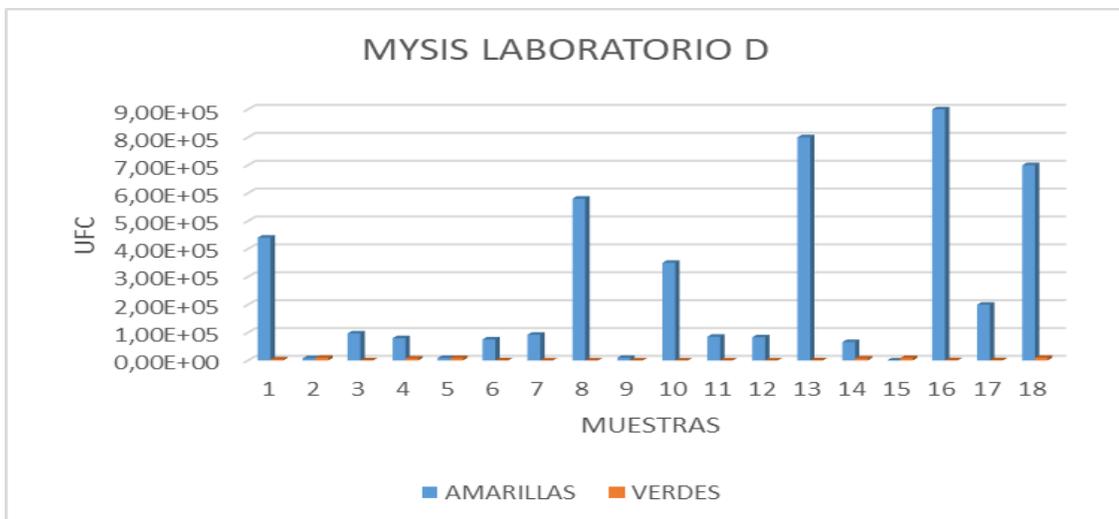
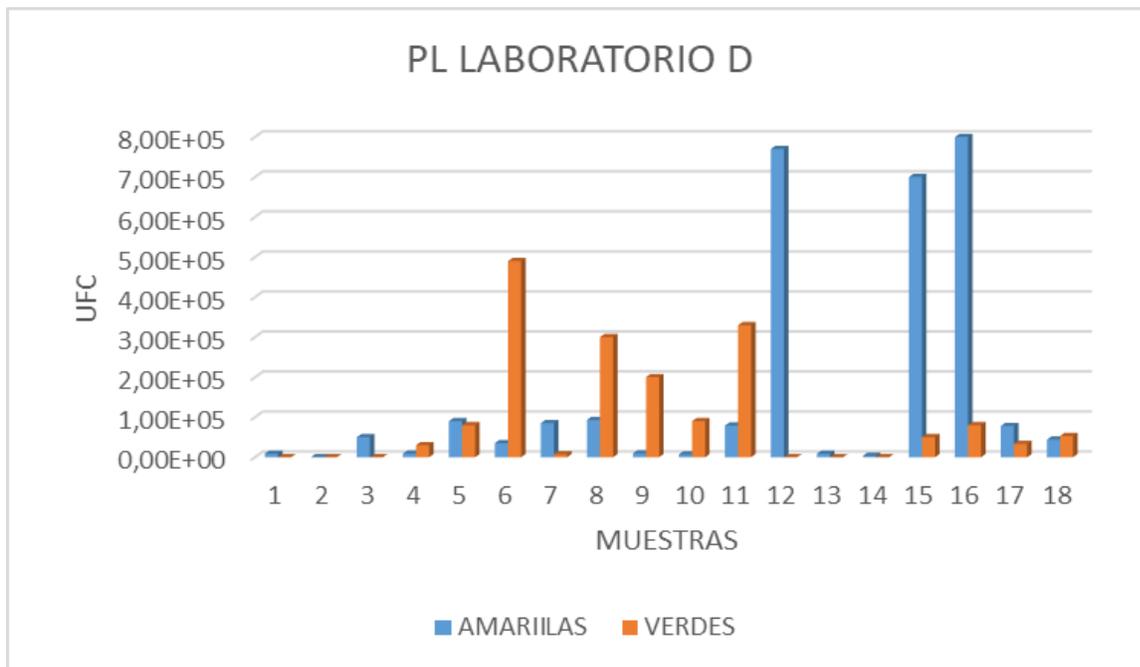


Figura 43.MYSISLABORATORIO D

Fuente: Autor, 2022

Para finalizar en post lava del laboratorio D se obtuvieron  $8,00E+05$  en colonias amarillas y  $4,90E+03$  para colonias verdes.



*Figura 44. POST LARVA-LABORATORIO D*

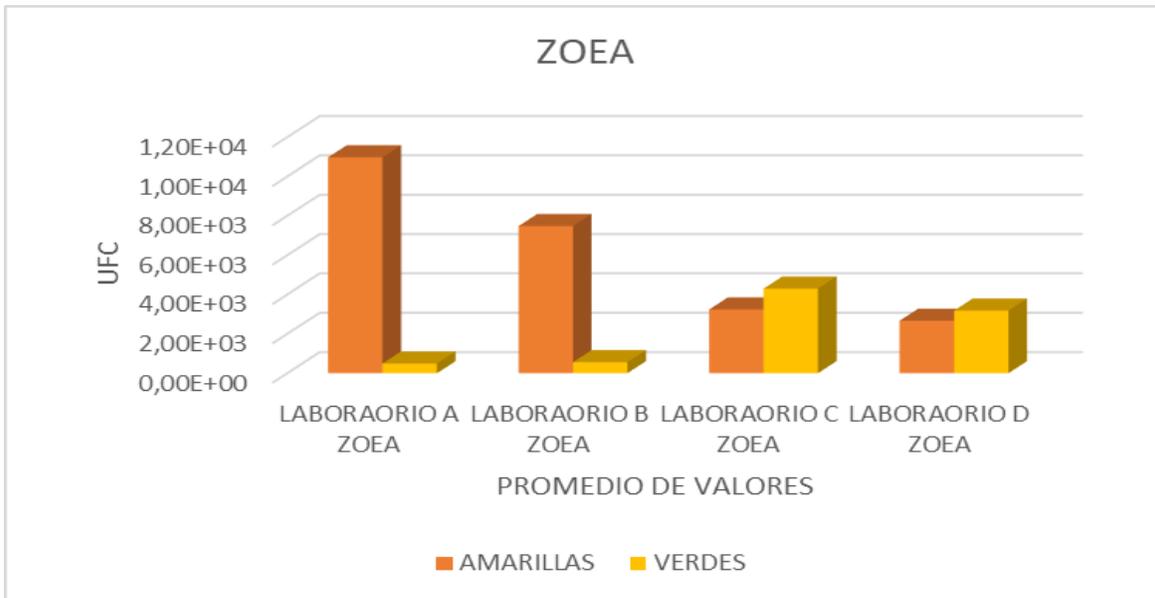
*Fuente: Autor, 2022*

En los siguientes gráficos se representa los estadios zoea, mysis y post larva muestreados.

Para zoea se puede observar que en el laboratorio A obtuvo el mayor conteo en las colonias amarillas con  $1,10E+04$  y el laboratorio C  $4,30E+03$  para las colonias verdes.

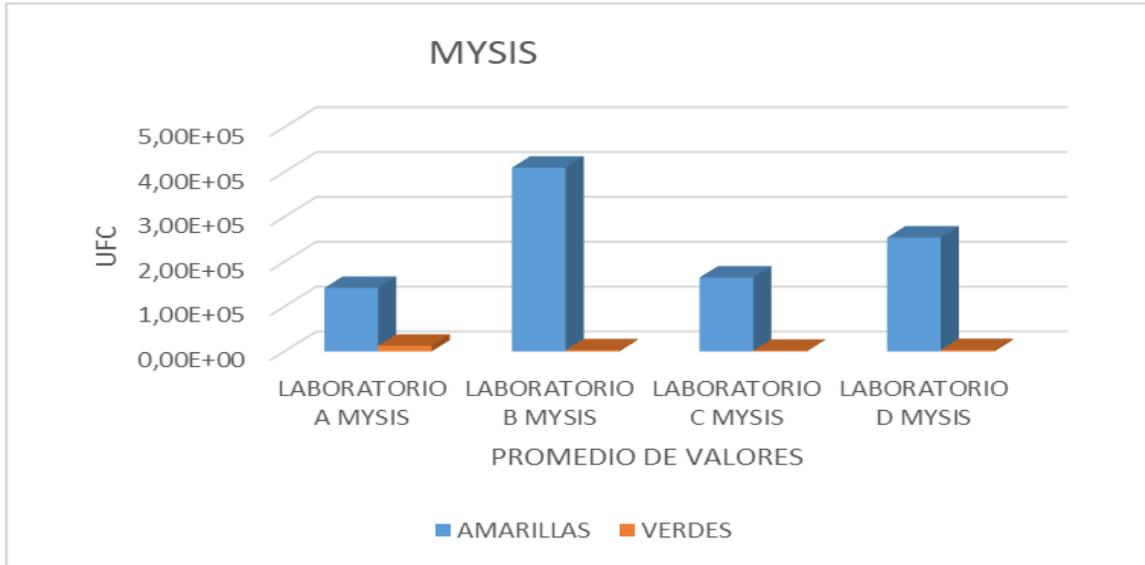
En el estadio de mysis, el laboratorio B registró  $4,10E+05$  como mayor valor en colonias amarillas y el laboratorio A con  $1,42E+04$  colonias verdes. Y finalmente, para

post larva el máximo de colonias amarillas fue del laboratorio B con 4,89E+05 y para las colonias verdes el laboratorio C con 1.37E+05.



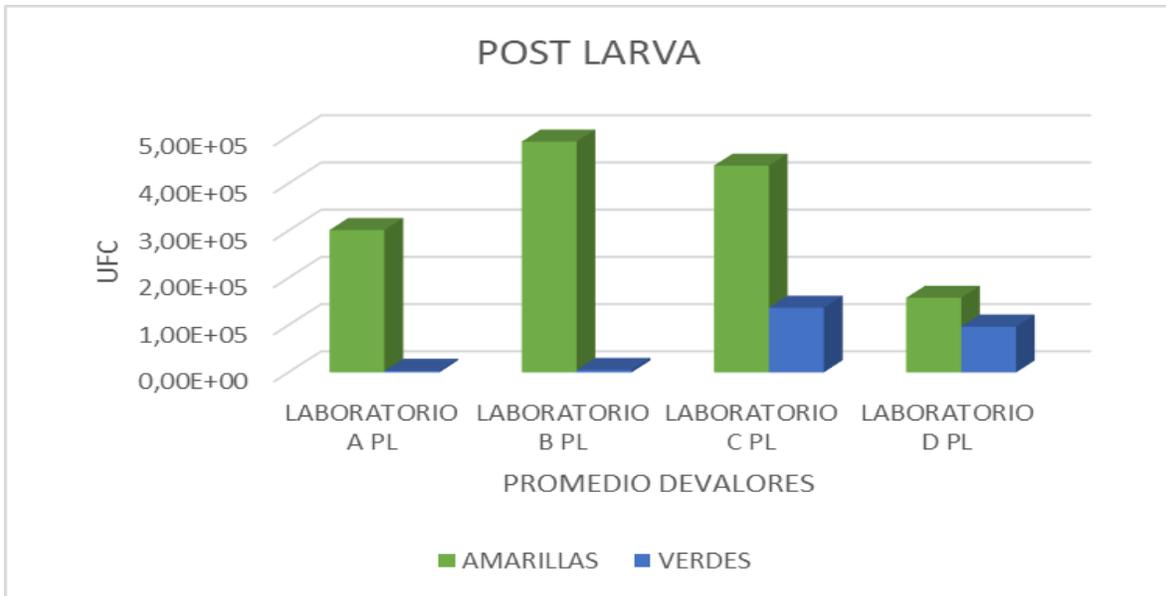
*Figura 45. COMPARACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN EL ESTADIO DE ZOE A*

*Fuente: Autor, 2022*



*Figura 46. COMPARACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA EN EL ESTADIO MYSIS*

*Fuente: Autor, 2022*



*Figura 47. COMPARACIÓN BACTERIANA DE POST LARVA*

*Fuente: Autor, 2022*

### 3.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Durante el proceso de muestreo de larvas, se realizó la identificación bioquímica a 50 cepas de que se por la caracterización morfológica tuvieron mayor prevalencia en las siembras realizas en el agar TCBS. En la figura se muestra que el *Vibrio parahaemolyticus* con un 40%, para el *Vibrio mimicus* 25%, el *Vibrio vulnificus* 10%, el 20% le corresponde al *Vibrio alginolyticus* y para *Aeromonas hydrophila* el 5%.

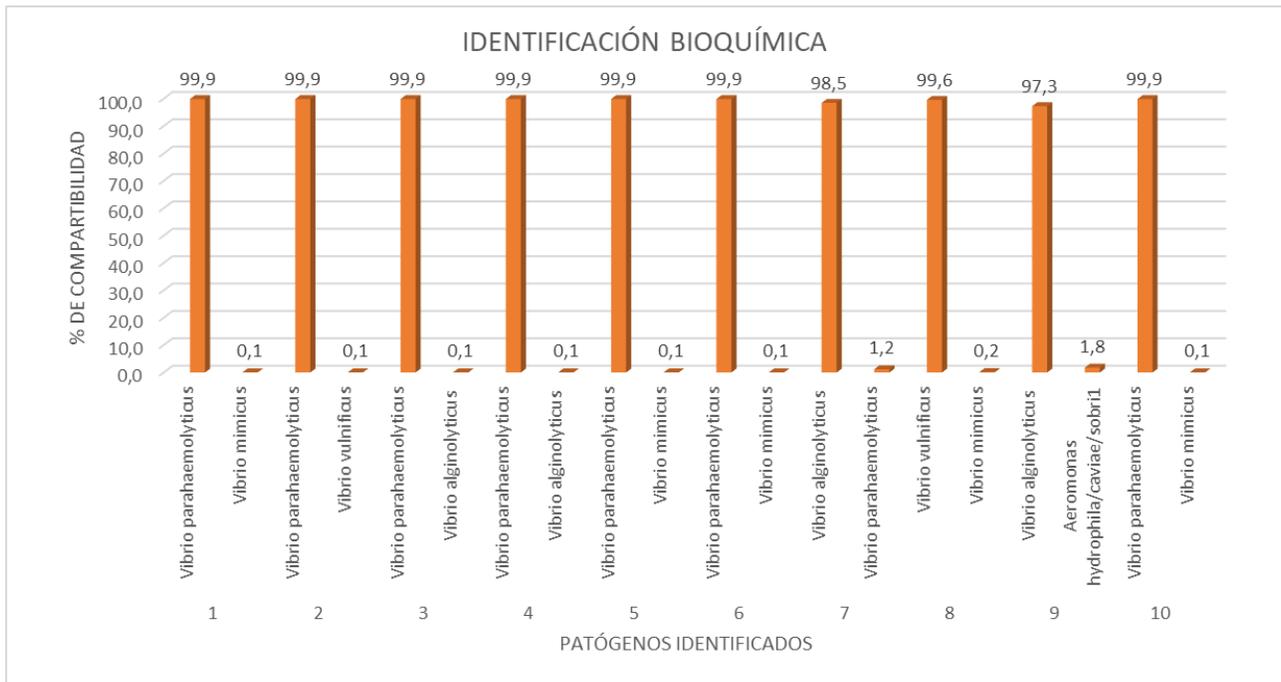


Figura 48. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Fuente: Autor, 2022

### 3.4 PROBIÓTICOS COMERCIALES Y CEPAS PATÓGENAS

Para la ejecución de esta metodología de la concentración mínima inhibitoria, se enfrentó a cuatro productos comerciales que se los usa con frecuencia en dichos laboratorios. Para el probiótico 1, con el *V. parahemolyticus* se obtuvo una concentración mínima de 500ppm, para *V. vulnificus* 600 ppm, *V. harvery* 500ppm y *Pseudomonas* 750 ppm. En el probiótico 2, la concentración mínima fue de 400 para los *vibrios parahemolyticus* y *harvery* y la máxima para *Pseudomonas*. Por otro lado, para el probiótico 3, el *V. harvery* registró la menor concentración mínima inhibitoria de 200ppm. Y finalmente, el probiótico 4 el *V. parahemolyticus* obtuvo la menor concentración inhibitoria de 500 ppm mientras que el *V. vulnificus* fue la mayor con 800ppm.

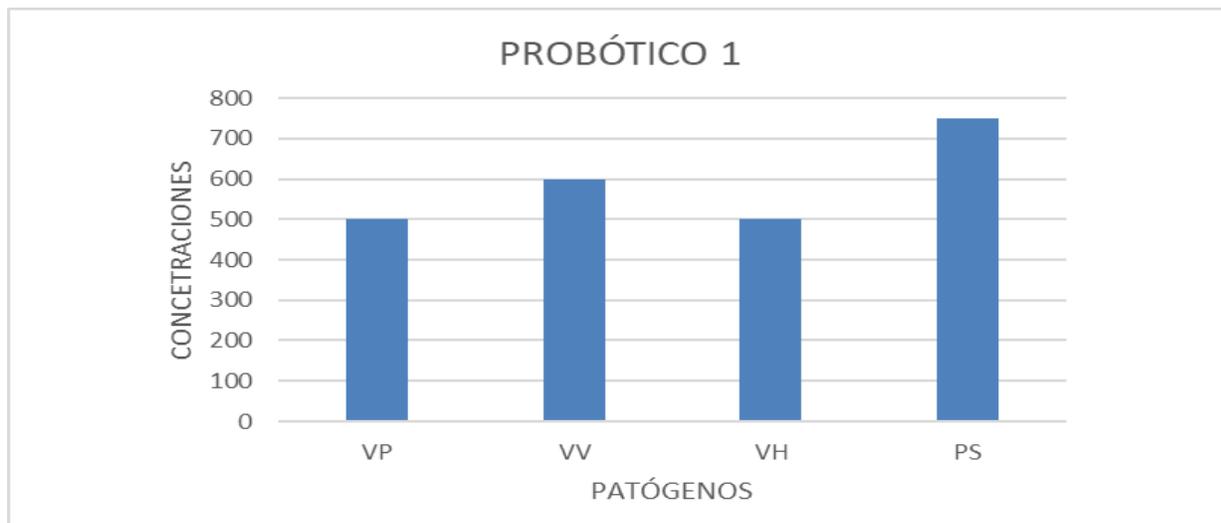
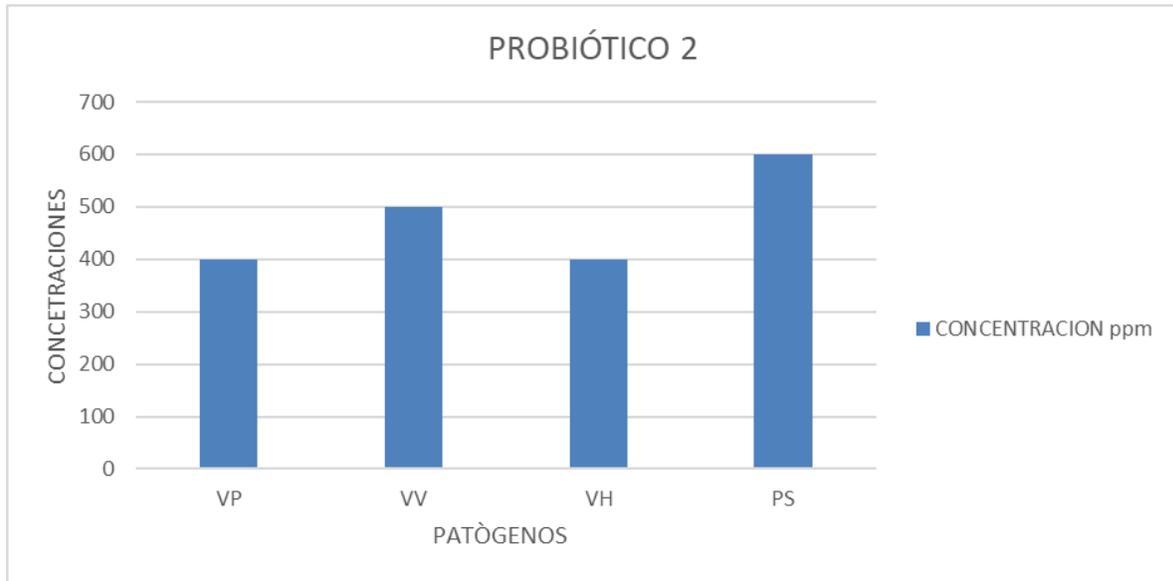


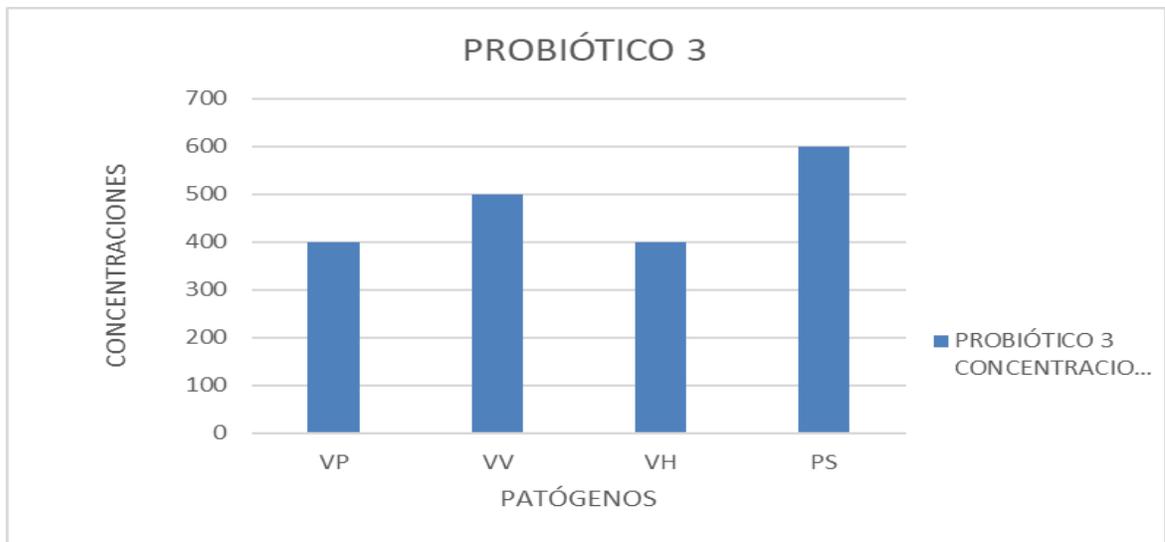
Figura 49. PRPBIÓTICO 1 vs PATÓGENOS

Fuente: Autor, 20022



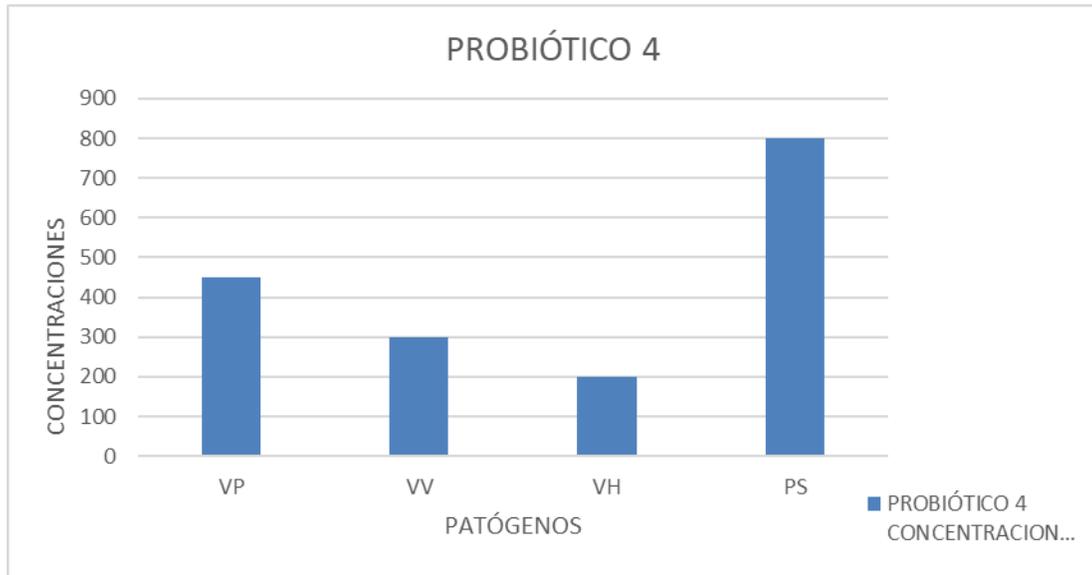
*Figura 50. PROBIÓTICO 2 vs PATÓGENOS*

*Fuente: Autor, 2022*



*Figura 51. PROBIÓTICO vs PATÓGENOS*

*Fuente: Autor, 2022*



*Figura 52. PROBIÓTICO vs PATÓGENOS*

*Fuente: Autor, 2022*

### **3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para los resultados estadísticos, mediante el programa Statgraphics analizamos la media de los conteos bacteriológicos entre los cuatro laboratorios, para ello los dividiremos por colonias amarillas y verdes.

### 3.5.1 MEDIA DE COLONIAS AMARILLAS Y VERDES EN ESTADIO ZOEAE DE LOS CUATRO LABORATORIOS

Para este proceso estadístico, reunimos los datos obtenidos de las muestras de Zoea pertenecientes a los cuatro laboratorios, obteniendo una media de  $6,0E+05$  para colonias amarillas; mientras que para las colonias verdes en este mismo estadio su media fue de  $1,87E+05$  con una desviación estándar de 3909,77, y el intervalo de confianza del 95% para ambas.

Para el laboratorio A se demostró una carga bacteriana más alta en cuanto a colonias amarillas, con este valor se está alerta y se aplican medidas profilácticas; para las colonias verdes el laboratorio C presentó la mayor carga bacteriana.

PARÁMETROS	AMARILLAS	VERDES
LABORAORIO A ZOEAE	1,10E+04	4,96E+02
LABORAORIO B ZOEAE	7,48E+03	5,57E+02
LABORAORIO C ZOEAE	3,24E+03	4,30E+03
LABORAORIO D ZOEAE	2,67E+03	3,18E+03

Tabla 4. CARGA BACTERIOLÓGICA-ZOEAE

Fuente: Autor. 2022

### 3.5.2 MEDIA DE CARGA BACTERIANA EN EL ESTADIO DE MYSIS EN LOS CUATRO LABORATORIOS

El estadio de mysis es el más crítico en el desarrollo larvario, puesto a que se presenta la mayoría de patologías que se desencadenan en enfermedades bacterianas, al no ser controladas a tiempo pueden ser devastadoras con mortalidades.

En el muestro de estos estadios, se obtuvo que la media de las colonias amarillas es de  $2,4E+05$  que, dentro de los valores óptimos larvarios, estarían en el límite; en cuanto a las colonias verdes la mediana fue de  $2.93E+03$ , valor que nos demostró que los probióticos administrados ayudaron a bajar la carga bacteriana en riesgo. Como desviación estándar tenemos el valor de 121511 con un intervalo de confianza del 95%.

PARÁMETROS	AMARILLAS	VERDES
LABORATORIO A MYSIS	1,42E+05	1,29E+04
LABORATORIO B MYSIS	4,10E+05	2,73E+03
LABORATORIO C MYSIS	1,65E+05	1,62E+03
LABORATORIO D MYSIS	2,54E+05	3,13E+03

*Tabla 5. CARGA BACTERIANA MYSIS*

*Fuente: Autor. 2022*

### 3.5.3 MEDIA DE LAS CARGAS BACTERIANAS EN ESTADIO PL DE LOS CUATRO LABORATORIOS.

Como estadio final de análisis tenemos a post larva, el dato de media de los cuatro laboratorios para colonias amarillas es de  $3,07E+04$  bajando un exponente en comparación de los otros dos estadios y en las colonias verdes  $5,04E+03$ , la desviación estándar en este caso es de 1485538 con un grado de confiabilidad del 95%.

PARÁMETROS	AMARILLAS	VERDES
LABORATORIO A PL	$3,02E+05$	$3,23E+03$
LABORATORIO B PL	$4,89E+05$	$5,23E+03$
LABORATORIO C PL	$4,38E+05$	$1,37E+05$
LABORATORIO D PL	$1,58E+04$	$9,69E+04$

Tabla 6. CARGA BACTERIANA PL

Fuente: Autor,2022

### 3.5.4 IDENTIFICACION BIOQUÍMICA

Para la tabulación de las bacterias que se seleccionaron para la identificación paso por un proceso de siembra, una de las características principales y de observación directa son la forma, tamaño y color que nos darán la primera clasificación de las cuales se tabularon 50 bacterias. Del total de las 5<sup>o</sup> muestras más de 50 % tuvieron una similitud en cuanto a la forma redonda y 42% color amarillo.

En el resumen estadístico para estas cepas están clasificadas por género, en la siguiente tabla se detalla la mediana y la desviación estándar para cada uno de las identificaciones donde sobresalieron los siguientes géneros bacterianos:

**Resumen Estadístico para B.% ID**

<i>IDENTIFICACION BIOQUIMICA</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desviación Estándar</i>
<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobrii</i>	1,8	2.34
<i>Vibrio alginolyticus</i>	48,7	56,467
<i>Vibrio mimicus</i>	0,1	0,0447214
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99,9	34,8957
<i>Vibrio vulnificus</i>	49,85	70,3571
Total	49,55	50,8323

*Tabla 7.IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA*

*Fuente: Autor,2022*

## **CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y DISCUSIONES**

### **4.1 DISCUSIONES**

Una de las principales zonas que se ve afectada por tener una alta carga bacteriana, es Mar Bravo, una de las cualidades de zona son las altas salinidades que se pueden llegar a presentar. Los vibrios al ser organismos cosmopolitas están en el medio y llegan a ocasionar problemas cuando presentar inestabilidad y entran en estrés, una de estos parámetros es el cambio de temperatura.

Las estrategias profilácticas en los sistemas de cultivo de camarón en las últimas décadas han tenido un gran avance, se reemplazaron los antibióticos por productos como probióticos, ácidos orgánicos y aceites esenciales esto como una opción amigable con el ecosistema y la salud humana, el autor (VILLAVICENCIO., 2019) indica que los procesos para mantener un ambiente estable y equilibrado para el cultivo, por lo tanto, para lograr la profilaxis se pueden hacer uso de microorganismos benéficos como también productos que provienen de animales. Esto ayudara y mejorara el crecimiento como la supervivencia del organismo en cultivo, sin causar algún efecto perjudicial y residual en el medio ambiente haciendo de esta una actividad amigable con el ecosistema.

El autor (PRECIADO., 2016), en su artículo menciona que “*La causa del calentamiento global ha hecho que el aumento de microorganismos patógenos en los océanos se vea en un incremento en los últimos tiempo*”. En su investigación se centra en el género *Vibrio* y en sus tres principales especies: *V. cholrae*, *V. Vulnificus* y *V. parahemolyticus* las estadísticas de su proyecto demostraron que el *V. Vulnificus* se ha apoderado de las aguas del océano Pacífico, siendo este patógeno de interés para los laboratorios de producción del *L. vannamei*.

Una de las opciones que se han desarrollado para la profilaxis en el área de larvicultura son probióticos, aceites esenciales y ácidos orgánicos. (VILLAVICENCIO., 2019) menciona que el accionar de los probióticos en las larvas de camarón mejora el crecimiento y ayuda a mejorar el cultivo, y que no es necesario esperar que se presenten enfermedades o anomalías para suministrar estos productos.

Los aceites esenciales gracias a su composición aromática son reconocidos por presentar efectos antimicrobianos intervienen en la translocación y penetración de la estructura celular de las bacterias, (Ortega. I. , 2008). Por otro lado, (GARCIA., 2012) menciona que mediante la técnica microbiológica M.I.C se realizó una prueba con el aceite de orégano para medir la capacidad de inhibición en placa del aceite, comparados con antibióticos comerciales, para la bacteria *V. parahemolyticus*, aisladas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, teniendo como resultado 50 y 100 µg/mL, mientras que en nuestro ensayo tuvimos resultados mínimos de 400 µg/mL.

## 4.2 CONCLUSIONES

La patología en fresco es un examen que nos permite observar directamente anomalías externas, ya sean estas lesiones en branquias, necrosis en apéndices, color y textura de la larva.

Para el primer estadio Nauplio, a pesar de que el organismo tiene milímetros de tamaño se realizó siembras en agar TCBS que nos permite identificar cuál es la cantidad de carga bacteriana. En el estadio de Zoea siendo el de mayor cuidado se pudo identificar algunas muestras con afecciones a nivel del intestino, conocidas como el síndrome de bolitas que sin un control llega a ser mortal para los tanques infectados. Y para finalizar, el Post larva la patología en fresco se basa en la observación directa de: branquias, intestino, hepatopáncreas y la ampolla, este examen en fresco nos permitió dar con los primeros indicios de enfermedades que serían respaldados por estudios microbiológicos.

En el conteo bacteriano que realizado obtuvimos los valores por estadios haciendo una comparación entre los cuatro laboratorios muestreados, dándonos así que para el estadio de Zoea una mayor carga bacteriana y en Post larva los conteos se mantuvieron dentro de los rangos establecidos.

Dentro del estudio bioquímico que se realizó a las cepas apuntó a que, las especies *V. vulnificus* y *V. parahemolyticus* fueron los protagonistas en los tanques muestreados con un porcentaje del 99% y 49 % en las muestras de larvas.

Entre las técnicas descritas en este trabajo de investigación, tenemos M.I.C. la manipulación para este protocolo fue de enfrentar las 4 cepas patógenas de mayor impacto en la larvicultura (*V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. vulnificus* y *Pseudomona*) versus los productos de uso común en los laboratorios, esto nos dio como resultado concentraciones mínimas de uso para cada producto donde ataca a dichas bacterias.

Los aceites esenciales y ácidos orgánicos demostraron tener mayor capacidad antagónica ante las principales bacterias que existen en el medio, sin embargo, los probióticos ayudaron a que el sistema inmune de los camarones sea más resistente y la carga bacteriana mejore con las estrategias profilácticas.

## CAPITULO 5 BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, K. (2018). *Protocolo de Microbiología*. Departamento de Análisis MICROBIC , Santa Elena, Ecuador.

APIWEB. (2010). *MODELAMIENTO DE LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA*.

Aquino., O. (2013). *Análisis y propuestas de mejoras en la productividad del laboratorio de larvas de camarón .*

Araguren ., F. (30 de agosto de 2020). Este estudio es el primero en reportar una “fase persistente” de esta importante enfermedad. *GLOBAL SEAFOOD*.

BioMerux. (2010). *MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA API .*

Bizzini A, D. (2010). *Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol.*

Cámara Nacional de Acuacultura. (2019). *Estadísticas*. Obtenido de <http://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>

Carrasco ., L. (2004). Métodos de estudio de los cambios estructurales en. *Ciencia al Día*, 1-14.

- Carvajal, J. B. (2016). *Efecto de dos tipos de dietas: comercial y experimental sobre el crecimiento de camarones Litopenaeus*.
- Carvana., F. (2019). *Manual práctico de Bacteriología Marina. Laboratorio de Guayaquil*.
- CENAIM. (2020). *CONCENTRACIÒN MÌNIMA INHIBITORIA*. GUAYAQUIL.
- Cercenado., E. (2013). *MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE MICROBIOLOGÍA*.
- CNA. (2017). *MANEJO SOSTENIBLE Y RENTABLE DE LA HEPATOPANCREATITIS NECROSANTE*.
- Cortes., C. (2021). *PATÓGENOS EN LARVICULTURA*. SANTA ELENA .
- Cuéllar., J. (2018). *GUIA TECNICA DE PATOLOGIA E INMUNOLOGÍA DE CAMARONES PENNAEIDOS*. Panamá.
- Delgado Samaniego, P. A. (2019). *Diseño de un sistema de control aplicado al proceso de cría de larvas de camarón para el Grupo Empresarial LARDEMA, Módulo San Juan*". Recuperado el 2021, de Tesis de pregrado. Universidad católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador.: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/13390/1/T-UCSG-PRE-TEC-IEM-234.pdf>

- FAO. (2004 ). *MANEJO SANITARIO Y MANTENIMIENTO DE LA BIOSEGURIDAD DE LOS LABORATORIOS DE POST LARVAS DE CAMARÓN BLANCO* .  
Guayaquil p. 393-486.: Documento técnico de Pesca. Volume I: Crustacean Aquaculture. CRC Press,.
- FAO. (2017). *CAMARICULTURA EN AMÉRICA LATINA* .
- Fennuci, J. (2006). *Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica*. México, México: Publisisa Mexicana; CYTED. .
- FERNANDEZ, C. &. (2011). *DESARROLLO LARVARIO DEL CAMARÓN* .
- GARCIA., M. (2012). *EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESEMCIAL ORRGANO EN BACTERIAS PATÓGENAS* . MEXICO.
- Guarnner., F. (2018). *Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad*. Madrid: versión On-line ISSN 1699-5198versión impresa ISSN 0212-1611.
- Guitierrez, L. (18 de ener de 2018). ACEITES ESENCIALES: MECANISMO DE ACCIÓN SOBRE BACTERIAS PATÓGENAS . *PLUSVET ANIMAL HEALTH*, págs. 12-16.
- Gutiérrez., e. a. (2015). *TRATAMEJNTOS DE PREVECNCIÓN PARA CAMARONES BLANCOS*.
- IDEXX. (2018). *GUÍA DE CONCETRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA*.

- Jimenez, R. (1992). *Síndrome de Taura (Resumen). Acuicultura del Ecuador. Revista especializada de la Cámara de Productores de Camarón. Pag. 59.*  
Ecuador.
- José, E. (2018). *Estudio microbiológico del agua en diferentes puntos de recorrido de un laboratorio de larvicultura.*
- Kirk, J., L.A. Beaudette, M. H., & P. Moutoglis, J. N. (2005). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of.*
- Kobayashi, T. (2018). *A new selective isolation médium for vibrio group on a modified Nakanishishi's.*
- Kumar, T. S. (2017). *Zoea-2 syndrome of Penaeus vannamei in shrimp hatcheries. .*  
Aquaculture.
- L, B. (2017). AGAR TCBS PREPARACION Y USOS. *Becton Dickinson France SA,*  
45-49.
- La Scola., B. (2015). *Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry.*
- Magazine, P. A. (2021). *¿Cómo actúan los ácidos orgánicos en el camarón? ISSU,*  
VOL.26 .

- Milian, G. (2005). Empleo de probióticos a base de *Bacillus* sp y sus endosporas en la producción agrícola. Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. La Habana. 16.
- Molina., C. (2021). *Health management in shrimp ponds Society, Baton Rouge. L. A., USA.*
- Molina., C. e. (2021). *Acción antibacterial de los aceites esenciales y su efecto sobre el crecimiento en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei.* Guayaquil.
- Monrroy, .. O. (2015). *ENFERMEDADES BACTERIANAS*. Elsevier, Amsterdam. 169 p.
- Morales, V., & Cuéllar, J. (2014). *Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos (Segunda ed.)*. Panamá, República de Panamá: OIRSA.
- Ortega., A. (2018 ). *Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo.*
- Ortega., I. (2008). *ACEITE ESENCIALES Y SU ACCION EN LA LARVICULTURA.*
- OSPESCA. (27 de Abril de 2013). Nueva enfermedad “EMS/AHPNS” en camarones cultivados en Asia. *OSPESCA*, pág. 13.16.

Pozo., Y. (2005). “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS EN SISTEMAS DE ENGORDE DE CAMARÓN .

PRECIADO., A. (2016). *EL CALENTAMIENTO GLOBAL Y LOS VIBRIOS*.

Proecuador. (2019). *Ficha del camarón*. Obtenido de <https://www.proecuador.gob.ec/ficha-de-camaron/>

Salazar., E. (2008). *Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género Acinetobacter y otros bacilos gramnegativos no fermentadores*. Caracas : Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.28 n.2.

Sanjuan., N. (2013). *MECANISMOS DE LESIÓN INDUCIDOS POR BACTERIAS PATÓGENAS INTRACELULARES*. Buenos Aires.

SanMiguel, L. (1996). *Caracterización de una bacteria probiótica en Penaeus vannamei y estudio in vivo de la interacción con una bacteria patógena*. Obtenido de Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Siñoes., N. (2007). *Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de Penaeus vannamei en Ecuador. memorias del 1er. Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 2003-2007*. Ecuador, Guayaquil.

- Soluap, E. (2019). *Introducción a las Patologías de Camarones Penaeus en Cautiverio*. Guayaquil, Ecuador : "Ediciones Cabal Ltda".
- Suquilanda., M. (2017). *Majeno adecuado de suelos, Ministerio de Agricultura*. Quito: Empresa Pública Medios Públicos del Ecuador.
- Toledo, A. C. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. *Artículo de revisión. Producción Animal*, 57-71.
- Trujillo, L. R. (2015). *Estrategias naturales para mejorar el crecimiento y la salud en los cultivos masivas de camarón*.
- Tulio, J., & Prado , D. (2017). *Microbiología lo esencial y lo practico*. Obtenido de Organización Panamericana de la salud.: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51601/MicrobiologiaPractico\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51601/MicrobiologiaPractico_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Uña, F. S. (2017). . Lactobacillus pentosus en la alimentación. *Producción Animal*, 29(1), 7-15.
- Vega., J. (2019). *Principales medidas profilácticas y terapéuticas utilizadas para la prevención de enfermedades en cultivos de camarón blanco litopenaeus vannamei*. Machala.
- Villacres., B. (2016). *iNCIDENCIAS ALIMENICIAS DEL CAMARÓN BLANCO Pennaeus Vannamei*.

VILLAVICENCIO., J. (2019). *PRINCIPALES MEDIDAS PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS UTILIZADAS PARA LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES EN CAMARONES . MACHALA.*