



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD CIENCIAS DEL MAR**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Previo a la obtención del título de:

**BIÓLOGA**

**Tema:**

**Cepas de *Bacillus* spp. con potencial probiótico contra *Vibrio* patógenos en el cultivo de *Penaeus vannamei***

**AUTOR:**

**PANCHANA MAGALLANES NATHALY MICHELLE**

**TUTOR:**

**Q.F. MERY RAMÍREZ MUÑOZ, Ph.D**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2025**

**UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**CEPAS DE *Bacillus* spp. CON POTENCIAL PROBIÓTICO**  
**CONTRA *Vibrio* PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE *Penaeus vannamei***

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Previa a la obtención del Título de:**

**BIÓLOGA**

**AUTOR:**

Panchana Magallanes Nathaly Michelle

**TUTOR:**

Q.F. Mery Ramírez Muñoz, Ph.D

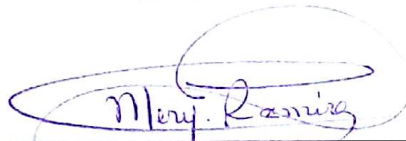
**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2025**

# DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, **CEPAS DE *Bacillus* spp. CON POTENCIAL PROBIÓTICO CONTRA *Vibrio* PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE *Penaeus vannamei***, elaborado por **PANCHANA MAGALLANES NATHALY MICHELLE** estudiantes de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



---

Q.F. Mery Ramírez Muñoz  
**DOCENTE TUTOR**  
**C.I. 0907694186**

# DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “Cepas de *Bacillus* spp. con potencial probiótico contra *Vibrio* patógenos en el cultivo de *Penaeus vannamei*”, elaborado por PANCHANA MAGALLANES NATHALY MICHELLE, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



---

Blga. Ángela Reyes MSc.  
**DOCENTE DE ÁREA**  
C.I. 0913401014

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios y a mi familia, sobre todo y con mucho amor a mi mamá María Magallanes por ser mi pilar y mi mayor inspiración, le dedico este logro porque su cariño, sacrificio y apoyo incondicional ha estado siempre a mi lado, cada palabra de aliento es el fundamento de todo lo que soy. A mi papá José Panchana por estar presente en cada uno de mis logros, por enseñarme el valor del trabajo y la perseverancia. A Génesis P.; Lissette M.; Jaydeen R. y Raúl R. por su compañía, por ser incondicionales y estar conmigo en cada paso de la vida. A mis amigos cuya compañía constante ha hecho más placentero este camino universitario.

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mi más sincero agradecimiento:

A LABMARCORSA S.A., por abrirme las puertas y darme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de investigación en sus instalaciones, permitiéndome enriquecer mis conocimientos y adquirir nuevas experiencias en el ámbito profesional.

De manera especial, al Blgo. Cristóbal Domínguez MSc., por su valiosa guía, paciencia y constante asesoría técnica, que fueron fundamentales para alcanzar los objetivos propuestos. A la Tnlg. Adriana Mieles y Blga. Cindy Baque, por su colaboración, conocimientos compartidos y por estar siempre dispuestas a brindar su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Q.F. Mery Ramírez PhD, Tutor académico por su invaluable guía y dedicación durante este proceso. Su experiencia, compromiso, su constante apoyo fueron esenciales y por motivarme a dar siempre lo mejor de mí.

# TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **PANCHANA MAGALLANES NATHALY MICHELLE** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

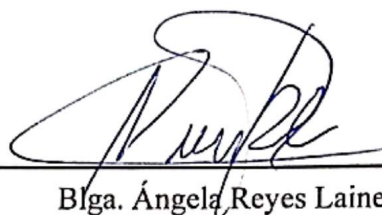
Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 9 de julio del 2025



Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.

**DIRECTOR/A DE CARRERA**

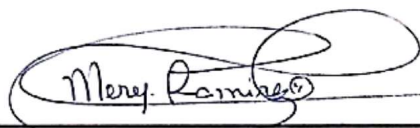
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Blga. Ángela Reyes Lainez, MSc.

**PROFESOR DE ÁREA**

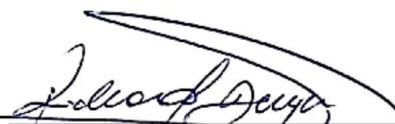
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Q.F. Mery Ramírez Muñoz, Ph.D.

**DOCENTE TUTOR**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blgo. Richard Duque Marín, MSc.

**DOCENTE GUÍA DE LA UIC II**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Lic. Pascual Roca Silvestre, Mgtr.

**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **Declaración expresa**

La responsabilidad y compromiso por los datos y resultados presentado en este trabajo de Integración Curricular me pertenecen exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



---

PANCHANA MAGALLANES NATHALY MMICHELLE

**C.I: 2400292716**

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
RESUMEN.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. PROBLEMÁTICA .....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. OBJETIVOS.....	7
Objetivo general: .....	7
Objetivos específicos: .....	7
5. HIPÓTESIS.....	7
Hipótesis Alternativa (H1).....	7
6. MARCO TEÓRICO .....	8
7.1. Cultivo de <i>Penaeus vannamei</i> (Camarón Blanco) .....	8
7.2. Estadíos larvarios .....	10
7.3. Enfermedades comunes en larvicultura.....	13
7.3.1. Síndrome de Zoea II o LBS .....	14
7.3.2. Necrosis hepatopancreatitis aguda (AHPND) .....	14
7.3.3. Enfermedad de luminiscencia .....	15
7.3.4. Micosis larvaria .....	16
7.4. Uso de probióticos en la acuicultura.....	16
7.4.1. Importancia.....	18
7.4.2. Exclusión competitiva .....	19
7.5. <i>Bacillus</i> spp. ....	20
7.5.1. Características .....	21
7.5.2. Aislamiento Bacteriano .....	22
7.5.3. Morfología de colonias bacterianas .....	23
8. METODOLOGÍA.....	25

8.1. Área de estudio .....	25
8.2. Recolección de muestras y aislamiento bacteriano .....	25
8.3. Capacidad antagónica de <i>Bacillus</i> contra <i>Vibrio</i> .....	28
8.3.1. Condiciones de medio de cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> y <i>Vibrio</i> .....	28
8.3.2. Actividad anti- <i>Vibrio</i> .....	29
8.3.3. Efecto protector de cepa de <i>Bacillus</i> contra <i>Vibrio</i> patógeno en larvas de <i>P. vannamei</i> .....	32
8.4. Prueba in vivo .....	33
8.5. Análisis estadístico .....	34
9. RESULTADOS .....	35
9.1. Aislamientos de bacterias y selección de <i>Bacillus</i> spp. ....	35
9.2. Actividad Anti- <i>Vibrio</i> .....	38
9.3. Concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	42
9.4. Análisis bioquímicos .....	46
9.5. Toxicidad de cepas .....	48
9.6. Prueba de desafío in vivo .....	51
10. DISCUSIÓN .....	55
11. CONCLUSIÓN .....	59
12. RECOMENDACIONES .....	60
13. BIBLIOGRAFÍA .....	61
14. ANEXOS .....	72

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Figura 1</b> Fase Naupliar .....	10
<b>Figura 2</b> Fase Zoea I.....	11
<b>Figura 3</b> Estadio Mysis.....	12
<b>Figura 4</b> Post larva de camrón.....	13
<b>Figura 5</b> Morfología colonial de bacterias .....	24
<b>Figura 6</b> Zonas del Área de estudio.....	25
<b>Figura 7</b> Diluciones seriadas 1:10 .....	26
<b>Figura 8</b> Siembra por agotamiento en placas TSA +2% de NaCl .....	27
<b>Figura 9</b> <i>Criopreservante (LB + 2% NaCl + Glicerol 15%) de cepas aisladas de Bacillus</i> .....	28
<b>Figura 10</b> Pruebas de antagonismo por Cúmulos y Pocillos en Agar TSA+ 2%NaCl.....	30
<b>Figura 11</b> Antagonismo por el método difusión en agar pocillos .....	31
<b>Figura 12</b> Promedio de halos de inhibición en la Zona 1 .....	39
<b>Figura 13</b> Promedio de halos de inhibición en la Zona 2.....	40
<b>Figura 14</b> Promedio de halos de inhibición en la Zona 3.....	42
<b>Figura 15</b> Capacidad antagónica por pocillos C6.1 .....	43
<b>Figura 16</b> Capacidad antagónica por pocillos C6.9 .....	44
<b>Figura 17</b> Capacidad antagónica por pocillos C1.4 .....	45
<b>Figura 19</b> Supervivencia de presumibles Bacillus .....	49

<b>Figura 20</b> Número de larvas finales por tratamiento.....	51
<b>Figura 21</b> Porcentaje de mortalidad promedio por Tratamiento .....	52
<b>Figura 22</b> Survival Analysis por tratamiento .....	53
<b>Figura 23</b> Muestra de larvas.....	72
<b>Figura 24</b> Macerado para posterior siembra.....	72
<b>Figura 25</b> Siembras de varias diluciones agar TSA +2% NaCl.....	72
<b>Figura 26</b> Cepas candidatas a aislamiento .....	73
<b>Figura 27</b> Siembra por superficie, bacterias con actividad antimicrobiana ..	73
<b>Figura 28</b> Aislamiento por agotamiento con Asa de Platino.....	73
<b>Figura 29</b> Siembra por agotamiento de Cepa 1 .....	73
<b>Figura 30</b> Siembra por agotamiento, aislamiento y purificación. ....	74
<b>Figura 31</b> Cepas con criopreservante TSA + Glicerol 15% .....	74
<b>Figura 32</b> Cepa de Vibrio patógeno (Vibrio harveyi).....	75
<b>Figura 33</b> Estándar de McFarland .....	75
<b>Figura 34</b> Prueba de Antagonismo por cúmulos .....	75
<b>Figura 35</b> Ajuste de bacterias probióticas y patógenas a estándar de McFarland .....	76
<b>Figura 36</b> Resultados de antagonismo por cúmulos.....	76
<b>Figura 37</b> Halos de inhibición de cepa 6.1 y 6.9 .....	76
<b>Figura 38</b> Crecimiento de bacteria en TSA Broth .....	77
<b>Figura 39</b> Prueba de antagonismo método pocillos .....	77
<b>Figura 40</b> Respuesta inhibitoria de cepas 6.9.....	77

<b>Figura 41</b> Post larvas sanas .....	78
<b>Figura 42</b> Separación para diseño experimentales .....	78
<b>Figura 43</b> Alimentación previa con bacterias probióticas .....	78
<b>Figura 44</b> Aislado de bacterias probióticas .....	79

### **INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Etapas del crecimiento larvario .....	10
<b>Tabla 2</b> .....	33
<b>Tabla 3</b> Morfología colonial de bacterias .....	36
<b>Tabla 4</b> .....	38
<b>Tabla 5</b> Cepas aisladas de la Zona 2 resultados de prueba de antagonismo ...	39
<b>Tabla 6</b> Actividad antagónica de cepas seleccionadas de la Zona 3 .....	41
<b>Tabla 7</b> Tasa de supervivencia en el diseño experimental .....	49
<b>Tabla 8</b> Prueba de comparación múltiple Dunnett .....	50
<b>Tabla 9</b> Análisis Tukey de tratamientos .....	52

## **ABREVIATURAS**

UFC: Unidad formadora de colonia

TSB: Tryptic Soy Broth

LB: Luria Berthani Broth

NaCl: Cloruro de Sodio

Hpe: Horas post exposición

CFS: Sobrenadante libre de células

## RESUMEN

La camaronicultura en Ecuador enfrenta serios desafíos sanitarios, particularmente en la etapa larval, debido a enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio*, las cuales provocan altas tasas de mortalidad y pérdidas económicas significativas. Ante la creciente resistencia bacteriana y los efectos secundarios del uso de antibióticos, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial probiótico de cepas locales de *Bacillus spp.* aisladas de ambientes marinos, como alternativa biológica para el control de patógenos en el cultivo larvario de *Penaeus vannamei*. Se aislaron 38 cepas bacterianas de tres zonas de producción larvaria (Monteverde, Ballenita y La Diablica), de las cuales se seleccionaron cuatro (6.1, 6.9, 1.4 y C13) por su destacada actividad antimicrobiana contra *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. vulnificus*, evaluada mediante pruebas de difusión en agar y antagonismo por cúmulos. La cepa 6.9 mostró halos de inhibición de hasta 13 mm en concentraciones de  $10^8$  UFC/mL, siendo una de las más efectivas. Las cepas seleccionadas se sometieron a pruebas in vivo en larvas sanas de *P. vannamei*, con tratamientos diarios durante siete días. Posteriormente, las larvas fueron desafiadas con *V. parahaemolyticus*. Los resultados demostraron que los tratamientos con *Bacillus* redujeron significativamente la mortalidad larval frente al grupo control infectado, el cual presentó una mortalidad del 53.8%, mientras que los tratamientos con cepas 6.1 y 6.9 redujeron la mortalidad hasta valores entre 12% y 20%, sin efectos tóxicos. Se concluye que las cepas locales de *Bacillus spp.* poseen un alto potencial probiótico, siendo eficaces para mejorar la supervivencia larval y controlar infecciones bacterianas en la camaronicultura ecuatoriana, constituyéndose como una alternativa sustentable frente al uso de antibióticos.

**Palabras clave:** *Bacillus spp.*, *Vibrio*, larvicultura, probiótico, *Penaeus vannamei*.

## ABSTRACT

Shrimp farming in Ecuador faces serious health challenges, particularly at the larval stage, due to diseases caused by bacteria of the *Vibrio* genus, which cause high mortality rates and significant economic losses. Given the growing bacterial resistance and side effects of antibiotic use, this research aimed to evaluate the probiotic potential of local strains of *Bacillus* spp. isolated from marine environments as a biological alternative for pathogen control in larval *Penaeus vannamei* culture. Thirty-eight bacterial strains were isolated from three larval production areas (Monteverde, Ballenita, and La Diablica), of which four were selected (6.1, 6.9, 1.4, and C13) for their outstanding antimicrobial activity against *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, and *V. vulnificus*, evaluated by agar diffusion and cluster antagonism tests. Strain 6.9 showed inhibition zones of up to 13 mm at concentrations of  $10^8$  CFU/mL, making it one of the most effective strains. The selected strains were tested in vivo on healthy *P. vannamei* larvae, with daily treatments for seven days. The larvae were subsequently challenged with *V. parahaemolyticus*. The results showed that treatments with *Bacillus* significantly reduced larval mortality compared to the infected control group, which had a mortality rate of 53.8%. Treatments with strains 6.1 and 6.9 reduced mortality to levels between 12% and 20%, without toxic effects. It is concluded that local strains of *Bacillus* spp. have high probiotic potential, being effective in improving larval survival and controlling bacterial infections in Ecuadorian shrimp farming, constituting a sustainable alternative to the use of antibiotics.

**Keywords:** *Bacillus* spp., *Vibrio*, larviculture, probiotic, *Penaeus vannamei*

# 1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento a gran escala del cultivo de camarón *Penaeus vannamei*, se refleja mundialmente con cifras que han aumentado de 155 mil TM en 2000 a 5,8 millones de TM en 2020, finalmente para el 2022 la producción global fue seis millones de toneladas métricas (FAO 2024). El desarrollo productivo se acrecentó desde aproximadamente alrededor de 20 años atrás, lo que ha permitido al Ecuador liderar la producción del camarón en el mundo (Piedrahita Y. , 2018). Sin embargo, la industria camaronera afronta diferentes desafíos incluyendo los patógenos que merman la producción.

Entre las medidas profilácticas utilizadas para mitigar los problemas con patógenos bacterianos presentes en la camaronicultura se puede mencionar fertilizantes inorgánicos, ácidos orgánicos, vitaminas, aceites esenciales, inmunoestimulantes, antibióticos y probióticos (Coronel y Sorroza, 2019). No obstante, los residuos de antibióticos provenientes de alimentos como el camarón pueden ocasionar efectos adversos en los consumidores y el medio ambiente (FAO, 2002). Como una de las alternativas amigables con el ambiente ha sido propuesto el uso de probióticos para el cultivo de camarón, como menciona (Hossein Khanjani, Torfi Mozanzadeh, Gisbert, &

Hossein Hoseinifar, 2024) fortalece el sistema inmunitario, mejora la resistencia a enfermedades infecciosas y disminuye la mortalidad.

Se ha descrito que bacterias del género *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Lactococcus*, e incluso algunas especies del género *Vibrio*, mejoran el crecimiento y la salud de especies de camarones de cultivo (Kewcharoen & Srisapoome, 2019). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en la cualidad probiótica del uso del género *Bacillus* como principal género, sobresaliendo como agente biocontrolador más usado en la industria camaronera, entre las especies que destacan se encuentran: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus* (Subuntit et al., 2020).

Entre las cualidades probióticas de los *Bacillus* destaca la amplia gama de producir sustancias extracelulares como tripsina, lipasa, amilasa y péptidos antimicrobianos como la bacilomicina, surfactina y subtilina que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, además de su capacidad de colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal (Proespraiwong, Mavichak, Imaizumi, Hirono, & Unajak, 2023). Todas estas características los vuelven candidatos idóneos para controlar cepas de *Vibrio* patógenas que se presenta como el principal problema de la larvicultura (Abdollahi-Arpanahi, y otros, 2018).

Según (Flegel, 2012) indica que el 20% de las pérdidas por enfermedades en la acuicultura de camarón han sido causadas por patógenos bacterianos, predominando las bacterias del género *Vibrio*. Los brotes de enfermedad se han asociado con vibriosis causada por bacterias patógenas como *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbelli* y *V. vulnificus*, aunque la mayoría de las especies del género han sido determinadas como patógenas, también existen especies calificadas como probióticas en el caso de *V. diabolicus* y *V. hepatarius* (Ramírez et al., 2022).

La presente investigación tiene como finalidad la evaluación de cepas de *Bacillus* spp. locales aislados de tres diferentes sitios de producción larvaria, con el propósito de determinar su capacidad antagónica para actuar como potencial probiótico frente a patógenos del género *Vibrio*, debido al poco conocimiento que existe sobre el uso de cepas de *Bacillus* endémicas y propias de ambiente marino (cultivo de camarón), y que han sido escasamente evaluadas en el cultivo de *P. vannamei* en Ecuador, se ha demostrado que muchos probióticos que tienen como base *Bacillus* no prosperan en ambientes marinos presentando una abundancia menor al 1% en el desarrollo larvario (Shan, y otros, 2025) (Domínguez-Borbor, y otros, 2019).

## 2. PROBLEMÁTICA

La larvicultura de *Penaeus vannamei* en Ecuador, enfrenta desafíos para mantener la salud animal en condiciones óptimas, la aparición de enfermedades virales o bacterianas afectan gravemente la supervivencia de los animales. La coexistencia de microorganismo en conjunto con los cambios ambientales de la producción resulta el factor primordial para la presencia de distintas especies de hongos, virus, parásitos y bacterias, provocando enfermedades y a su vez un ascenso en altos porcentajes de mortalidad, causando grandes pérdidas económicas (Sarango Vivanco, 2021).

Los problemas de enfermedades del camarón son comunes en la industria, como menciona (Shinn et al., 2018) causan enormes pérdidas de ingresos, que ascienden a 4 mil de millones de dólares anuales según lo reportado durante el período de 2009 a 2018. Anteriormente los antibióticos eran comúnmente utilizados en el sector, no obstante, el uso de estos y otros compuestos generan resistencia bacteriana, por lo que las recientes tecnologías aplicadas a este sector acuícola han permitido incrementar el volumen de producción a través de la diversificación de las especies. Dando como resultado que más del 50% del producto final que se consumía procediera de esta industria debido a la gran demanda de productos marinos (Sorrosa et al., 2014).

Diversas bacterias patógenas como *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*, han sido asociadas con mortalidades durante la larvicultura y el engorde de camarón, desencadenando múltiples patologías y problemas en la producción, colonizando a su vez el tracto digestivo y disminuyendo la efectividad del sistema inmune innato del hospedero. Es recomendable y necesario intensificar las investigaciones que permitan desarrollar diferentes tipos de probióticos efectivos y evaluar su actividad para evitar pérdidas económicas y a su vez, incrementando el uso de bacterias competitivas contra patógenos (Barrantes, 2023).

La selección y aplicación de probióticos que no son adecuados afectan de forma negativa al metabolismo de los diferentes nutrientes del organismo y la resistencia a patógenos, por lo tanto, es ampliamente utilizada como herramienta de control biológico debido a su elevada y viable habilidad que poseen las cepas o el conjunto bacteriano seleccionado para lograr impedir el crecimiento de bacterias oportunistas, así lograr establecer las condiciones y comunidad microbiana en los individuos y su presencia perenne en el agua del cultivo (Villamil y Martínez-Silva, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los principales grupos bacterianos han generado interés debido a su impacto benéfico con mayor eficacia contra una amplia gama de microorganismos oportunistas, muchos de estos insumos probados actualmente no solo en producción de camarones peneidos sino también en cangrejos, moluscos y peces principalmente marinos donde predomina el género *Bacillus* (Pérez-Chabela et al., 2020).

Generalmente, los aislados de *Bacillus* se pueden encontrar en el suelo y en el agua y adherirse en el tracto digestivo con el ácido y las sales biliares del camarón, estas bacterias Grampositivas, tienen la capacidad de colonización y sobrecrecimiento de patógenos. La administración dietética de probióticos controla diversos patógenos durante el cultivo animal (Kewcharoen & Srisapoome, 2019).

El aislamiento de nuevas cepas de *Bacillus* que tengan capacidad y características bio-floculantes con un alto potencial probiótico, permite ampliar el campo de soluciones para los problemas en la camaronicultura, por ello la necesidad de cubrir temas investigativos acerca de bacterias nativas de los cultivos podrían generar una mejor respuesta inmune en el estudio de probióticos que sean provenientes de ambientes acuáticos.

## 4. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Evaluar el potencial probiótico de cepas de *Bacillus* spp. mediante el aislamiento y la aplicación en el medio de cultivo larvario, determinando su efecto contra *Vibrio* patógeno y mejorando la supervivencia en la larvicultura de *Penaeus vannamei*.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar *Bacillus* spp. con cualidades probióticas de cultivos de *Penaeus vannamei* para la obtención de la(s) cepa más activa.
- Determinar el efecto inhibitorio de las cepas de *Bacillus* spp. contra *Vibrio* patógenos de relevancia para la larvicultura mediante pruebas microbiológicas *in vitro*.
- Evaluar el efecto probiótico *in vivo* de la(s) cepa más activa mediante una prueba desafío usando como modelo larvas sanas de *Penaeus vannamei* expuestas al *Vibrio* patógeno seleccionado.

## 5. HIPÓTESIS

### **Hipótesis Alternativa (H1)**

Los aislados locales de *Bacillus* poseen actividad inhibitoria contra *Vibrio* y pueden ser usados como potenciales probióticos en larvicultura de camarón.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 7.1. Cultivo de *Penaeus vannamei* (Camarón Blanco)

El cultivo del camarón tiene orígenes en Ecuador hace más 50 años, las primeras empresas de cultivo del camarón blanco se establecieron por primera vez en el sur del Ecuador, aumentando alrededor de 220 mil hectáreas de piscinas de producción, las cuales conforman gran parte de la fuente primordial de ingresos extranjeros en nuestro no derivados del petróleo, ya que más del 40% de las exportaciones ecuatorianas están comprendidas en este sector (Piedrahita Y. , 2018).

Además, la comparación con respecto a nuestro país evidencia la ventaja de los factores climáticos en relación con la producción y efectividad de las especies cultivadas, donde las producciones de tipo semi intensivo es mayor. Se debe destacar que en los últimos años la mejora de productividad se ha dado gracias a los modelos intensivos y tecnificados que se han empleado en las producciones. Las provincias como Guayas, Manabí, El Oro y Santa Elena son zonas costeras donde se encuentran ubicados los estanques principales para la cría de camarones, la implementación de

sistemas de monitoreo continuo garantiza las condiciones de temperatura, oxígeno y salinidad mejorando la calidad de agua.


A medida que asciende el crecimiento de la industria camaronera ecuatoriana, uno de los aspectos que ha impulsado este incremento es la adopción de tecnología avanzada que permite, optimizar varios procesos necesarios en la producción. El uso de alimentación automatizada, sistemas de aireación eficientes y modelos de cultivo basados en biofloc han permitido mejorar la producción y reducir la dependencia del agua. Además, se han desarrollado estrategias de control sanitario para prevenir enfermedades tales como el WSSV (virus de la mancha blanca) y el síndrome de mortalidad temprana, que en el pasado han afectado la industria.

Según los informes estadísticos anuales de la Cámara Nacional de Acuicultura para el año 2024, es decir de enero-diciembre, la producción de camarón alcanzó 2.671.219.027 libras, lo que representa un incremento con respecto a 2023 (2.676.645.175 libras) en términos de ingresos en dólares donde Ecuador generó 6.068.447.480 USD, lo que significa un aumento con respecto a los años anteriores (Cámara Nacional de Acuicultura, 2025).

## 7.2. Estadíos larvarios

El cultivo de camarón blanco consta de varias etapas entre ellas, está la larvicultura que garantiza el crecimiento y la producción de post larvas de alta calidad para abastecer a las piscinas de engorde. Como menciona (Garnica, 2016), las larvas de camarón atraviesan 3 etapas tales como: etapa naupliar, etapa protozoa y etapa de Mysis, antes de llegar a su estadio final post larva con diferentes características. Tabla 1.

**Tabla 1.** Etapas del crecimiento larvario

<i>Estadio</i>	<i>Descripción</i>	<i>Imagen</i>
<i>Nauplio</i>	Esta primera fase está caracterizada por su notable fototactismo positivo, cuerpo periforme con tres pares de apéndices notables que poseen capacidad natatoria, durante estas 12 horas de cambios entre los cinco subestadios el animal no consume alimento del medio externo, por lo que en su lugar consume las reservas acumuladas (Soluap, 1998).	<p><b>Figura 1</b> <i>Fase Naupliar</i></p> 

## ***Zoea***

La etapa de Zoea está definida por el cambio de estructura corporal, la aparición del cefalotórax es distintivo, las anténulas y antenas se encargan de la locomoción que permite el desplazamiento vertical, posee ojos compuestos y telson espatulado. Este estadio de Zoea presenta 3 subestadios (Soluap, 1998).

***Figura 2***

*Fase Zoea I*



### ***Mysis***

Las características similares a la de un camarón adulto, donde se distingue de la característica natación dando brincos y en lado contrario, la formación de pleópodos y de la cola, no les permite tener mayor movimiento y agilidad.

La duración en esta fase es de 3 días donde su longitud de tamaño llega hasta 5mm (Bermúdez , Nieves-Soto, Flores , & López, 2022).

***Figura 3***

Estadio Mysis



### ***Post-larva***

La etapa final de post larva donde su proceso de metamorfosis lo convierte en juvenil, asemejándose a su etapa adulta en la mayor parte de su morfología menos en el rostro y los órganos reproductores, llegando a ser su fase más activa y donde necesita de mayor consumo de alimento, llegan a medir

desde 7 a 11 mm en ambientes no controlados.

La característica que destaca es la cabeza ancha, rostro acortado pero fino en la parte anterior del mismo, una vez que su rostro alcanza una longitud de 5mm es notorio el crecimiento en la parte dorsal 3 a 4 dientes (Fennuci & Mallo, 2004).

**Figura 4**

*Post larva de camarón*



*Nota.* Adaptado de Desarrollo ontogenético post larvario, por Fernando Huerta, 2021, Global Seafood (<https://www.globalseafood.org>)

### **7.3. Enfermedades comunes en larvicultura**

Los patógenos bacterianos que ocasionan repercusiones en el cultivo de camarón se encuentran generalmente en ambientes acuáticos marinos de forma natural, siendo oportunistas cuando existe en estado de estrés o debilitado, atacando a los animales; y haciéndolos vulnerables y sensibles ante cualquier agente.

### **7.3.1. Síndrome de Zoea II o LBS**

Las altas mortalidades que se presentan por causa de esta enfermedad ocurren 36-48 horas luego de la metamorfosis de Zoea I- II, esta dará paso a la infección y aprovechamiento del medio. La sintomatología más ocurre de forma rápida con evacuación frecuente del contenido intestinal, letargo y la disminución de actividad junto con nado erráticos y la permanencia de infectados en el fondo de los tanques.

En el lumen o la luz de los túbulos del hepatopáncreas, se ha observado la presencia de pequeñas formaciones blancas, que han sido llamadas “bolitas blancas”, dichas bolitas son células descamadas del hepatopáncreas o hepatocitos hipertrofiados y redondeados que se ven como formaciones esféricas. Esas células se pueden visualizar generalmente en el tracto digestivo, siendo notables en el cultivo larvario e induciendo su presencia debido a las toxinas bacterianas del agente patógeno (*Vibrio* spp.) (Gómez, Roque , & Guerra, 2008).

### **7.3.2. Necrosis hepatopancreatitis aguda (AHPND)**

La enfermedad de AHPND o Síndrome de mortalidad temprana, se caracteriza por la atrofia del hepatopáncreas, presentando una coloración pálida o blanquecina, frecuentemente acompañada de manchas o líneas de pigmentación oscura. Los organismos afectados muestran signos clínicos como letargia, exoesqueleto blando, retardo en el crecimiento e intestino vacío. Esta patología común está asociada con cepas del *Vibrio parahemolyticus* que portan genes codificantes de toxinas las cuales causan procesos de citotoxicidad y finalmente culminan en la muerte celular (Saavedra et al., 2018).

### **7.3.3. Enfermedad de luminiscencia**

La alta mortalidad como consecuencia de esta enfermedad y han aislado las especies *Vibrio harveyi* y *V. splendidus*, siendo estos los candidatos principales causantes de la enfermedad, aunque no se ha realizado identificación molecular para determinarlo. Es común observar con luminiscencia a los organismos infectados con esta bacteria, y por ende le da su nombre, presentan también disminución de la actividad normal, nado errático, larvas en el fondo del tanque y grandes tasas de mortalidad, la colonización de infecciones bacterianas por el presente tipo de bacterias se presenta generalmente en los apéndices, el inicio del tracto digestivo y la región oral del animal (Vega, 2019).

#### **7.3.4. Micosis larvaria**

Infecciones ocasionadas por *Lagenidium* sp. y *Sirolopidium* sp. generalmente ocurren con mayor frecuencia en todos los estadios larvarios. Las infecciones por estos hongos resultan en infecciones progresivas con respuestas inflamatorias.

#### **7.4. Uso de probióticos en la acuicultura**

Aunque a principios del año 1965, los probióticos se definieron como sustancias producidas por microorganismos que favorecen a otros, la Organización Mundial de la Salud (OMS), reformuló esta definición, estableciendo que los probióticos son microorganismos vivos que cuando son suministrados en la cantidad adecuada proporcionan beneficios para la salud del hospedero (Oliveira & González-Molero, 2016).

La capacidad que poseen las bacterias de ciertos géneros para adherirse y mantenerse en el mucus entérico, es decir del tracto intestinal, resulta esencial para que

esta pueda establecerse como parte del microbiota intestinal, esta propiedad de adherencia es usada tanto por bacterias benéficas como aquellas que pueden ser patógenas. Estas bacterias beneficiosas se han utilizado en los últimos años en la industria camaronera y complementándose en los piensos alimentarios (Amiin, y otros, 2023).

Gran parte de los microorganismos probióticos propuestos para uso acuícola (cultivo de camarón), pertenecen generalmente al grupo de bacterias ácido-lácticas, por lo que se conoce que los géneros más usados son *Lactobacillus* y *Lactococcus*, seguido de *Enterococcus*, *Pediococcus*. Están consideradas como “Generally recognized as safe” (GRAS), debido a su capacidad de reducir los ensayos de seguridad biológica, es decir no son necesarios por lo que no solo mejoran la microbiota del animal sino el consorcio microbiano encargados de la calidad de agua, asegurando el excedente de residuos o daños colaterales en consumidores de estos animales cultivados (Moreira y Méndez , 2024).

Para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico existen diferentes características con las que deben cumplir, entre ellas: no dañar al huésped; manteniendo su capacidad de ser ingerido, colonizando su tracto digestivo, manteniéndose e incluso reproducción sin generar efectos adversos. Además, debe ser

capaz de alcanzar órganos y tejidos específicos, deteniendo el crecimiento y no ofrecer resistencia a las bacterias patógenas. No obstante, la evaluación *in vitro* es fundamental para seleccionarse en base a la actividad antagónica, complementándose con amplios estudios que permitan determinar la patogenicidad cuando está dentro del huésped y asegurar su aplicación (Pérez-Chabel et al., 2020).

#### **7.4.1. Importancia**

La utilización de probióticos en la acuicultura se ha realizado desde hace mucho tiempo, sin embargo se ha comprobado que los probióticos pueden neutralizar e inhibir la acción bacteriana a través de dos mecanismos: a) Producción de compuestos antimicrobianos: específicamente la producción de bacteriocinas, que son una clase de péptidos generados principalmente por dos géneros representativos en esta área (*Lactobacillus* y *Lactococcus*), estas interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana ayudando a la formación de poros; b) Exclusión competitiva: ya que impiden que las bacterias patógenas se adhieran a las células epiteliales del intestino (CEIs), es decir compiten por los sitios de adhesión como las lectinas o evitando que las toxinas se unan a receptores específicos tipo gangliósido en la superficie de dichas células (Pérez-Chabela et al., 2020b).

Por ejemplo, muchas especies del género *Bacillus* spp. pueden producir antibióticos y metabolitos oportunistas en respuesta a microbios patógenos. Así mismo, se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* Ep-M17 aumenta las enzimas digestivas (tripsina) y las enzimas antioxidantes, aumenta la inmunidad del camarón 76,9% y aumenta la tasa de supervivencia aproximadamente un 89% (Li, Tian, & Dong, 2019).

#### **7.4.2. Exclusión competitiva**

El término exclusión competitiva es un término que hace referencia a la coexistencia de especies bacterianas dentro de un mismo nicho ecológico, estas compiten por recursos limitados, nutrientes y espacio, utilizando dos estrategias: competencia por explotación y competencia por interferencia (Knipe, Temperton, Lange, Bass, & Tyler, 2020). Estas estrategias consisten en la explotación y el consumo acelerado de recursos por parte de los microorganismos, restringiendo así la disponibilidad para los competidores y priorizando el crecimiento celular.

La competencia por explotación, donde los microorganismos pueden optimizar su acceso a los nutrientes, estos mecanismos ayudan a aumentar la velocidad de captura, y a su vez la secreción de moléculas extracelulares que descomponen otras

macromoléculas. La adhesión específica a superficies mediada por la producción de receptores o compuestos extracelulares confiere ventajas en la ocupación de sustratos, así como en la resistencia al desplazamiento por organismos invasores, este tipo de adhesión es también fundamental en la formación de biopelículas, estructuras multicelulares que facilitan la cooperación y la protección de las bacterias frente a estresores ambientales y agentes antimicrobianos (Meade et al., 2020).

Dentro de las biopelículas, las células de un mismo genotipo pueden compartir recursos y aumentar su tolerancia, aunque la competencia local por nutrientes sigue siendo intensa. Además, algunos probióticos modulan la respuesta inmune del hospedador, fortaleciendo las defensas mucosas e incrementando la producción de inmunoglobulina A (IgA), péptidos antimicrobianos y citoquinas que favorecen la eliminación de patógeno (Ouwehand et al., 2002).

### **7.5. *Bacillus* spp.**

El control biológico consiste en un enfoque que permiten controlar plagas y patógenos de forma natural, sin afectar a las personas ni al medio ambiente. Un agente u organismo capaz de eliminar o inhibir el crecimiento de cualquier patógeno vegetal o animal se denomina agente de control biológico (ACB) (Lisa y Foysal, 2018). Las

especies representativas y siendo principales en las aplicaciones del género *Bacillus*, por su cualidad de formación de endosporas, siendo el principal *B. subtilis* y *B. lincheniformis* (Greeshma et al., 2021).

### **7.5.1. Características**

Entre las muchas especies probióticas descubiertas, estas especies poseen mejores características probióticas atribuyéndole su capacidad de producir sustancias antimicrobianas que son activas contra muchos otros microorganismos o bacterias y no son patógenas, adicional a esto tampoco son tóxicas, junto con su capacidad de esporulación es decir, su período de efectividad es más largo y se extiende, les da una doble ventaja junto a la termo tolerancia y su alta supervivencia la formación de endosporas confiere a las bacterias del género *Bacillus* una notable resistencia frente a condiciones desfavorables del tracto gastrointestinal (Villareal et al., 2018).

Esta estructura especializada les permite persistir en ambientes extremos o bajo estrés fisiológico, tales como acidez elevada, temperaturas superiores al rango óptimo, concentraciones significativas de sales biliares, escasez de nutrientes y procesos de desecación. Estos microorganismos presentan una intensa actividad biosintética,

destacándose por la producción de diversos compuestos con propiedades antimicrobianas.

Además, múltiples especies del género *Bacillus* poseen un alto valor biotecnológico por su capacidad de producir enzimas extracelulares de interés industrial, como la amilasa y la proteasa, utilizadas en diversas aplicaciones comerciales (Golnari et al., 2024). Existen registros que demuestran que las especies de *Bacillus* mejoran la actividad de las enzimas digestivas, la actividad de las enzimas antioxidantes, la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario, así como los genes relacionados con el estrés y, sobre todo, mejoran la capacidad de los peces para ser resistentes a los microbios patógeno (Amenyogbe, y otros, 2022).

### **7.5.2. Aislamiento Bacteriano**

El aislamiento y la identificación bacteriana son los primeros pasos de estudios investigativos bacteriológicos, estos se realizan para obtener cultivos bacterianos puros, es decir, permite conocer e identificar la morfología, la fisiología, las características bioquímicas y el reconocimiento de esta. Los cultivos puros se obtienen utilizando medios sólidos, mediante el método de estriado en placa o el método de

vertido en placa, permitiendo así observar las colonias aisladas en la última área estriada.

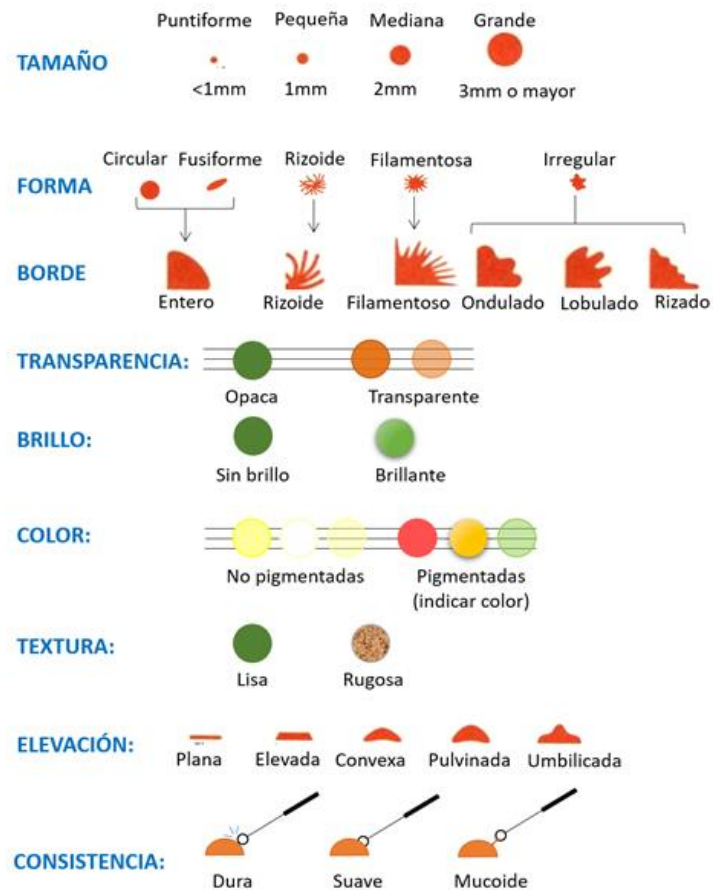
### **7.5.3. Morfología de colonias bacterianas**

Las bacterias crecen en medios sólidos como colonias, la cual se define como una masa visible de microorganismos, todos originados a partir de una sola célula madre; por lo tanto, una sola colonia bacteriana representa a varias genéticamente idénticas. La morfología de las colonias describe las características de los cultivos, por lo que hace referencia a las características visibles a simple vista de las colonias bacterianas y fúngicas que crecen en una placa de agar, describe la apariencia visual de las colonias que se forman en un medio de cultivo sólido, como un agar.

Esta apariencia incluye características como la forma, el borde, la elevación, la textura, el color y la transparencia de la colonia, por lo tanto, tienden a variar entre diferentes especies bacterianas y también pueden ser influenciadas por factores como el tipo de medio de cultivo y la temperatura de incubación.

**Figura 5**

*Morfología colonial de bacterias*



*Nota.* Adaptado de Morfología colonial, por Guillen Ana, 2020, ¡ding! Microbiología (<https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>)

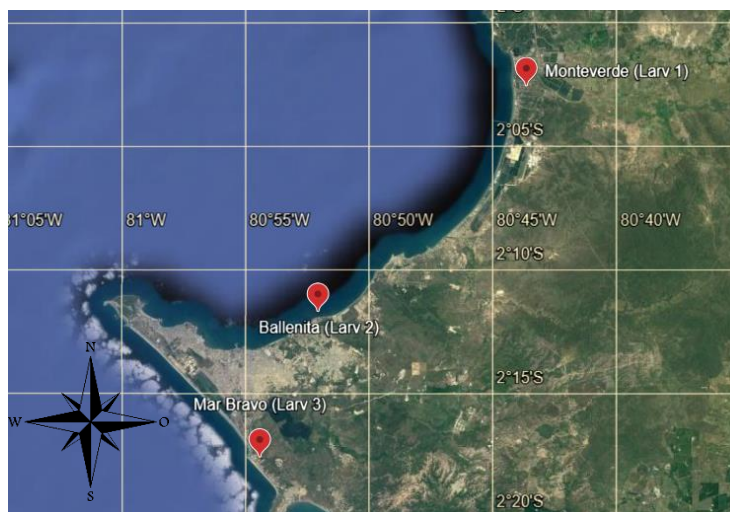
## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en tres sitios de producción de larvas de camarón *Penaeus vannamei* ubicados en la Provincia de Santa Elena, ubicadas en Monteverde (Zona 1), Ballenita (Zona 2) y La Diablica (Zona 3).

**Figura 6**

*Zonas del Área de estudio*



### 8.2. Recolección de muestras y aislamiento bacteriano

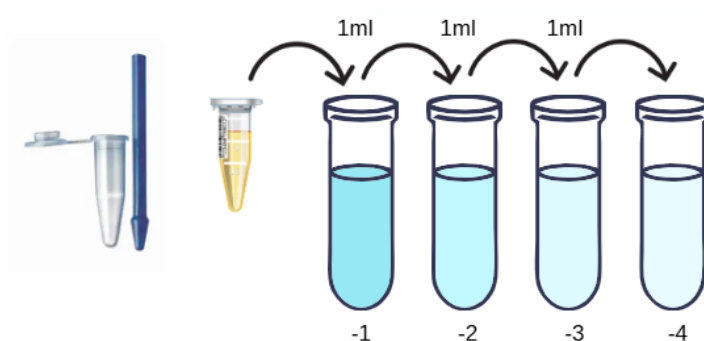
Se obtuvo un total de 6 muestras por cada sitio de producción de larvas y postlarvas (PL) de *P. vannamei*, en los siguientes estadios (Larvas: Z1, Z3; M2; Postlarvas: PL2, PL6, PL10). Las muestras se colocaron individualmente en bolsas

Ziploc con agua de mar de su entorno y fueron transportadas al laboratorio de microbiología de LABMARCORSA S.A para los respectivos análisis.

Las muestras fueron filtradas usando tamices acordes a su tamaño y enjuagadas con agua de mar esterilizada. Para el aislamiento de las bacterias se usó un gramo por muestra para ser macerado, siguiendo la metodología de (Domínguez-Borbor , y otros, 2019). Brevemente, el producto macerado se diluyó en 9 mL de agua de mar estéril, una vez homogenizado se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta series de  $10^{-3}$ , luego de la homogenización se realizó la siembra de 100 $\mu$ L de las concentraciones anteriormente mencionadas utilizando la técnica de siembra por superficie en placas Petri que contendrán AGAR TSA + 2% de NaCl y, colocadas en la incubadora a 28°C durante 18h.

**Figura 7**

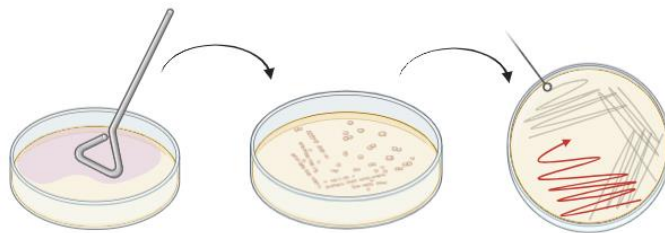
*Diluciones seriadas 1:10*



Una vez pasadas las 48 horas, se observaron las colonias crecidas, las que poseían mayor actividad, se resembraron en AGAR TSA+2% de NaCl, utilizando la técnica de siembra por agotamiento con asa de platino para ser aisladas. Se seleccionaron las colonias aisladas mediante pruebas de confirmación microbiológicas estándares y pruebas bioquímicas tales como: Tinción de Gram, presencia de oxidasa, utilización de aminoácidos (arginina, ornitina y lisina), la utilización de carbohidratos (sacarosa, glucosa y manosa), el uso de citrato como fuente de carbono y la formación de diacetilo (Voges-Proskauer), la producción de indol y capacidad de termo tolerancia, usando el usando el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3 (Garrity et al., 2009).

**Figura 8**

*Siembra por agotamiento en placas TSA +2% de NaCl*



Las colonias aisladas que crecieron fueron resuspendidas en medio de congelación adecuado (TSB-Glicerol 15%) y colocados en microtubos de 1,5 ml estériles. Finalmente, los microtubos fueron etiquetados, codificados y conservados en cajas de congelación para luego ser mantenidas a -80 °C como criopreservante.

### **Figura 9**

*Criopreservante (LB + 2% NaCl + Glicerol 15%) de cepas aisladas de Bacillus*



### **8.3. Capacidad antagónica de Bacillus contra Vibrio**

#### **8.3.1. Condiciones de medio de cultivo de las cepas de *Bacillus* y *Vibrio***

La(s) cepa bacteriana que mostraron mejores cualidades para crecer en condiciones de NaCl y con mayor capacidad de termo-tolerancia fueron viabilizadas en cultivos de TSA+2% e incubadas por 24 horas a 30 °C, fueron crecidas en caldo de TSB con 2% NaCl de forma similar las cuatro cepas de referencia de *Vibrio* patógenos

y viabilizadas en el medio de cultivo anteriormente mencionado y ajustado a una concentración de  $2 \times 10^8$  CFUmL<sup>-1</sup> correspondiente a lecturas de densidad óptica (O.D<sub>600</sub>) de 0,6 a 0,8. La bioactividad contra *Vibrio* de las cepas de *Bacillus* fueron evaluada contra cuatro especies de *Vibrio* patógenos en camarón blanco: *V. parahemolyticus* (BA), *V. harveyi*, *V. campbellii* (LM); y *V. vulnificus*.

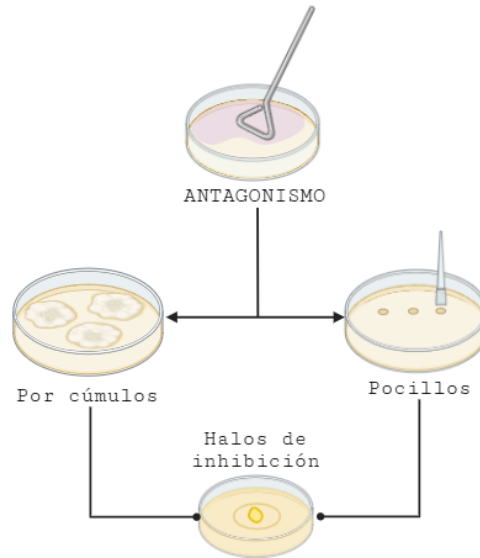
### **8.3.2. Actividad anti-Vibrio**

La evaluación se llevó a cabo mediante dos metodologías, el método de cúmulos citado en (Arcentales & Peña Mosquera, 2023), y a través de cibrado rápido en difusión de agar pocillo, según Al Atya et al. (2015).

Para el método de antagonismo por cúmulos se realizó una previa siembra de la cepa aislada, del cultivo fresco se extrajo un pequeño cúmulo del biofilm formado por cada cepa probiótica a través de un ligero raspado en la superficie de la placa con ayuda de un asa estéril (Figura 10). Una vez formado el cúmulo se procedió a colocar cinco cepas aisladas en diferentes puntos de las placas que fueron previamente inoculadas con la cepa patógena mediante un hisopo estéril.

**Figura 10**

*Pruebas de antagonismo por Cúmulos y Pocillos en Agar TSA+2%NaCl*

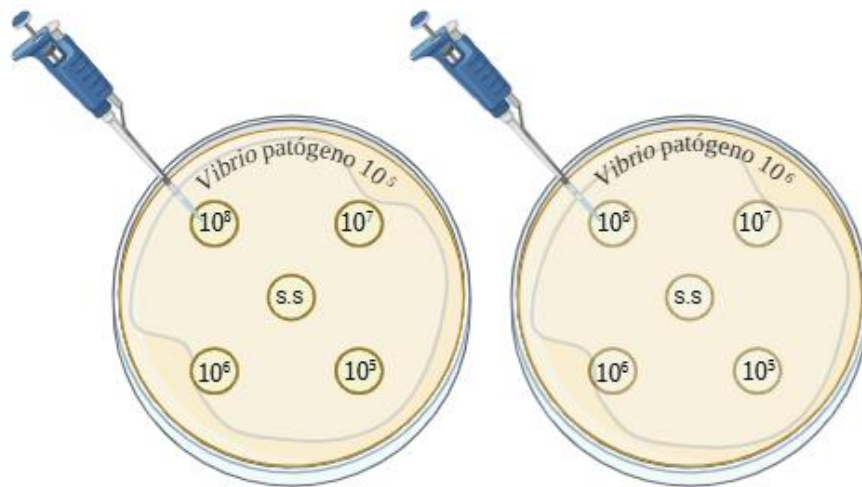


Las cepas de *Bacillus* que se inocularon e incubaron, serán expuestas a una eliminación de células por centrifugación ( $8000\times g$ ) durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes que pasarán a través de filtros de jeringa estériles para obtener CFS (Sobrenadante libre de células).

Para la prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) se sembraron doscientos (200)  $\mu\text{L}$  de cada suspensión bacteriana por extensión en placas, y se perforaron pocillos de 6 mm de diámetro en las placas de agar preparadas con una varilla de vidrio hueca estéril, se añadieron cincuenta (50)  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de *Bacillus* a los pocillos. Cada ensayo se realizó por triplicado y posterior a ello fueron incubadas durante 48 h y 72 h a 28°C. Después de la incubación, se evaluó la actividad antibacteriana midiendo las zonas de inhibición alrededor del pocillo.

**Figura 11**

*Antagonismo por el método difusión en agar pocillos*



Se determinó el efecto a través de la aparición de una zona de inhibición del crecimiento alrededor de la mancha. Sólo las zonas de inhibición  $>3$  mm se consideraron reacciones positivas, según lo recomendado por Zidour et al. (2017) citado por (Domínguez-Borbor , y otros, 2019).

### **8.3.3. Efecto protector de cepa de *Bacillus* contra *Vibrio* patógeno en larvas de *P. vannamei***

Para determinar la inocuidad de las cepas seleccionadas de *Bacillus* potenciales probióticas se realizó la prueba de toxicidad mediante la exposición directa a larvas de *P. vannamei* (Post larva 6) se evaluó realizando pruebas *in vivo*, provenientes de LABMARCORSA S.A. Las muestras fueron distribuidas aleatoriamente en envases de vidrio con 1 L de agua de mar filtrada y esterilizada con UV, a una densidad de 50 PL/L.

Las muestras se sometieron a diferentes tratamientos: cada una de la(s) cepas probióticas seleccionada fueron aplicadas de forma individual, para cada tratamiento se realizaron 3 réplicas, así mismo se colocaron cuatro envases para tratamiento control, es decir, sin aplicación de cepas aisladas. La aplicación se realizó diariamente por inmersión directa, a una concentración  $10^5$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, durante siete días consecutivos con recambio diario de agua del 50 %. Las postlarvas fueron alimentadas al 2% de la biomasa con balanceado (28% de proteína), manteniéndose a temperaturas óptimas entre 25 y 31°C.

#### 8.4. Prueba in vivo

Después de cinco días, las PL fueron desafiadas con *Vibrio parahaemolyticus* ajustado por densidad óptica (O.D<sub>620</sub>) con un espectrofotómetro de microplacas, utilizando una curva de calibración previamente establecida hasta alcanzar una concentración de  $2,3 \times 10^5$  UFC/mL de agua de mar. El recambio de agua (50%) se realizó veincuatro horas post-exposición (hpe) y la mortalidad de las larvas de camarón se cuantificó 12 horas después.

Para preparar el inóculo bacteriano, se sembró en agar tripticasa de soya (2% NaCl TSA), y ocho colonias se transfirieron a 1000 mL de TSB +2% NaCl y se incubaron durante siete horas a 30 °C, con movimiento constante. Posteriormente, el cultivo se centrifugará (4000 g, 10 min, 25 °C), se descartarán los sobrenadantes y los pellets celulares se resuspenderán en solución salina estéril (2%NaCl).

**Tabla 2**

Diseño experimental prueba de desafío.

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción del Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>	<b>Réplicas</b>
<b>Grupo Control (CT)</b>	Sin aplicación de cepa aislada y sin infección de patógeno.	0	2

<b>Control</b>	Sin aplicación de cepas aisladas pero	2,3x10 <sup>5</sup>	2
<b>Infectado (CP)</b>	infectadas con Vibrio patógeno.	UFC/mL	
<b>T1 (7)</b>	Inmersión directa de la cepa 6.9 de la Zona 3 e infectadas.	10 <sup>7</sup> UFC/mL	3
<b>T1 (5)</b>	Inmersión directa de la cepa 6.9 de la Zona 3 infectada con Vibrio.	10 <sup>5</sup> UFC/mL	3
<b>T2 (7)</b>	Inmersión directa de la cepa 6.1 de la Zona 3 e infectadas.	10 <sup>7</sup> UFC/mL	3
<b>T2 (5)</b>	Inmersión directa de la cepa 6.1 de la Zona 3 e infectadas.	10 <sup>5</sup> UFC/mL	3
<b>T3 (7)</b>	Inmersión directa de la cepa 1.4 de la Zona 1 e infectadas.	10 <sup>7</sup> UFC/mL	3
<b>T3 (5)</b>	Inmersión directa de la cepa 1.4 de la Zona 1 e infectadas.	10 <sup>5</sup> UFC/mL	3

### 8.5. Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el software R Studio versión 2025.05.0+496, para determinar la diferencia de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas de los halos de inhibición entre patógenos se aplicó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Kruskal-Wallis. La supervivencia y mortalidad de los ensayos *in vivo*, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba post hoc Dunnett, en comparación con el grupo Control.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Aislamientos de bacterias y selección de *Bacillus* spp.

Las cepas bacterianas con actividad antimicrobiana frente a otras colonias en el medio de cultivo en la primera fase de siembra por superficie fueron halladas, seleccionadas y caracterizadas mediante diferentes morfotipos, tendiendo así: 14 aislados en la Zona 1 (Monteverde), 13 en la Zona 2 (Ballenita), y 11 aislados en la Zona 3 (La Diablica), consiguiendo un total de 38 cepas aisladas con diferencias morfológicas entre sí. Tabla 2

**Tabla 3***Morfología colonial de bacterias*

		<b>Coloración</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Borde</b>	<b>Forma</b>	<b>Transparencia</b>	<b>Superficie</b>	<b>Textura</b>	<b>Elevación</b>
<b>Zona 1</b>	C1.1ZT3	Blanca	G	Ondulado	Irregular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Elevada
	C1.2NT10	Beige	M	Rizoide	Irregular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Crateriforme
	C1.3ZT3	Beige	M	Entero	Circular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Crateriforme
	C1.4ZT3	Beige	G	Rizoide	Irregular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Elevada
	C1.5LT10	Beige	P	Rizado	Irregular	Opaca	Brillo	Rugosa	Elevada
	C1.6MT3	Beige	P	Ondulado	Irregular	Opaca	Brillo	Lisa	Plana
	C1.7LT3	Beige	M	Entero	Circular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Elevada
	C1.8MT10	Beige	P	Entero	Circular	Opaca	Brillo	Lisa	Elevada
	C1.9MT10	Beige	G	Ondulado	Irregular	Transparente	Brillo	Lisa	Elevada
	C1.10LT10	Blanco	M	Entero	Circular	Transparente	Brillo	Lisa	Elevada
	C1.11NT10	Beige	G	Rizoide	Rizoide	Opaca	Sin brillo	Lisa	Plana
	C1.12MT10	Beige	P	Rizado	Irregular	Transparente	Brillo	Lisa	Convexa
C1.15LT3	Beige	G	Lobulado	Circular	Opaca	Brillo	Lisa	Plana	
<b>Zona 2</b>	C1AT4	Blanca	G	Lobulado	Irregular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Plana
	C2ZT4	Beige	M	Filamentosa	Filamentoso	Transparente	Sin brillo	Rugosa	Crateriforme
	C3ZT2	Blanca	M	Entero	Circular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Elevada

	C5ZT4	Beige	M	Filamentosa	Filamentoso	Transparente	Brillo	Lisa	Plana
	C6AT4	Blanca	G	Filamentoso	Filamentosa	Transparente	Sin brillo	Lisa	Plana
	C8ZT2	Blanca	P	Filamentoso	Circular	Opaca	Brillo	Lisa	Convexa
	C9AT2	Beige	M	Entero	Circular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Plana
	C10AT4	Blanca	P	Filamentosa	Circular	Transparente	Sin brillo	Rugosa	Plana
	C11ZT4	Blanca	M	Lobulado	Irregular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Plana
	C12MT2	Blanca	P	Rizoide	Rizoide	Transparente	Brillo	Lisa	Plana
	C13MT4	Blanca	P	Entero	Circular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Crateriforme
	C14LT2	Beige	P	Entero	Irregular	Opaca	Brillo	Lisa	Convexa
	C16LT2	Blanca	G	Rizado	Irregular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Plana
	C17LT4	Blanca	M	Rizoide	Irregular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Plana
<b>Zona 3</b>	C6.1ZT6	Blanco	G	Ondulado	Irregular	Opaca	Brillo	Rugosa	Elevada
	C6.2ZT6	Beige	G	Rizoide	Irregular	Opaca	Sin brillo	Lisa	Plana
	C6.3ZT2	Blanco	G	Ondulado	Irregular	Opaca	Sin brillo	Rugosa	Crateriforme
	C6.4ZT2	Blanca	M	Rizoide	Rizoide	Opaca	Brillo	Rugosa	Plana
	C6.6MT6	Beige	G	Lobulado	Irregular	Opaca	Brillo	Lisa	Elevada
	C6.7MT2	Blanco	M	Rizado	Irregular	Opaca	Brillo	Lisa	Plana
	C6.9MT2	Blanca	G	Rizoide	Rizoide	Opaca	Brillo	Lisa	Elevada
	C6.10LT2	Beige	M	Entero	Circular	Opaca	Sin brillo	Rugoso	Crateriforme
	C6.11LT6	Blanca	M	Entero	Circular	Opaca	Brillo	Lisa	Plana
	C6.12LT6	Blanco	P	Entero	Circular	Opaca	Brillo	Rugoso	Plana
	C6.13LT2	Beige	M	Rizoide	Rizoide	Opaca	Brillo	Lisa	Elevada

## 9.2. Actividad Anti-Vibrio

Los resultados de los ensayos de la actividad antibacteriana *in vitro* realizados con las cepas anteriormente aisladas de la Zona 1 (Monteverde), permitieron evidenciar su potencial frente a patógenos de género *Vibrio*: *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. campbelli* (LM), *V. parahaemolyticus* (BA).

Cinco (C1.2, C1.4, C1.6, C1.8 y C1.11) de las 12 cepas evaluadas presentaron actividad antagónica positiva, dando como resultado halos de inhibición (mm) o expansión (E), que indican el crecimiento sobre la colonia patógena, mientras los 7 restantes tuvieron resultados nulos de actividad, destacando la cepa 1.4 con halos > 5mm, mientras la cepa 1.6 tuvo crecimiento de hasta 8mm sobre las bacterias patógenas. *Tabla 4*

**Tabla 3**

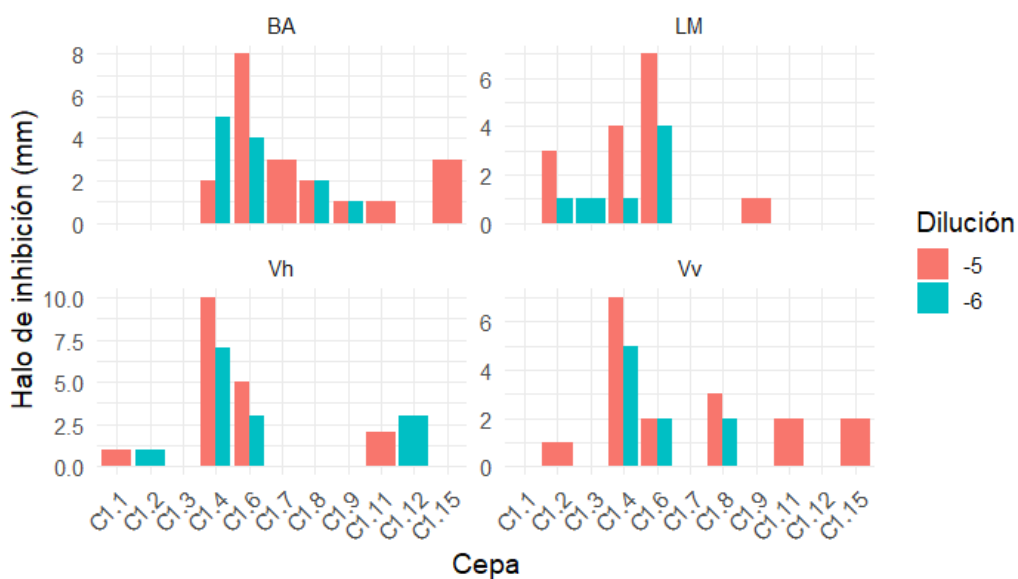
*Actividad Anti-Vibrio de las cepas aisladas de la Zona 1, halos de inhibición expresados en mm.*

Cepas Zona 1	V.v		V.h		L.M		B. A	
	-5	-6	-5	-6	-5	-6	-5	-6
C1.1	-	-	1	-	-	-	-	-
C1.2	1	-	2	1	3	1	-	-
C1.3	-	-	-	-	-	1	-	-
C1.4	7	5	10	7	4	-	2	5
C1.5	-	-	-	-	-	-	-	-
C1.6	E (2)	E (2)	E (5)	E (3)	E (7)	E (4)	E (8)	4
C1.7	-	-	-	-	-	-	E (3)	-
C1.8	E (3)	E (2)	3	2	-	-	2	2
C1.9	-	-	-	-	1	-	E (1)	E (1)
C1.10	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>C1.11</b>	E (2)	-	E (2)	-	-	-	E (1)	-
<b>C1.12</b>	-	-	-	E (3)	-	-	-	-
<b>C1.15</b>	E (2)	-	-	-	-	-	E (3)	-

**Figura 12**

*Promedio de halos de inhibición en la Zona 1*



En la zona 2, se verificó la existencia de al menos cepas nativas antagónicas contra las patógenas de las cuales 5 (C1; C3; C6; C8; C13) tuvieron actividad antibacteriana positiva, demostrando mayores crecimientos sobre el *Vibrio* patógeno y los halos de inhibición promedio, la C1 con halos promedio de 2.3 mm, y el restante solo demostró crecimiento sobre el *Vibrio*.

**Tabla 4**

*Cepas aisladas de la Zona 2 resultados de prueba de antagonismo*

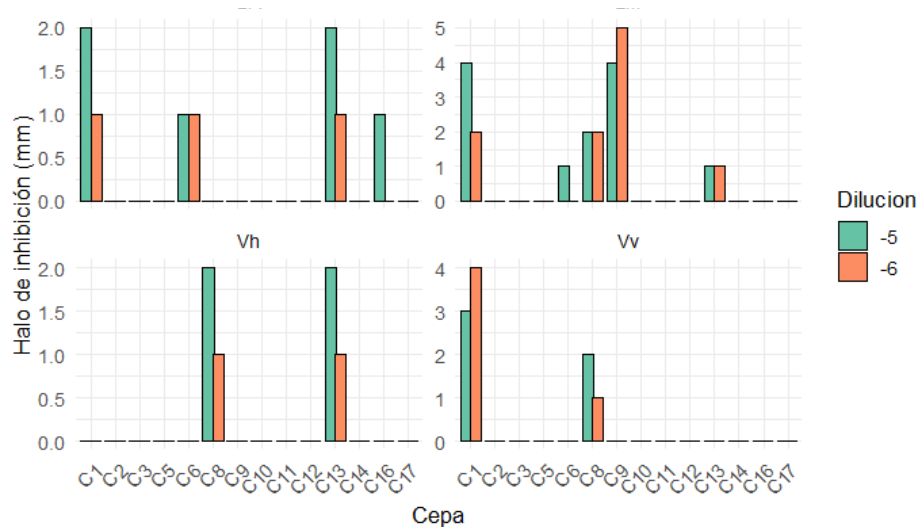
Cepas Zona 2	V.v		V.h		L.M		B. A	
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	-5	-6	-5	-6	-5	-6
<b>C1</b>	E (3)	E (4)	-	-	E (4)	E (2)	2	1
<b>C2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>C3</b>	-	-	-	-	E	E (1)	-	-
<b>C5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C6</b>	E	E	-	-	E	E	E	E
<b>C8</b>	E	E	E	E	E (2)	E (2)	-	-
<b>C9</b>	-	-	-	-	E (4)	5	-	-
<b>C10</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C11</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C12</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C13</b>	-	-	E	E	E	E	E	E
<b>C14</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C16</b>	-	-	-	-	-	-	C	C
<b>C17</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

Los gráficos de barras muestran la actividad antimicrobiana de distintas cepas de la Zona 2. Se observa que algunas cepas presentan más halos de inhibición en la menor concentración del agente patógeno ( $10^5$ ), las cepas C6, C13 Y C14 muestran halos más amplios en las cuatro bacterias mostrando mayor efectividad antimicrobiana mientras que la cepa C12 tiene una notable actividad en ambas concentraciones para LM.

**Figura 13**

*Promedio de halos de inhibición en mm de la Zona 2*



Para la zona 3, los resultados de los posibles *Bacillus* aislados frente a V.v; V.h; B.A y LM, se observaron variaciones importantes en la formación de halos de inhibición, diez de las bacterias aisladas registraron halos desde 2mm hasta 7 mm, otras bacterias se destacaron por expansión. Se observa que las cepas 6.10 y 6.13 poseen mayor crecimiento sobre el patógeno V.V; V.h y LM, respectivamente. Sin embargo, los *Bacillus* con mayor capacidad antimicrobiana son los codificados como 6.1 y 6.9 mostrando actividad inhibitoria para todos los patógenos expuestos, con halos desde 2 a 7mm.

**Tabla 5**

*Actividad antagónica de cepas seleccionadas de la Zona 3 expresado en mm*

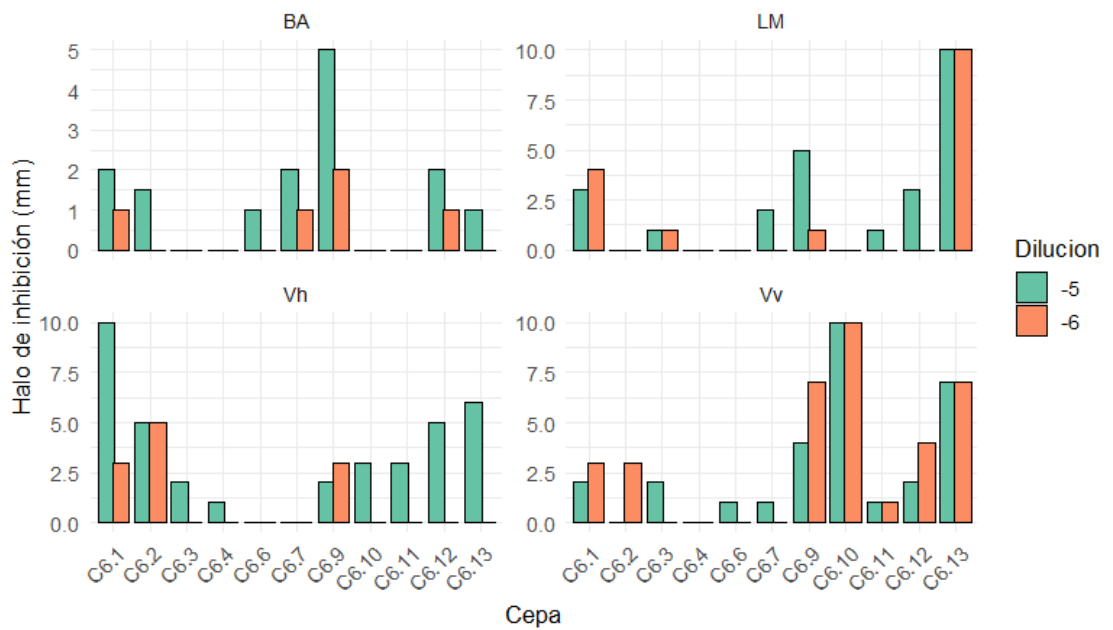
Cepa Zona 3	V.v		V.h		L.M		B.A	
	-5	-6	-5	-6	-5	-6	-5	-6
<b>C6.1</b>	2	3	E (10)	3	3	4	2	1
<b>C6.2</b>	E	E (3)	E (5)	E (5)	-	-	E (1,5)	-
<b>C6.3</b>	2	-	E (2)	-	1	C (1)	-	-
<b>C6.4</b>	-	-	1	-	-	-	-	-
<b>C6.6</b>	1	-	E	E	E	E	1	-
<b>C6.7</b>	1	-	-	-	E (2)	E	E (2)	E (1)
<b>C6.9</b>	4	E (7)	2	3	5	2	5	2
<b>C6.10</b>	E (10)	E (10)	3	-	-	-	-	-
<b>C6.11</b>	1	1	3	-	1	-	-	-
<b>C6.12</b>	2	4	5	-	3	E	2	1
<b>C6.13</b>	7	7	6	-	E (10)	E	E (1)	-

Los gráficos de barra muestran las cepas 6.9, 6,13 y 6.1 también mostraron actividad significativa, con halos de hasta 5 mm frente a LM, BA Y Vh. La presencia de crecimiento por encima del *Vibrio* indica con la presencia de compuestos antimicrobianos activos, estos resultados permiten identificar cepas de

bacterias prometedoras. Por otro lado, C 6.4 y C 6.6 presentaron escasa o nula inhibición especialmente frente V.v y L.M. Figura 14.

**Figura 14**

*Graficas de barras para Antagonismo de la Zona 3*

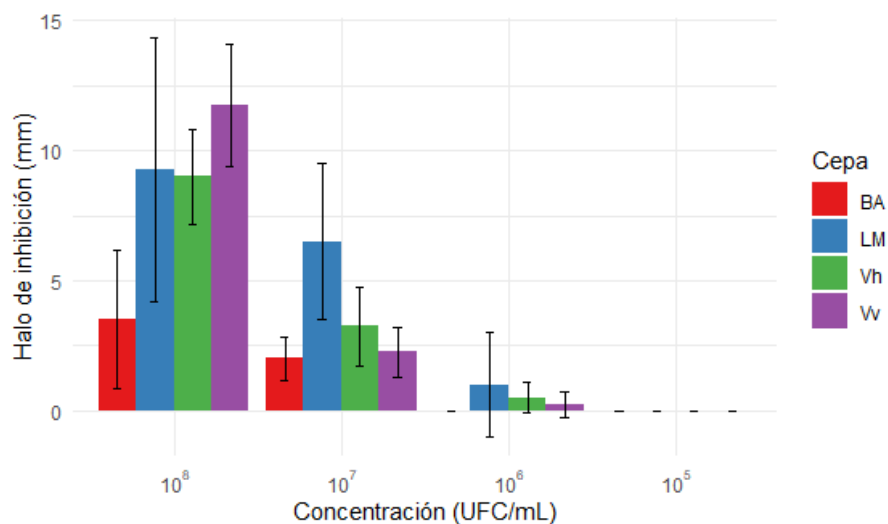


### 9.3. Concentración mínima inhibitoria (MIC)

Una vez elegida las cepas más activas se seleccionaron cuatro a las que se expresaron mejores resultados, entre los que se seleccionaron a C 6.1; 6.9; y 1.4. Los resultados obtenidos para C6.1 demostraron mayor actividad en *V. campbelli* ( $13 \pm 4.24$ ) en la concentración más alta ( $10^8$ ), sin embargo, se obtuvieron valores con menor actividad contra *V. parahaemolyticus* ( $10 \pm 0.816$ ).

**Figura 15**

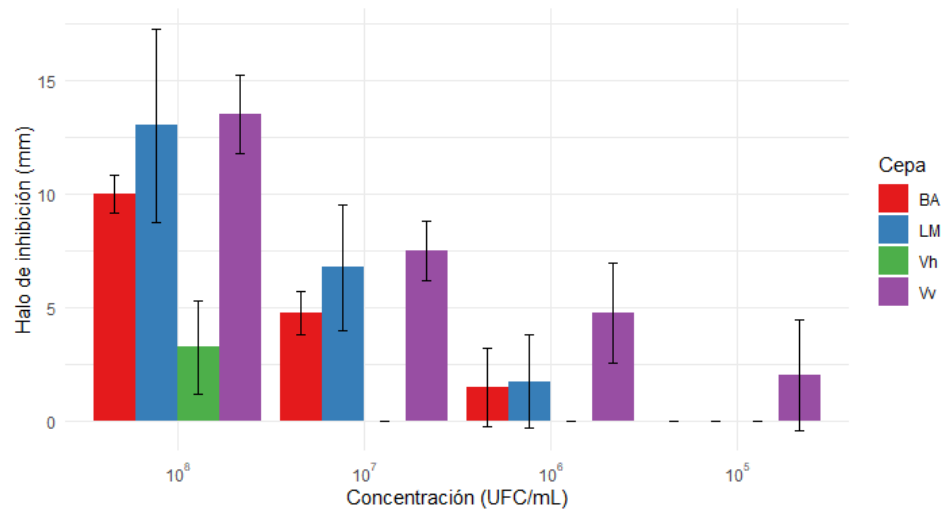
*Capacidad antagonica por pocillos C6.1*



Así mismo, la evaluación de la cepa 6.9 permite evidenciar que tan efectiva para inhibir el crecimiento de cada patógeno, demostrando halos de hasta 13 mm para V.v, Las cepas LM y V.v mostraron los mayores halos de inhibición en la concentración más alta (10<sup>8</sup> UFC/mL), superando los 13 mm en promedio, mientras que la reacción fue menor en V.h.

**Figura 16**

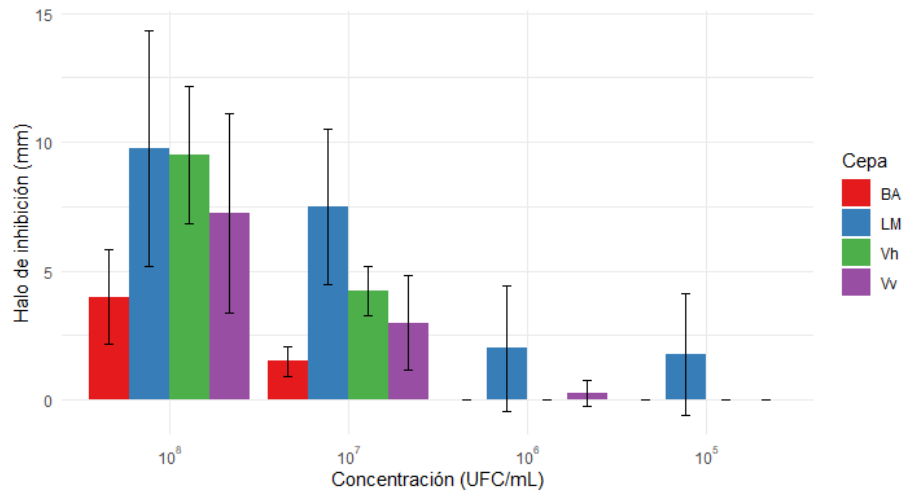
*Capacidad antagonista por pocillos C6.9*



En este caso, la cepa 1.4 mantuvo una actividad significativa para el patógeno LM tanto a  $10^8$  como  $10^7$  UFC/mL (10 mm y 8 mm, respectivamente), destacándose sobre las otras, también mostró actividad importante a para V.h en concentraciones de  $10^8$  (9 mm), mientras que para BA y V.v presentaron halos más reducidos (4 mm). A concentraciones menores ( $10^6$  y  $10^5$ ), nuevamente solo para LM mostró una inhibición persistente, aunque leve (2-3 mm), lo que evidencia su poca eficacia relativa en condiciones de baja densidad celular.

**Figura 17**

*Capacidad antagonica por pocillos C 1.4*



Finalmente, las pruebas de efecto anti- *Vibrio* permitieron seleccionar tres cepas con potencial probiótico frente a los patógenos y así ponerlos a prueba en un sistema de cultivo larvario, comprobando su efectividad in vivo enfrentadas a un *Vibrio* patógeno seleccionado.

#### **9.4. Análisis bioquímicos**

Los resultados de los análisis bioquímicos realizado a las cepas bacterianas clasificadas como potenciales probióticos tienen características específicas, utilizando la fermentación de carbohidratos, utilización de aminoácidos, la capacidad de respiración aerobio o anaerobia, producción de metabolitos secundarios como indol o cetona (VP), siendo estos aspectos relevantes para la selección de cepas funcionales en sistemas larvarios.

La cepa 6.1 fue evaluada y mostró una capacidad metabólica moderada, fermentando sacarosa y celobiosa, metabolizando aminoácidos como lisina, arginina ornitina relacionado estrechamente con la tolerancia a estrés ambiental o funciones inmunoestimulantes. Su crecimiento se dio en condiciones anaeróbicas, lo que sugiere que podría adaptarse bien al intestino larval, fue positiva para la producción de indol, lo que podría indicar la síntesis de compuestos bioactivos. Aunque su versatilidad es limitada, podría tener funciones complementarias en ambientes con bajo oxígeno.

Así mismo, la cepa 6.9 fue la más versátil en comparación a las dos restantes por lo que fermentó múltiples azúcares (arabinosa, galactosa, manitol, gluconato, entre otros) y creció tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que la

hace altamente adaptable. Esta capacidad le permite competir eficientemente en ambientes variables, como el agua de cultivo y el sistema digestivo de las larvas.

En contraste, la cepa 1.4 tuvo un perfil más limitado, es decir, no fermentó azúcares, pero metabolizó los tres aminoácidos evaluados y creció en condiciones anaeróbicas. Su rol podría enfocarse en funciones específicas como estabilidad intestinal o soporte inmunológico, más que en competencia nutricional. Su crecimiento en medio nutritivo sugiere facilidad de producción, aunque su aplicación sería más restringida.

**Tabla 6**

*Lectura de pruebas bioquímicas a Cepas seleccionadas*

	CEPA		
	6.1	6.9	1.4
<b>Arabinosa</b>	-	+	-
<b>Sacarosa</b>	+	+	-
<b>Galactosa</b>	-	+	-
<b>Manitol</b>	-	+	-
<b>Sacarosa Madre</b>	-	-	-
<b>Gluconato</b>	-	+	-
<b>Gluconato</b>	-	+	-
<b>Lisina</b>	+	+	+
<b>Arginina</b>	+	+	+
<b>Ornitina</b>	+	-	+
<b>OF Aerobio</b>	-	+	-
<b>OF Anaerobio</b>	+	+	+
<b>Citrato</b>	-	-	+
<b>Indol</b>	+	-	-
<b>VP</b>	-	-	-

<b>Celebiosa</b>	+	+	-
<b>Nutrient Broth</b>	+	+	+

Cepa 6.9: *Bacillus subtilis* o *B. amyloliquefaciens*, dada su capacidad fermentativa (azúcares), uso de gluconato, crecimiento aeróbico y anaeróbico. Cepa 6.1 podría asociarse a un *Bacillus* menos fermentador, posiblemente una cepa con metabolismo oxidativo reducido, como algunas cepas atípicas de *B. licheniformis*. Cepa 1.4, al ser negativa en la mayoría de los azúcares y pruebas metabólicas, podría tratarse de una especie menos común o requerir confirmación por técnicas moleculares.

### 9.5. Toxicidad de cepas

Durante el ensayo de 7 días suministrando los posibles *Bacillus* mediante la alimentación, la evaluación de toxicidad a través de la supervivencia diaria demostró que el grupo Control ( $90 \pm 2.0$  %) superó la tasa de supervivencia en comparación de los demás tratamientos.

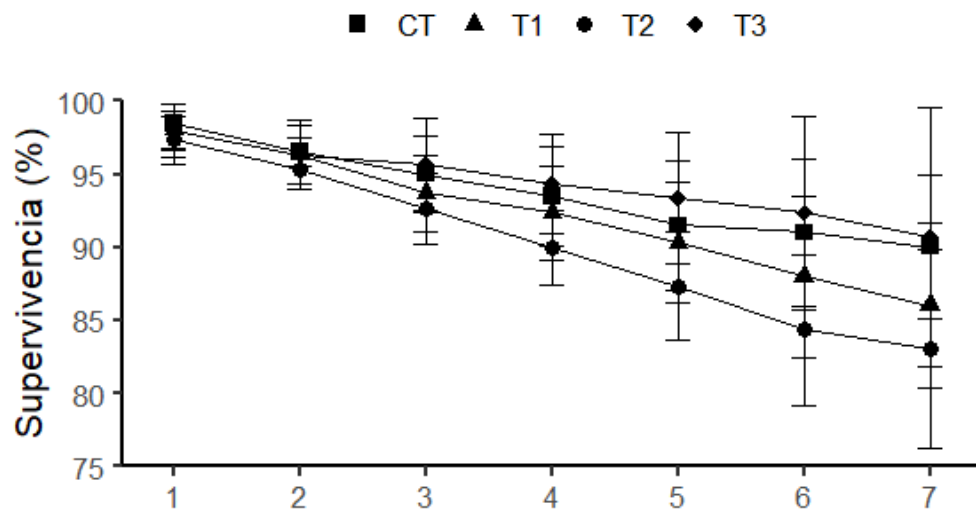
La gráfica muestra una tendencia general en la disminución de supervivencia a lo largo del tiempo, sin embargo, el Tratamiento 2 ( $84.1 \pm 3.5$  %) tuvo la menor tasa de supervivencia durante el período determinado, es decir, ninguna de las cepas expuestas presenta rangos  $< 80\%$ , lo que determina la nula toxicidad cuando son suministradas en un medio de cultivo.

**Tabla 7** Tasa de supervivencia en el diseño experimental

Grupo	Supervivencia (%)
CT	90 ± 2.0
T1	86.4 ± 2.9
T2	84.1 ± 3.5
T3	89.3 ± 4.2

**Figura 18**

*Supervivencia de presumibles Bacillus*



El análisis de varianza (ANOVA) realizado para evaluar los diferentes tratamientos sobre el porcentaje de supervivencia no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $0,17 > 0,05$ ). Posterior a ellos se aplicó la prueba de comparaciones múltiples por el método de Dunnett para contrastar cada tratamiento con el grupo control.

**Tabla 8**

*Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza*

<b>Tratamiento p_value normal</b>		
	p-value	Normalidad
<b>CT</b>	0,726	Sí
<b>T1_5</b>	0,637	Sí
<b>T1_7</b>	0,637	Sí
<b>T2_5</b>	0,637	Sí
<b>T2_7</b>	0,637	Sí
<b>T3_5</b>	1	Sí
<b>T3_7</b>	0,298	Sí

Así mismo, el análisis de Dunnet indicó que ninguno de los tratamientos difirió significativamente del control a lo largo de los 7 días ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, el tratamiento 2 mostró una menor supervivencia con un p-valor ( $p = 0,0953$ ), lo que podría sugerir un efecto relevante pero no de significancia estadística bajo las condiciones del presente experimento. Tabla 10.

**Tabla 9**

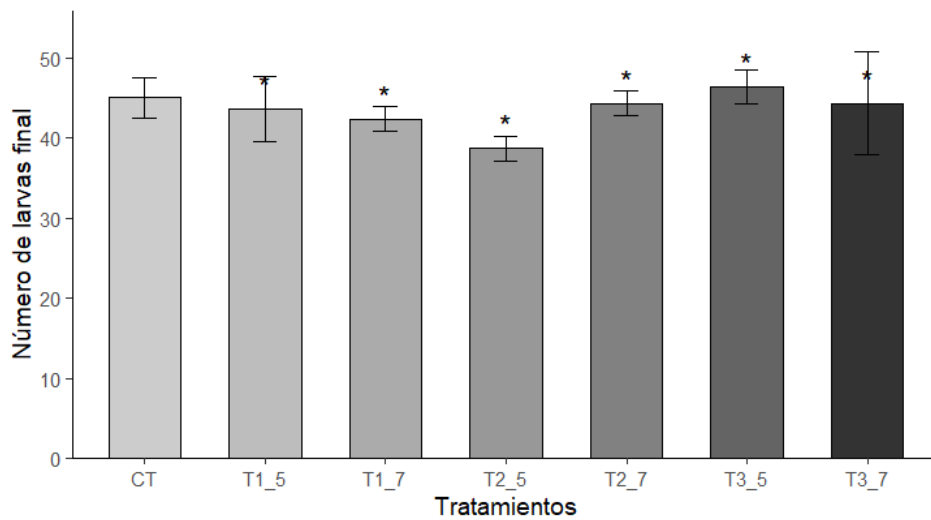
*Prueba de comparación múltiple Dunnett*

	<b>Estimado</b>	<b>Error</b>	<b>t valor</b>	<b>p-ajustado</b>
<b>T1_5_C == 0</b>	-2.667	4.926	-0.541	0.9880
<b>T1_5_T == 0</b>	-5.333	4.926	-1.083	0.7904
<b>T2_5_C == 0</b>	-5.333	4.926	-1.083	0.7904
<b>T2_5_T == 0</b>	-9.000	4.926	-1.827	0.0953
<b>T3_5_C == 0</b>	-1.333	4.926	-0.271	0.9997

<b>T3_5_T == 0</b>	-1.333	4.926	-0.271	0.9997
--------------------	--------	-------	--------	--------

**Figura 19**

*Número de larvas finales por tratamiento*



*Nota: “\*”no presentan significancia con relación al Grupo control CT*

### 9.6. Prueba de desafío in vivo

El análisis de varianza (ANOVA) evaluó las diferencias en la mortalidad de larvas expuestas a *V. parahaemolyticus* entre los tratamientos, demostrando que existen diferencias significativas ( $F(7,56) = 30.38, p < 0.001$ ). La prueba de comparación múltiple por el método de Tukey indicó que el grupo CP (Control Positivo) presentó un porcentaje de mortalidad significativamente mayor ( $53.8 \pm 14.4\%$ ; letra a) en comparación con los demás tratamientos que

presentaron rangos desde  $6.2 \pm 3.2$  (CT) hasta  $20.5 \pm 14.4$  (T2\_10<sup>7</sup>), lo que indica una disminución notable en la mortalidad de los organismos infectados.

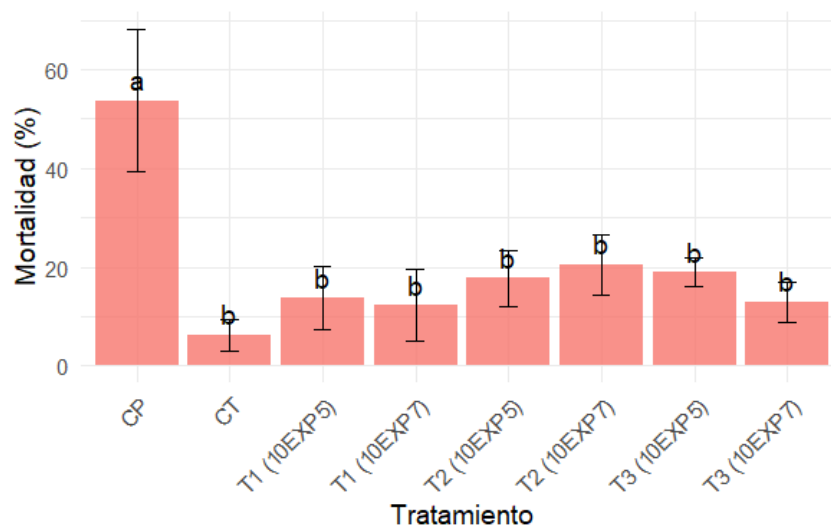
**Tabla 10**

*Análisis Tukey de tratamientos*

Tratamiento	Media_SD	Grupo
CP	$53.8 \pm 14.4$	a
T2 (10EXP7)	$20.5 \pm 6.0$	b
T3 (10EXP5)	$19.0 \pm 2.9$	b
T2 (10EXP5)	$17.8 \pm 5.6$	b
T1 (10EXP5)	$13.8 \pm 6.4$	b
T3 (10EXP7)	$13.0 \pm 4.1$	b
T1 (10EXP7)	$12.2 \pm 7.3$	b
CT	$6.2 \pm 3.2$	b

**Figura 20**

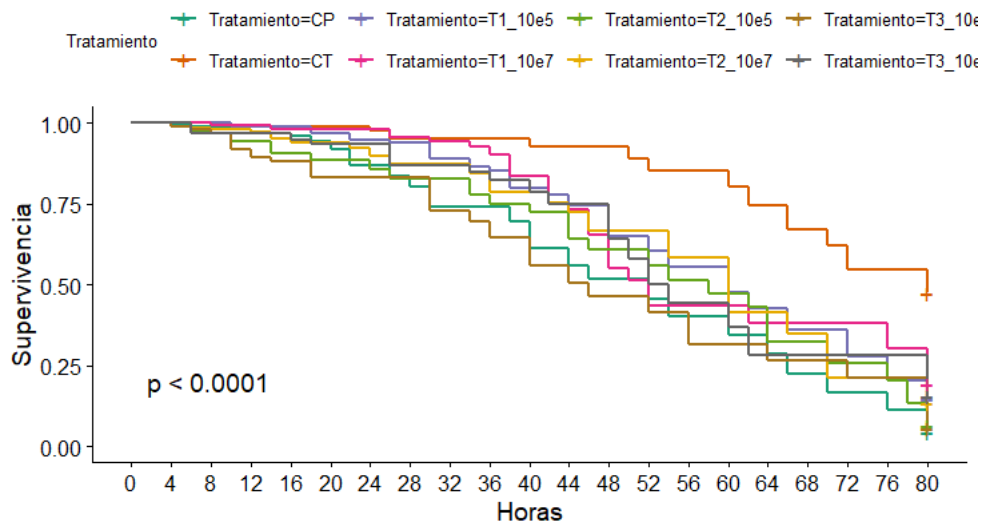
*Porcentaje de mortalidad promedio por Tratamiento*



El análisis de supervivencia mostró altas diferencias entre los tratamientos mediante Log-rank test,  $p < 0.0001$ , la curva correspondiente al Control Positivo (CP), que presentó una disminución más acelerada de la supervivencia en función al tiempo. Sin embargo, el grupo control mantuvo los valores más altos de supervivencia durante el tiempo del experimento, entre los que se puede mencionar ( $T1 \times 10^7$ ) presentaron patrones de alta supervivencia.

**Figura 21**

*Survival Analysis por tratamiento*



La supervivencia general para el ensayo de toxicidad fue alta generalmente (> 84%). Aunque el tratamiento T2 mostró una leve disminución en la supervivencia (84.1 %), el análisis estadístico (ANOVA y prueba de Dunnett) no encontró diferencias significativas respecto al grupo control ( $p > 0.05$ ), indicando baja toxicidad de las cepas. Posterior los resultados de evaluación protectora *in vivo*, revelaron que los tratamientos con bacterias benéficas redujeron significativamente la mortalidad en comparación con el grupo control positivo (CP: 53.8 % mortalidad). Los tratamientos T1, T2 y T3 mostraron mortalidades entre 12.2 % y 20.5 %, indicando efecto protector. El análisis de supervivencia confirmó estas diferencias con alta significancia estadística ( $p < 0.0001$ ).

## 10. DISCUSIÓN

El presente estudio se centró en el aislamiento y la evaluación cepas probióticas de *Bacillus* spp., obtenidas de cultivos de camarón blanco (*P. vannamei*) con potencial antagónico en *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. campbelli*, *V. parahaemolyticus*, las cuales fueron aisladas en medio de cultivo de agar TSA y analizadas de secuencias del gen 16S rARN concordando con del (Rodicio Rodicio & Mendoza, 2004) quienes utilizaron esta técnica en la identificación de bacterias. Sin embargo, la capacidad inhibitoria de las cepas se registró de forma diferente entre las zonas de muestreo.

Los aislados que se encontraron de forma nativa en los cultivos de larvas de *Penaeus vannamei* fue de 38 cepas aisladas lo que coincide con (Proespraiwon et al., 2023), que logró aislar 22 cepas aisladas del HP de camarón blanco del Pacífico, sobrevivientes a AHPND, de los cuales 10 fueron identificados como *Bacillus* spp. y caracterizados mediante pruebas bioquímicas

Al igual que, (Moreira Suarez y Méndez, 2024) donde logró aislar bacterias nativas extraídas del intestino de camarón *P. vannamei*, encontrando 4 especies de bacterias gran positivas correspondientes a *Bacillus*, entre las que se puede mencionar *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* halladas en los organismos tomado de 3 zonas de recolección.

En relación con lo reportado por (Peng, Zhang, & Song, 2019), donde la cepa G de *Bacillus licheniformis*, mostró halos de inhibición de hasta 20 mm contra *Vibrio parahaemolyticus*, aunque los halos de inhibición reportados en el presente trabajo son menores existen relaciones de hasta 15 mm promedio, demostrando la inhibición válida para el potencial antagonista de la cepa utilizada. Así mismo, para la evaluación de la toxicidad según el estudio de (Mirbaksh, Mahjoub, Afsharnasab, & Kakoolaki, 2021) demostrando que las etapas de desarrollo larvario y la tasa de supervivencia mejoraron significativamente después de la aplicación de *B. subtilis* a una concentración de  $10^8$  UFC/ml, con respecto a lo analizado, también se demostró una supervivencia elevada y sin diferencias significativas con respecto al grupo Control.

Según los halos de inhibición presentados en las diferentes cepas patógenas, se observa que estas poseen un diámetro promedio entre 4 a 15 mm en la dilución correspondiente a  $10^{-5}$ , lo que coincide con Potosí Castillo (2024) que en su trabajo probó que, los halos de inhibición presentados fueron de mayor dimensión al ser sometidos una menor dilución de probiótico, de la misma manera Peng et al., (2019) indican que la cepa de *Bacillus licheniformis* aislada en su estudio, presentó halos de inhibición con dimensiones de hasta 20 mm contra la especie *Vibrio parahaemolyticus*.

De la misma manera, en este estudio, se realizó un análisis de supervivencia donde se corroboró que al adicionar probióticos a los cultivos, este índice desciende su rapidez de manera paulatina, ya que en el tratamiento control la mortalidad presentó niveles significativamente acelerados en relación con los tratamientos inoculados con probióticos, concordando con los reportes presentados por Chai et al. (2016), quienes aseveran que la adición de probióticos mayormente compuestos por *Bacillus* aumentan la resistencia en contra de patógenos causados por *Vibrio*; además, Mirbakhsh et al., (2021), señalan que los organismos a los cuales se les aplica *Bacillus subtilis* en altas concentraciones presentaron mejoras morfológicas y un aumento en la tasa de supervivencia.

Como resultado de la mortalidad y supervivencia de la prueba *in vivo*, expuesta a *V. parahaemolyticus* mejoró significativamente en  $T2 \times 10^7$  y  $T1 \times 10^7$  con un porcentaje de supervivencia de hasta el 43% más que el grupo infectado, tal como resalta (Hoang Duc, Trung Nam, Hoang Oanh, Trung Thanh, & Hoang Ha, 2021) la suplementación con la cepa del Género *Bacillus*, tras siete días de exposición, mostró tasas de supervivencia del 71% en comparación con el 33% del tratamiento.

Para finalizar, tomando en cuenta estos resultados y las investigaciones realizadas previamente, resulta necesario profundizar e incrementar estudios en el

ámbito microbiológico en relación con la identificación de cepas patogénicas y no patogénicas presentes en cultivos de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) con la finalidad de incrementar la información y probar nuevas alternativas en contra de virus altamente perjudiciales para la industria acuícola del país.

## 11. CONCLUSIÓN

EL aislamiento de las cepas bacterianas nativas de larvas sanas dio como resultado 38 cepas de tinción Gram- positivas los tres sitios de producción de cultivo larvario con morfologías coloniales de tres zonas geográficas, cada cepa caracterizada según su color, forma, textura y otras características.

La evaluación de la capacidad para inhibir el crecimiento de cuatro especies patógenas in vivo del género *Vibrio* el número de cepas con capacidad antimicrobiana con halos mayores a 6 mm hasta 13mm correspondiente a cada *Vibrio* desafiado, siendo escogidas para la prueba de desafío solo 3 posibles *Bacillus* representativos seleccionados.

Las cepas expuestas al *Vibrio* patógeno en la prueba *in vivo* mediante los tratamientos mostraron niveles superiores de supervivencia con respecto al control positivo, pero siendo estadísticamente similares entre sí. Los tratamientos T1 y T3 superaron la supervivencia en comparación y mayor eficacia protectora de los *Bacillus* utilizados mejorando hasta un 40% la supervivencia.

## 12. RECOMENDACIONES

1. La correcta identificación molecular es la clave para garantizar la seguridad y eficacia de las cepas con potencial probiótico y el reconocimiento de la especie que se está trabajando, por ello se recomienda realizar una identificación completa del genoma.
2. Realizar estudios de *Bacillus* con capacidad para colonizar el sistema digestivo del hospedero y efectividad en su aplicación, determinando su permanencia en el medio del cultivo y el animal cultivado, mediante pruebas microbiológicas.
3. Evaluar los compuestos antagonistas, bacteriocinas, productos enzimáticos o metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Latif, H., Yilmaz, E., Dawood, M., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture Volume 551*.
- Abdollahi-Arpanahi, D., Soltani, E., Jafaryan, H., Soltani, M., Naderi-Samani, M., & Campa, A. (2018). RETRACTED: Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Volume 496*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.082>
- Aldana Calderón, Y., Arenal, A., & Naderkhani, G. (2023). Efectos de *Bacillus* sp. como bacterias biofloculantes en el cultivo del camarón. *Revista de Producción Animal*, 35(3), 93-107. Obtenido de Recuperado en 15 de abril de 2025, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-79202023000300093&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202023000300093&lng=es&tlng=es).
- Amenyogbe, E., Luo, J., Fu, W.-j., Delwin, E., Wang, Z., Huang, J., . . . Chen, G. (2022). Efectos de la mezcla de cepas autóctonas sobre la microbiota intestinal y el perfil metabólico en cobia ( *Rachycentron canadum* ). *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-022-19663-x.
- Amiin, M. K., Lahay, A. F., Putriani, R. B., Reza, M., Putri, S. M., Sumon, M. A., . . . Browijoyo, M. (2023). The role of probiotics in vannamei shrimp

aquaculture performance – A review. *Vet World*, 638-649.  
doi:10.14202/vetworld.2023.638-649

Arcentales, K., & Peña Mosquera, E. (2023). *parahaemolyticus.*, *Efectividad de bacterias aisladas de cultivos de camarón Penaeus vannamei mediante pruebas in vitro con Vibrio*. Guayaquil.

Barrantes, E. (2023). *Effects of the pathogenic bacterium Vibrio parahaemolyticus on farmed shrimp (Litopenaeus vannamei) and on consumer health*.  
doi:10.15517/ PA.V23140.55171

Bermúdez, J. F., Nieves-Soto, M., Flores, F., & López, D. J. (2022). Supervivencia, desarrollo y crecimiento de larvas de *Penaeus vannamei* alimentadas con dietas tradicionales y no-tradicionales. *Rev.MVZ Cordoba vol.28 no.1 Córdoba*. doi:<https://doi.org/10.21897/rmvz.2682>

Garrity, G., Vos, P., Jones, D., & Kreig, N. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3. The Firmicutes. In P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K.-H. Schleifer, & W. Whitman (Eds.), *Systematic Bacteriology* (Vol. 3). Springer New York.  
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>.

Cámara Nacional de Acuicultura. (2025). Camarón – Reporte de Exportaciones Ecuatorianas Totales. Obtenido de <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>

Coronel, J., & Sorroza, L. (2019). Uso de fármacos utilizados para tratamiento profiláctico y terapéutico de la vibriosis en el cultivo de Camarón Blanco.

*AGRIS - International System for Agricultural Science and Technology.*

Obtenido de <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/ec/>

Delgado-Díaz, L., Paz, N., Molina, N., & Navarrete, A. (2020). Incorporación de bacterias ácido lácticas nativas como probióticos en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) en la camaronera Las Ánimas, El Salvador. *Revista Minerva, ISSN-e 2521-8794, Vol. 3, N° 1, 2020, págs. 81-97.*

Domínguez-Borbor, C., Ardiles, V., Bermeo, M., Bolívar-Alvarado, C., Tomalá, C., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. A. (2019). The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans*, is effective to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture. *Aquaculture Volume 508.*  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.077>

FAO. (2002). Residuos de antibióticos en productos de acuicultura. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura.*

FAO. (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action.* doi:<https://doi.org/10.4060/cd0683en>

Fennuci, J., & Mallo, J. (2004). Feeding of protozoae al stages of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate with different microencapsulated food and microalgae species. *Revista de biología marina y oceanografía.*  
doi:[10.4067/S0718-19572004000100002](https://doi.org/10.4067/S0718-19572004000100002)

- Flegel, T. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology, Volume 110*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Garnica, F. (2016). Rediseño del sistema térmico para la producción de nauplios de camarón. *Trabajo final para la obtención del título: Ing. Mecánico Espol. fimcp, Guayaquil*. Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/36934>
- Golnari, M., Bahrami, N., Milanian, Z., Rabbani, M., Ali, M., Shafiei, R., & Safa-Ali, S. (17 de January de 2024). Isolation and characterization of novel *Bacillus* strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. *Scientific Reports volume 14, Article number: 1457*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-024-51823-z>
- Gómez, B., Roque, A., & Guerra, A. (2008). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos .
- González, J. (2018). Efecto probiótico de HLBAC en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Greeshma, J., Bini, D., Seená, J., & Rejish, K. (2021). *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International, 29(1), 323–353*. doi:[10.1007/S10499-020-00630-0](https://doi.org/10.1007/S10499-020-00630-0)
- Hoang Duc, L., Trung Nam, N., Hoang Oanh, D., Trung Thanh, T., & Hoang Ha, C. (2021). Isolation and evaluation the effect of *Bacillus subtilis* bld01

strain on the survival rates and gut microbiota of *penaeus vannamei* after challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Vietnam Journal of Biotechnology* 20(3): 505-516.

Hossein Khanjani, M., Torfi Mozanzadeh, M., Gisbert, E., & Hossein Hoseinifar, S. (2024). Probiotics, prebiotics, and synbiotics in shrimp aquaculture: Their effects on growth performance, immune responses, and gut microbiome. *Aquaculture Reports*, Volume 38. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102362>

Kewcharoen, W., & Srisapoome, P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & Shellfish Immunology Volumen 94*, 175-189. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.013>

Kewcharoen, W., & Srisapoome, P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & Shellfish Immunology Volume 94*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.013>

Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2020). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. doi:<https://doi.org/10.1111/raq.12477>

- Li, H., Tian, X., & Dong, S. (2019). Growth performance, non-specific immunity, intestinal histology and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* fed on a diet supplemented with live cells of *Clostridium butyricum*. *Aquaculture*.
- Lisa, A., & Foysal, J. (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.005>
- Manjarrez, J. A. (20 de Abril de 2023). Transformación azul de los sistemas alimentarios acuáticos. *Comisión de Agricultura, Ganadería y Pesca del Parlatino*. Perú. Obtenido de <https://parlatino.org/wp-content/uploads/2017/09/transformacion-alimentos-acuaticos.pdf>
- Moreira Suarez, D. F., & Méndez Martínez, Y. (2024). *Caracterización de bacterias nativas con potencial probiótico en el cultivo de camarón (Litopenaeus vannamei) en Guayas, Ecuador*. Quevedo: Uteq. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/7208>
- Rodicio Rodicio, M. R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, ISSN 0213-005X, Vol. 22, No. 4, 2004, Págs. 238-245, 22(4), 238–245. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3056351>

- Milián, G., Rondón, A., Pérez, M., Samaniego, L., Riaño, J., Bocourt, R., . . . Laurencio, M. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 48, Número 4*.
- Mirbaksh, M., Mahjoub, M., Afsharnasab, M., & Kakoolaki, S. (2021). Effects of *Bacillus subtilis* on the water quality, stress tolerance, digestive enzymes, growth performance, immune gene expression, and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the early hatchery period. *Aquaculture International*. doi:10.1007/S10499-021-00758-7
- Moreira Suarez, D., & Méndez, Y. (2024). Caracterización de bacterias nativas con potencial probiótico en el cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Guayas, Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Dir. Av. Quito km 1½ vía a Santo Domingo de los Tsáchilas, Quevedo, Ecuador. [www.uteq.edu.ec](http://www.uteq.edu.ec).
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Nutrition Volume 63*.
- Ouwehand, A., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279–289 (2002). doi:<https://doi.org/10.1023/A:1020620607611>
- Párraga-Santos, D. (2018). *Selección y evaluación de cepas bacterianas probióticas tipo Bacillus con actividad antagónica sobre cepas bacterianas patógenas*

*aisladas en Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Obtenido de Repositorio CENAIM ESPOL

Peng, M., Zhang, Y., & Song, Z. (2019). Isolation and Characterization of a *Bacillus* spp. Against. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*. doi:10.11648/j.ijmb.20190402.11

Pérez-Chabela, M., Álvarez, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. (4 de Abril de 2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. Obtenido de <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/perez>

Piedrahita, Y. (2018). La industria de cultivo de camarón en Ecuador. *Responsible seafood Advocate*.

Proespraiwong, P., Mavichak, R., Imaizumi, K., Hirono, I., & Unajak, S. (2023). Evaluación de *Bacillus* spp. como probióticos potentes con reducción de la mortalidad relacionada con AHPND y facilitación del crecimiento en granjas de camarón blanco del Pacífico ( *Litopenaeus vannamei* ). *Microorganismos* 2023 , 11 (9), 2176. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms11092176>

Proespraiwong, P., Mavichak, R., Imaizumi, K., Hirono, I., & Unajak, S. (2023). Evaluation of *Bacillus* spp. as Potent Probiotics with Reduction in AHPND-Related Mortality and Facilitating Growth Performance of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Farms. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms11092176

- Ramírez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizúete, K., Sonnenholzner, S., . . . Rodríguez, J. (2022). The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus sensu stricto* (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Volume 549*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826>
- Saavedra, K., Peralta, T., Ordinola, A., Sandoval, J., Vieyra, E., Zapata, M., & Hidalgo, A. (2018). Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. *Rev. investig. vet. Perú vol.29 no.1 Lima ene./mar. 2018*. doi:ISSN 1609-9117.
- SAGARPA. (2013). *Carta Nacional Acuicola 2013*. Obtenido de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_nlinks&pid=S0188-8897202000010009300076&lng=en](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0188-8897202000010009300076&lng=en)
- Sarango Vivanco, E. (2021). Identificación de microorganismos patógenos que afectan en el estado larval de camarón blanco (*litopenaeus vannamei*).
- Shan, X., Li, K., Stadler, P., Borbor, M., Reyes, G., Solórzano, R., . . . Cordero, O. X. (2025). Microbiome determinants of productivity in aquaculture of whiteleg shrimp. *Food Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.02420-24>

- Shinn, A., Pratoomyot, J., Griddiths, D., & Quoc, T. (2018). Asian Shrimp Production and the Economic Costs of Disease. *Asian Fisheries Science* 31/S. doi:10.33997/j.afs.2018.31.S1.003
- Sorroza, L., Padilla , D., Acosta, F., Acosta , B., & Real , F. (2019). Uso de probióticos en Acuicultura. Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Unidad de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología. Trasmontaña s/n. 35416. Arucas .
- Sotomayor, M., Reyes, J., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). *Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic Vibrio outbreaks in Ecuadorian Penaeus (Litopenaeus) vannamei hatcheries.* doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478
- Subuntith, N., Weerasith, K., Jumlong, S., Traimat, B., & Verapong, V. (2020). Improvement of growth performance, water quality a. *Aquaculture Nutrition Volume 26.* doi:10.1111/anu.13028
- Vega, J. (2019). *Principales medidas profilácticas y terapéuticas utilizadas para la prevención de enfermedades en cultivos de camarón blanco litopenaeus vannamei.* Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/14670>
- Vera, C. Z. (2023). “aislamiento y caracterización de bacterias responsables de enfermedades en el camarón Penaeus vannamei, determinando su

caracterización bioquímica y su respuesta a la susceptibilidad a diferentes productos comerciales.”.

Villamil Diaz, L., & Marrtínez-Silva, M. (2009). Probiotics as a biotechnological tool in shrimp culture: a review. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*. doi:ISSN 0122-9761

Villareal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra , F., & Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev. mex. fitopatol vol.36 no.1 Texcoco*. doi:<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

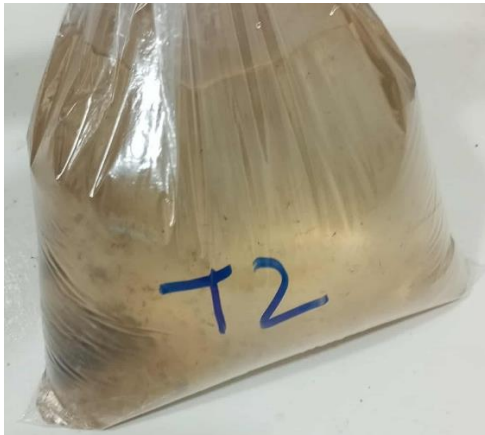
Ziaei-Nejad, S., Habibi Rezaei, M., Azari Takami, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A.-R., & Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>.

## 14. ANEXOS

### - Aislamiento

**Figura 22**

*Muestra de larvas*



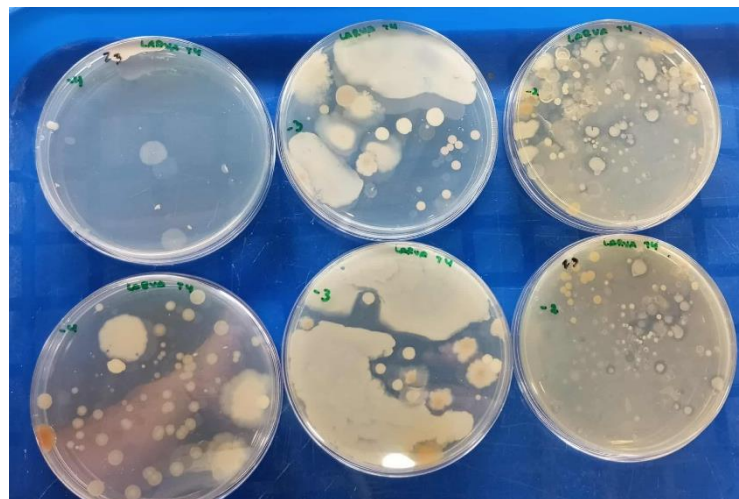
**Figura 23**

*Macerado para posterior siembra*



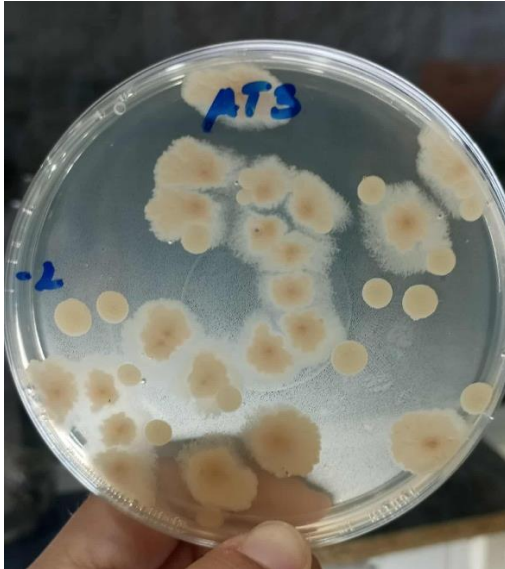
**Figura 24**

*Siembras de varias diluciones agar TSA +2% NaCl*



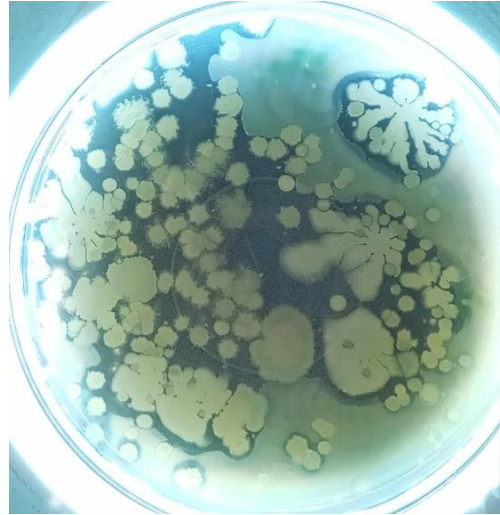
**Figura 25**

*Cepas candidatas a aislamiento*



**Figura 27**

*Siembra por superficie, bacterias con actividad antimicrobiana*



**Figura 26**

*Aislamiento por agotamiento con Asa de Platino*



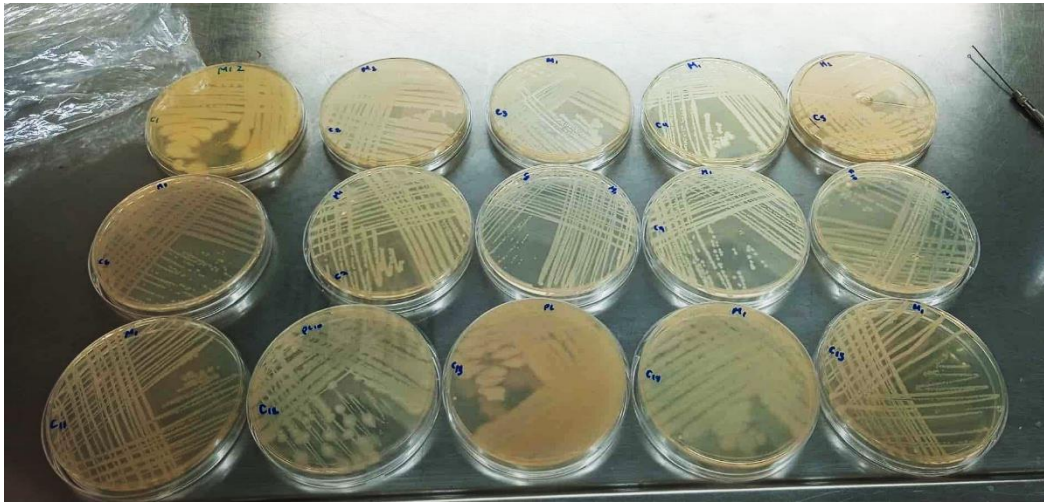
**Figura 28**

*Siembra por agotamiento de Cepa 1*



**Figura 29**

*Siembra por agotamiento, aislamiento y purificación.*



**Figura 30**

*Cepas con criopreservante TSA + Glicerol 15%*



- **Prueba *in vitro***

**Figura 31**

*ICepa de Vibrio patógeno (Vibrio harveyi)*



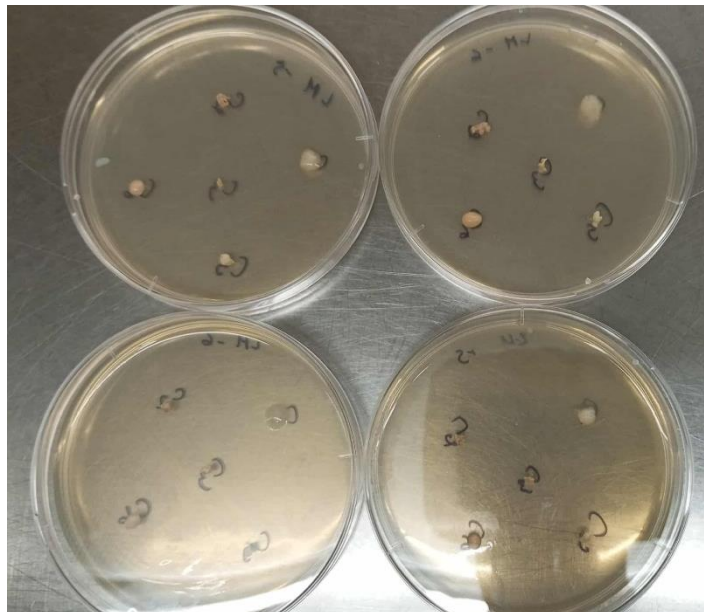
**Figura 32**

*Estándar de McFarland*



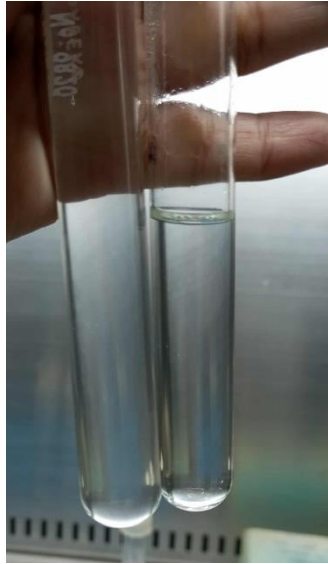
**Figura 33**

*Prueba de Antagonismo por cúmulos*



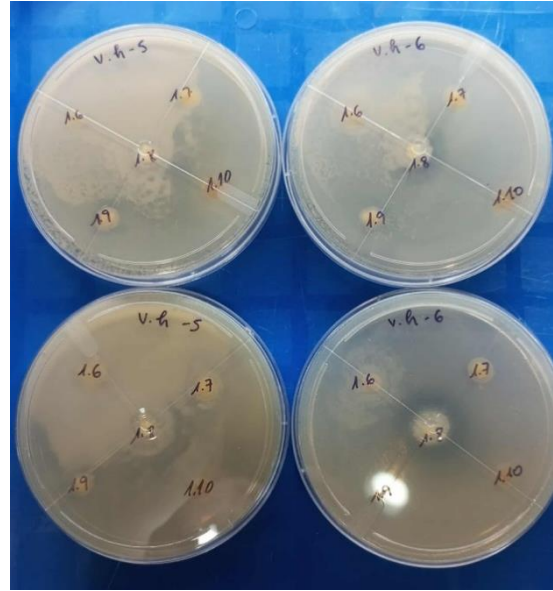
**Figura 34**

*Ajuste de bacterias probióticas y patógenas a estándar de McFarland*



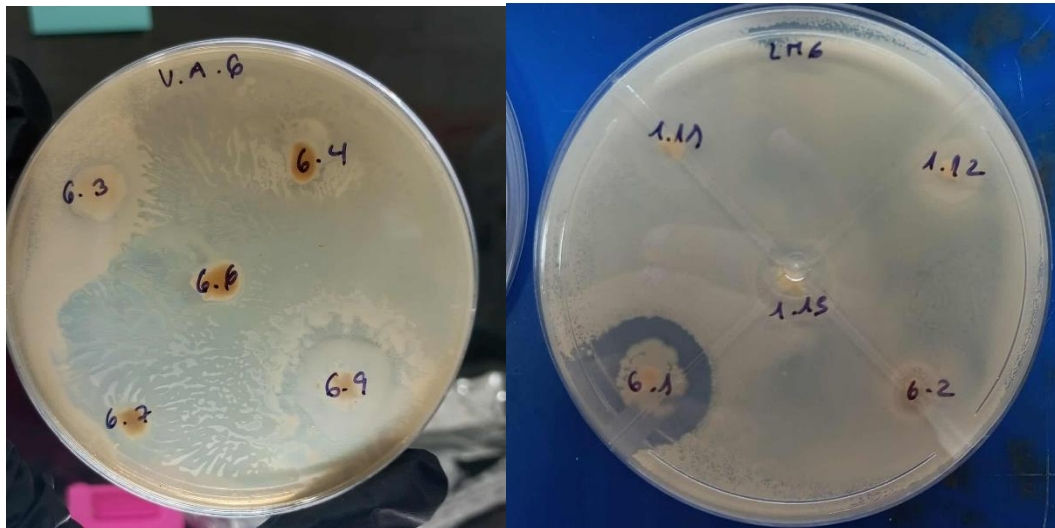
**Figura 36**

*Resultados de antagonismo por cúmulos*



**Figura 35**

*Halos de inhibición de cepa 6.1 y 6.9*



**Figura 38**

*Crecimiento de bacteria en TSA  
Broth*



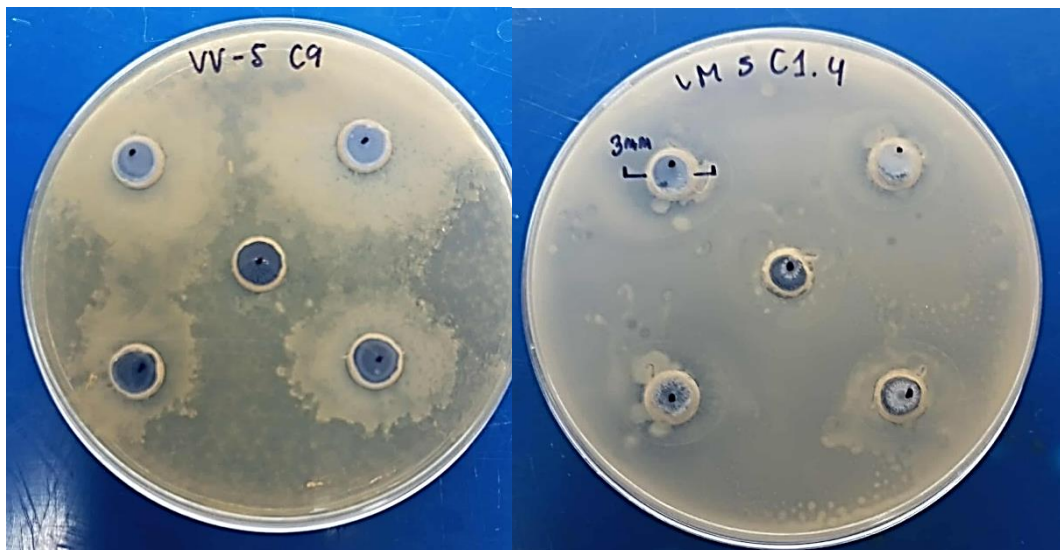
**Figura 39**

*Prueba de antagonismo método  
pocillos*



**Figura 37**

*Respuesta inhibitoria de cepas 6.9*



- Prueba *in vivo*

**Figura 40**

*Post larvas sanas*



**Figura 41**

*Separación para diseño experimentales*



**Figura 42**

*Alimentación previa con bacterias probióticas*



**Figura 43**

*Aislado de bacterias probióticas*

