

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

“Valoración profiláctica de mezcla de bacterias probióticas y su aplicación en la larvicultura de *Litopenaeus vannamei* en laboratorio Marcor 1 ubicado en Pacoa – Ecuador”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

Suárez Medina Stefany Andrea

DOCENTE TUTOR:

Acui. Sonnya Mendoza Lombana, Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

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

“Valoración profiláctica de mezcla de bacterias probióticas y su aplicación en la larvicultura de *Litopenaeus vannamei* en laboratorio Marcor 1 ubicado en Pacoa – Ecuador”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

Suárez Medina Stefany Andrea

DOCENTE TUTOR:

Acui. Sonnya Mendoza Lombana, Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “Valoración profiláctica de mezcla de bacterias probióticas y su aplicación en la larvicultura de *Litopenaeus vannamei* en laboratorio Marcor 1 ubicado en Pacoa – Ecuador”, elaborado por Suárez Medina Stefany Andrea, 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/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



Firmado electrónicamente por:
**SONNYA PATRICIA
MENDOZA LOMBANA**

Acui. Sonnya Mendoza Lombana, Ph.D.

DOCENTE TUTOR

C.I. 0912802816

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “Valoración profiláctica de mezcla de bacterias probióticas y su aplicación en la larvicultura de *Litopenaeus vannamei* en laboratorio Marcor 1 ubicado en Pacoa – Ecuador”, elaborado por Suárez Medina Stefany Andrea, 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



Acui. José Melena Cevallos Ph. D.

DOCENTE DE ÁREA

C.I. 0913432613

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios por mantenerme con salud y permitirme alcanzar cada una de mis metas.

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, en especial a mis padres, Marvel Medina y Miguel Suárez, su confianza en mí me ha impulsado a alcanzar mis objetivos, y su apoyo incondicional ha sido mi mayor fortaleza. Gracias por acompañarme en cada paso del largo camino que he recorrido durante mi vida universitaria y por ser fuente de mi inspiración.

A mis queridas tías, su apoyo con palabras motivadoras, muestras de afecto y platillos deliciosos siempre esperándome en casa de mi abuelita, luego de una larga semana hicieron más llevaderos aquellos días difíciles y cansados.

A mis compañeros, en especial a Nathaly y Erick, su amistad ha sido fundamental en este logro académico, liberando el peso del estrés con tiempo de calidad junto a ustedes, estoy profundamente agradecida por ello. Sin olvidar a mis dos mascotas, Michigan y Nina, quienes estuvieron conmigo en las noches en vela, brindándome su fiel compañía.

El poder finalizar este proyecto ha sido gracias a todos ustedes, siendo parte esencial en diferentes partes de mi día a día.

Con todo mi amor y gratitud, Stefany Andrea Suárez Medina.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia a Dios, por mantenerme con salud y vida para lograr mis propósitos.

En segundo lugar, doy gracias a la cooperación infinita por parte de mi familia al ser mi pilar en todo momento, ayudándome en lo económico y también en lo emocional, para poder alcanzar mi propósito de ser una profesional en biología.

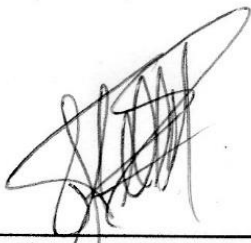
A la empresa LABMARCORSA S.A, que me abrió las puertas de sus instalaciones y me apoyo en el desarrollo de mis actividades, a los biólogos de los laboratorios que siempre se mostraron muy amables conmigo, supervisando cada una de las acciones realizadas; Así también, al laboratorio de análisis DULODER S.A. por la colaboración dentro del presente proyecto.

Finalmente, agradezco a todos los docentes de la universidad, quienes aportaron sus conocimientos y experiencias durante cuatro años para mi formación académica, en particular a la acuicultora Sonnya Mendoza, quien fue mi tutora en el presente proyecto, puesto que, con sus ideas científicas y profesionales me orientó en todo momento. Así también, a la Universidad por acogerme en la facultad de Ciencias del Mar, inculcando una educación de calidad en el transcurso de la carrera.

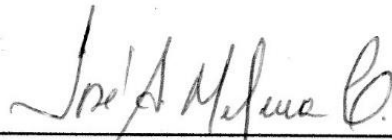
TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Stefany Andrea Suárez Medina** como requisito parcial para la obtención del grado de Bióloga de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: Lunes 18 de diciembre de 2023



Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

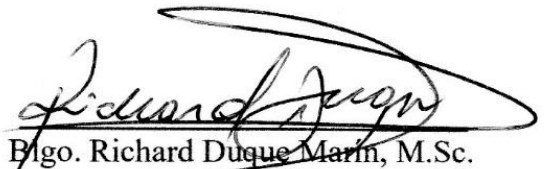


Ac. José Melena Cevallos, Ph.D.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
SONNYA PATRICIA
MENDOZA LOMBANA

Acui. Sonnya Mendoza Lombana Ph.D.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Bigo. Richard Duque Marín, M.Sc.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Pascual Roca Silvestre Mgr.
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

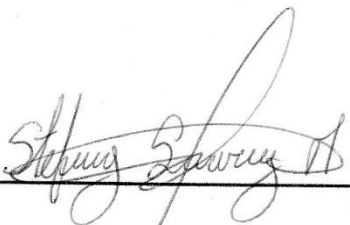
DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, STEFANY ANDREA SUÁREZ MEDINA

Declaro que:

El presente trabajo de Integración Curricular denominado “Valoración profiláctica de mezcla de bacterias probióticas y su aplicación en la larvicultura de *Litopenaeus vannamei* en laboratorio Marcor 1 ubicado en Pacoa – Ecuador”, ha sido desarrollado respetando y cumpliendo el acuerdo firmado para acceder a sus instalaciones y laboratorios; Así también, cumpliendo los reglamentos del laboratorio de análisis DULODER S.A.

La responsabilidad de esta investigación exhibida en el presente documento me confiere a mí; y el patrimonio intelectual de la misma que le corresponde a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Stefany Andrea Suárez Medina

ÍNDICE

RESUMEN	15
GLOSARIO	19
ABREVIATURAS	22
CAPITULO I	25
1. INTRODUCCIÓN	25
2. PROBLEMÁTICA	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. HIPÓTESIS	30
CAPÍTULO II	31
6. MARCO TEÓRICO	31
6.1. La larvicultura del camarón blanco	31
6.2. Enfermedades en la larvicultura	32
6.2.1. Enfermedades bacterianas	32
6.2.2. Síndrome de bolitas	33
6.2.3. Síndrome de Zoea	33
6.2.4. Síndrome de mortalidad temprana (EMS o AHPND)	34
6.2.5. Hepatopáncreas necrotizante (NHP)	35
6.3. Cultivos con altas cargas bacterianas	36
6.3.1. Profilaxis ante la presencia de enfermedades bacterianas	37
6.4. Principales actores de riesgo en la larvicultura	38
6.4.1. Medidas de bioseguridad y desinfección en los sistemas larvarios	39
6.4.2. Desinfección del agua	39
6.4.3. Desinfección de superficies	40
6.4.4. Empleo de productos preventivos de las enfermedades bacterianas	41
6.5. Ácidos orgánicos	41
6.5.1. Ácidos orgánicos utilizados	42
6.5.2. Actividad de los ácidos orgánicos en el medio acuícola	43
6.6. Aceites esenciales	43
6.6.1. Actividad de los aceites esenciales en el medio acuícola	44

6.7. Antibióticos	44
6.7.1. Resistencia bacteriana	45
6.8. El uso de probióticos	45
6.8.1. Mecanismos de acción de los probióticos	46
6.9. Principales géneros probióticos	51
6.9.1. <i>Lactobacillus</i>	51
6.9.2. <i>Bacillus</i>	52
6.9.3. <i>Bifidobacterim</i>	53
6.9.4. <i>Streptomyces</i>	53
6.9.5. <i>Nitrosococcus</i>	54
6.9.6. <i>Pediococcus</i>	55
6.10. Cinética de crecimiento bacteriano.	56
6.10.1. Mecanismos de comunicación bacteriana.	57
6.11. Métodos para la detección de vibrios	58
6.12. Técnica tradicional de cultivo en microbiología	59
6.12.1. Medios de cultivo sólidos	59
6.12.2. Morfología de las colonias	61
6.13. Fisiología digestiva de larvas de camarón.	62
6.13.1. Procesos implicados en la colonización bacteriana.	63
6.13.2. Microbiota intestinal de camarones.	64
6.14. Influencia del tratamiento probiótico en composición del agua de cultivo.	64
6.15. Supervivencia y sanidad larval.	65
6.16. Protocolo de manejo	65
7. METODOLOGÍA	67
7.1. Tipo de estudio	67
7.2. Área de estudio	67
7.3. Preparación del producto de acuerdo al protocolo de la empresa.	68
7.4. Cinética bacteriana en diferentes lotes de cultivo.	70
7.4.1. Cultivos discontinuos o por lotes	71
7.5. Análisis microbiológico	71
7.6. Análisis microscópico	71
7.7. Densidad óptica	72
7.8. Mezcla probiótica	72

7.9.	Desafío <i>in vitro</i> con patógenos	72
7.10.	Aplicación en tanques de producción	73
7.11.	Detección de patógenos	75
7.12.	Probiosis en base a la supervivencia	76
CAPITULO IV		78
8.	RESULTADOS	78
8.1.	Determinación de la cinética bacteriana	78
8.1.1.	Densidad óptica	78
8.1.2.	Siembras microbiológicas.....	79
8.1.3.	Revisiones microscópicas:	80
8.2.	Carga bacteriana por envase.....	81
8.3.	Carga bacteriana para cada tratamiento.....	82
8.4.	Caracterización.....	82
8.5.	Medición de halos de inhibición.....	83
8.6.	Conteo bacteriológico.....	84
8.6.1.	Mezcla probiótica y producto del mercado	85
8.6.2.	Dosificación.....	89
8.7.	Patología en fresco.....	90
8.8.	Análisis estadístico.....	91
8.8.1.	Media de colonias amarillas y verdes en estadio zoea para la corrida 1 y 2	91
8.8.2.	Media de colonias amarillas y verdes en estadio Mysis para la corrida 1 y 2.	92
8.8.3.	Media de colonias amarillas y verdes en estadio PL para la corrida 1 y 2.....	93
8.8.4.	Media de colonias amarillas y verdes en estadio PL de la cosecha de la corrida 395	
8.8.5.	Supervivencia al final del ciclo de producción	96
CAPITULO V.....		99
9.	DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	99
9.1.	DISCUSIÓN.....	99
9.2.	CONCLUSIONES	101
9.3.	RECOMENDACIONES.....	103
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	104
11.	ANEXOS.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síndrome de bolitas	33
Figura 2. Daños en el hepatopáncreas	34
Figura 3. Juveniles, animal del parte inferior afectado por NHP.....	36
Figura 4. Características del género <i>Bacillus</i> como probiótico en la acuicultura.....	49
Figura 5. Bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	51
Figura 6. Bacterias Gram positivas del género <i>Bacillus</i> vista al microscopio.....	52
Figura 7. Aspecto morfológico de las bacterias del género <i>Bifidobacterim</i> , especie <i>B. longum</i>	53
Figura 8. Bacterias del género <i>Streptomyces</i> vistas en microscopía electrónica de barrido...54	
Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión de <i>Nitrosococcus oceani</i>	55
Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de la bacteria <i>Pediococcus acidilactici</i>	56
Figura 11. Fases de crecimiento bacteriano.	57
Figura 12. Morfología de las colonias	61
Figura 13. Morfología de camarón blanco.....	63
Figura 14. Laboratorio de microbiología, coordenadas 2°13'54.2"S 80°52'09.2"W	67
Figura 15. Laboratorio MARCOR 1 ubicado en comuna Monteverde, en las cercanías de la Playa Pacoa(derecha), módulo 2 habilitado en Ballenita, cantón Santa Elena (izquierda).	68
Figura 16. Laboratorio DULODER S.A (derecha); extensión Mar bravo (izquierda).....	68
Figura 17. Métodos aplicados para la determinación de la cinética bacteriana.....	70
Figura 18. Pasos para la tinción gram tradicional.....	71
Figura 19. Mezcla probiótica (Tratamiento) y Probiótico comercial (control).	73
Figura 20. Aumento de la dosis (Tratamiento) y dosificación normal (control)	74
Figura 21. Cinética individual mediante fotometría de las cepas A, B y C.....	79
Figura 22. Cinética individual obtenida en las siembras microbiológicas de las cepas A, B y C.....	80

Figura 23. Cinética individual obtenida en las siembras microbiológicas de las cepas A, B y C.....	81
Figura 24. Carga bacteriana presente en la corrida 1 del estadio Zoea.	85
Figura 25. Carga bacteriana presente en la corrida 2 del estadio Zoea.	86
Figura 26. Carga bacteriana presente en la corrida 1 del estadio Mysis.....	86
Figura 27. Carga bacteriana presente en la corrida 2 del estadio Mysis.....	87
Figura 28. Carga bacteriana presente en la corrida 1 del estadio PL.....	88
Figura 29. Carga bacteriana presente en la corrida 2 del estadio PL.....	88
Figura 30. Carga bacteriana presente en la cosecha de la corrida 3 del estadio PL.	89
Figura 31. Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en el estadio de Zoea.	92
Figura 32. Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en el estadio de Mysis.	93
Figura 33. Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en el estadio de PL.	94
Figura 34. Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en la cosecha de PL 16.	95
Figura 35. Porcentaje de sobrevivencia del grupo tratamiento y control.	96
Figura 36. Porcentaje de sobrevivencia del grupo tratamiento y control.	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaños de filtro y temperatura para la desinfección.	40
Tabla 2. características físicas de los principales ácidos orgánicos.	42
Tabla 3. Principales metabolitos producidos por bacterias probióticas.	48
Tabla 4. Alimentos suministrados en la dieta del protocolo de producción larvaria.	66
Tabla 5. Bacterias, vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos implementados.	66
Tabla 6. Porcentajes establecidos por la empresa para la obtención de cada tratamiento	70
Tabla 7. Grados de severidad de UFC en larvas y postlarvas de camarón	75
Tabla 8. Formato para realizar patología en fresco de la guía técnica de patología e inmunología de camarones Penaeidos.	76
Tabla 9. Datos de densidad óptica y UFC/ ml en cada revisión.	78
Tabla 10. Diluciones de las siembras de cepas realizadas en los diferentes periodos de tiempo con su respectiva contabilización de UFC.	80
Tabla 11. Cuantificación de cargas bacterianas presentes en diferentes volúmenes.	81
Tabla 12. Cuantificación de cargas bacterianas presentes en cada envase de los tratamientos.	82
Tabla 13. Caracterización de la morfología de las colonias.	83
Tabla 14. Medición de halos de inhibición de las cepas de forma individual.	83
Tabla 15. Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 1 y 2 del estadio Zoea.	91
Tabla 16. Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 1 y 2 del estadio mysis.	92
Tabla 17. Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 1 y 2 del estadio PL.	94
Tabla 18. Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 3 del estadio PL.	95

RESUMEN

Ecuador cuenta con 320 laboratorios, siendo Santa Elena poseedor de más de 250 instalaciones para la crianza de larvas, dentro de comuna Monteverde se ubica el laboratorio de larvas Marcor 1, donde los problemas radican principalmente en las infecciones bacterianas causadas por bacterias del género *Vibrio* y *Pseudomonas* causantes de anomalías y pérdidas económicas. La utilización de mezclas de cepas probióticas con las dosificaciones idóneas ha sido una de las opciones más optadas por los acuicultores para el control de patologías en sus cultivos, por lo que, en el presente estudio se tiene como objetivo evaluar la efectividad de un probiótico líquido aplicado en tanques de producción larvaria, determinando la supervivencia de los organismos y su resistencia a agentes patógenos.

Para efectuar aquello se procedió con el establecimiento de la cinética propia de cada bacteria utilizada, mediante observación visual, mediciones de la densidad óptica, conteos microscópicos y microbiológicos que reflejaron un crecimiento acelerado para las cepas B y C en el lapso de 12 horas obteniendo una densidad máxima de $2,5E+09$ y $2,2E+09$ UFC/ml, la cepa A en el periodo de 24 horas las igualó con $2,20E+09$ UFC/ml; De la misma forma se realizaron pruebas de inhibición ante diferentes bacterias patógenas, entre ellas *vibrios* y *pseudomonas*, cuyos halos fueron de 10 a 30 mm de diámetro, esto les permitió ser consideradas con acción inhibitoria;

En la fase de aplicación se utilizó 6 tanques en cada ciclo, dividiéndose en 3 de control y 3 de tratamiento, efectuando las pruebas en el lapso de 3 periodos de producción, los dos primeros fueron direccionados a comparar la mezcla probiótica con un producto del mercado y el tercero fue enfocado en la dosificación.

La carga bacteriana de los dos primeros ciclos fue similar en ambos grupos, presentando valores exponenciales máximos en colonias amarillas de $1.7E+04$ UFC/ml para zoea, $2.8E+05$ UFC/ml en mysis y $4.0E+05$ UFC/ml en postlarva; en colonias verdes los

mayores rangos fueron $7.56E+03$ UFC/ml en zoea, $3.85E+03$ UFC/ml en mysis y $7.0E+01$ UFC/ml en postlarva. Al aumentar la dosificación se obtuvo la reducción de vibrios amarillos y verdes con medias de $9,81E+03$ UFC/ml y $7.56E+03$ UFC/ml manteniéndose en el rango de lo aceptable; en los tanques con la dosificación normal se cuantificó un valor elevado con $1.75E+04$ UFC/ml para colonias amarillas y $6.1E+01$ UFC/ml para verdes.

Los porcentajes de supervivencia en las dos primeras cosechas fueron próximos, variando del 5 al 10% en la densidad larval al final del ciclo, resultado semejante en la tercera, donde existió un 7% más en la media poblacional obtenida para aquellos con una dosis adicional, además, en la patología en fresco de todos los tanques con la mezcla probiótica se establecieron anomalías porcentuales del 10.03 % a nivel branquial en el estadio zoea, 21,01% en Mysis a nivel intestinal y 7,6% en postlarva. La actividad profiláctica se vio reflejada en el control de bacterias y densidad viable de organismos.

Palabras clave: Bacteria, larvicultura, probiótico y profilaxis.

ABSTRACT

Ecuador has 320 laboratories, with Santa Elena having more than 250 facilities for raising larvae. The Marcor 1 larvae laboratory is located within the Monteverde commune, where the problems lie mainly in bacterial infections caused by bacteria of the genus *Vibrio* and *Pseudomonas* causing anomalies and economic losses. The use of mixtures of probiotic strains with the ideal dosages has been one of the options most chosen by aquaculturists to control pathologies in their cultures, therefore, the present study aims to evaluate the effectiveness of a liquid probiotic. applied in larval production tanks, determining the survival of the organisms and their resistance to pathogens.

To do this, we proceeded with the establishment of the kinetics of each bacteria used, through visual observation, optical density measurements, microscopic and microbiological counts that reflected accelerated growth for strains B and C in the period of 12 hours, obtaining a maximum density of $2.5E+09$ and $2.2E+09$ CFU/ml, strain A in the 24-hour period equaled them with $2.20E+09$ CFU/ml; In the same way, inhibition tests were carried out against different pathogenic bacteria, including vibrios and pseudomonas, whose halos were 10 to 30 mm in diameter, this allowed them to be considered with inhibitory action;

In the application phase, 6 tanks were used in each cycle, divided into 3 control and 3 treatment, carrying out the tests over the period of 3 production periods, the first two were aimed at comparing the probiotic mixture with a product on the market. and the third was focused on dosage.

The bacterial load of the first two cycles was similar in both groups, presenting maximum exponential values in yellow colonies of $1.7E+04$ CFU/ml for zoea, $2.8E+05$ CFU/ml in mysis and $4.0E+05$ CFU/ml in postlarva; in green colonies the highest ranges were $7.56E+03$ CFU/ml in zoea, $3.85E+03$ CFU/ml in mysis and $7.0E+01$ CFU/ml in postlarva. By increasing the dosage, the reduction of yellow and green vibrios was obtained

with averages of $9.81E+03$ CFU/ml and $7.56E+03$ CFU/ml, remaining within the acceptable range; In the tanks with the normal dosage, a high value was quantified with $1.75E+04$ CFU/ml for yellow colonies and $6.1E+01$ CFU/ml for green.

The survival percentages in the first two harvests were close, varying from 5 to 10% in larval density at the end of the cycle, a similar result in the third, where there was a 7% increase in the population average obtained for those with an additional dose. Furthermore, in the fresh pathology of all the tanks with the probiotic mixture, percentage anomalies of 10.03% were established at the gill level in the zoea stage, 21.01% in Mysis at the intestinal level and 7.6% in the postlarva. The prophylactic activity was reflected in the control of bacteria and viable density of organisms.

Keywords: Bacteria, larviculture, probiotic and prophylaxis.

GLOSARIO

Acuicultura Actividad direccionada al cultivo y producción de especies acuáticas, ya sean de agua dulce o salada. Se emplean metodologías y técnicas para ser aplicadas en los protocolos de uso, con el objetivo de un óptimo desarrollo y crecimiento de las especies cultivadas (FAO, 2022).

Antibiótico Son aquellos medicamentos direccionados a combatir infecciones originadas por presencia bacteriana, se utilizan en los seres humanos y en los animales, su función es erradicar la presencia de bacterias o entorpeciendo su desarrollo y multiplicación (NLM, 2021).

Bacteria Son microorganismos procariontes unicelulares, cuando generan daños en el hospedero adoptan el nombre de “patógenas” generando enfermedades, no obstante, también se encuentran bacterias buenas que suelen denominarse “benéficas”, en cualquiera de ambos casos, estas pueden ser esféricas, alargadas, filamentosas curvadas o helicoidales (NHGR, 2023).

Cinética Microbiana Es la curva de la fase de crecimiento de la vida microbiana, donde se establece el periodo de reproducción, desarrollo y muerte, considerando sus adaptaciones, ciclos de las células junto al medio externo (CSA, 2021).

Larvicultura

Se refiere al cultivo de larvas dentro de los laboratorios, en el caso del camarón, son sembradas después de la eclosión, al estar en la fase de Nauplio, facilitando su desarrollo para obtener postlarvas de calidad (Prieto & Atencio, 2008).

Microbiota

Es la población bacteriana y de microorganismos que se alojan, ya sea, en la piel, zona bucal, intestino, etc., mismas que tienen un papel crucial para el buen estado del organismo (CMED, 2020).

Patología

Estudia las enfermedades, los trastornos anatómicos que constituyen a los tejidos y órganos con padecimientos, analizando la sintomatología y signos clínicos que estén manifestándose, lo que le permite establecer al especialista un diagnóstico fundamentado a través del uso de diferentes metodologías científicas de análisis (Drut, 2020).

Probiótico

En el ámbito de la acuicultura, los probióticos son microorganismos que se encuentran en estado líquido o en polvo, suministrados en el alimento o medio de cultivo, que al ser ingeridos colonizan el tracto gastrointestinal del animal y al hallarse en cantidades ideales resultan ser muy beneficiosos al combatir agentes patógenos que se puedan causar posibles afectaciones (NIH, 2022).

Profilaxis

Es el conjunto de medidas llevadas a cabo con la finalidad de prevenir enfermedades, en el contexto de la larvicultura se puede interpretar como las acciones que se aplican dentro de los diferentes

estadios larvales para poder evitar la presencia de micro y macroorganismos que puedan generar padecimientos en los individuos cultivados que se encuentran en constante desarrollo, manteniendo en buen estado de salud a los animales (Prieto A. , 2004).

Sintomatología

Son los síntomas o señales que hacen referencia a cierta enfermedad, logrando establecer características de la misma y por consiguiente establecer un criterio sobre su supuesto origen u motivo (CUN, 2023).

Supervivencia

Es la acción y efecto de sobrevivir, es decir, mantenerse con vida tras un suceso que generó o propicio condiciones adversas en el medio (Pondo & Gardey, 2023).

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHPND	Necrosis Hepatopancreática Aguda
ATP	Trifosfato de Adenosina
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BG	B-glucanos
CAT	Catalasa
CNA	Cámara Nacional de Acuicultura
CSA	Cumplimiento, Seguridad, Responsabilidad
DGSA	Dirección General de Salud Animal
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMS	Síndrome de Mortalidad Temprana.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
G	Gramo
GPx	Glutation peroxidasa
LB	Caldo de Lisogenia

LPS	Lipopolisacáridos
NM	Nanómetros
MM	Milímetros
MPO	Mieloperoxidasas
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PG	Peptidoglucanos
PL	Postlarva
RAM	Reacción adversa de medicamento
SEGOB	Secretaría de Gobierno.
SOD	Superóxido dismutasa
T1	Tratamiento 1.
T2	Tratamiento 2.
T3	Tratamiento 3.
TCBS	Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sucrosa
TM	Toneladas Métricas
TSA	Caldo Trípico de Soya
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Radiación ultravioleta

WFS

Síndrome de las Heces Blancas

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La demanda por parte de productos acuícolas ha presentado alzas a nivel global, donde la larvicultura ha tenido principal relevancia dentro de la fase productiva del camarón de engorde, volviéndose así una práctica común para abastecer con los requerimientos del mercado (CNA, 2021), destacando a Ecuador como el primer exportador y productor de camarones en el mundo para el año 2021, sobresaliendo en el desarrollo de la genética en sus maduraciones (CNA, 2023). No obstante, una de las principales preocupaciones para aquellos que manejan esta área de producción son las enfermedades que se presentan a lo largo del desarrollo de los individuos (FAO, 2011). Generalmente suelen presentarse a los hongos, virus y bacterias, como los patógenos más comunes, estas últimas tienen mayor incidencia durante el ciclo de vida de los camarones, haciéndose presente en los distintos estadios de los individuos, ocasionando una alta tasa de mortalidad y desbalances en la economía del mismo, generando una fase crítica en el ciclo de vida del animal (Toledo et al., 2018).

Es común encontrar bacterias en los cultivos, como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*; presentándose también virus y hongos, debido a que se transmiten en la acuicultura mediante el alimento, agua, entre otros vectores, ocasionando un aumento en cuanto a las probabilidades de generar una infección (García et al., 2021). Estas bacterias logran originar afectaciones en distintas partes que conforman la morfología estructural del camarón, deteriorando la piel, branquias y sus tejidos (Gómez et al., 2018). En Ecuador, las patologías comúnmente detectadas en la larvicultura de *Litopennaeus vannamei* pertenecen a la mancha blanca e infecciones originadas por *Vibrios*, estas afecciones pueden llevar a la reducción considerable de larvas de calidad, menos supervivencia y pésimo crecimiento larvario, lo que resulta en un descenso en la curva económica por parte del productor (ECA Sinergia, 2019).

La introducción de los probióticos es una de las mejores opciones por las que se han direccionado los acuicultores, ya que, en los últimos años ha tomado fuerza, llegando a considerarse como una medida profiláctica primordial para la prevención de enfermedades en los cultivos larvarios,

al ser constituido por microorganismos que tienen una acción positiva y su administración puede ser a través del medio de cultivo o del alimento de preferencia para el productor, contribuyendo en el correcto desarrollo de los organismos acuáticos que necesitan mantener equilibrada su microbiota intestinal, minimizando la carga bacteriana no beneficiosas y mejorando su sistema inmunológico (Pérez et al., 2020). En el engorde y la reproducción de crustáceos, tal es el caso, del camarón, la tecnología probiótica es muy reconocida, al tener una basta utilización para el incremento en la producción de los productos provenientes del mar, demostrando eficacia en los estadios larvales con la reducción de mortalidades e incentivando al mercado con el mejoramiento del bienestar de los organismos acuáticos, demostrando ser una excelente opción direccionada a la obtención de animales con un estado de salud idóneo, donde el grado de afectaciones por agentes patógenos es mínima (Villamil & Martínez, 2009).

En reiteradas ocasiones se ha demostrado que la utilización de probióticos refuerza la resistencia y el desarrollo de la producción en sus diferentes estadios de crecimiento, tomando la dirección acertada para un futuro prometedor mediante estrategias profilácticas que contribuyan a evitar manifestaciones patológicas por ayudar en el control de cargas bacterianas del medio (Sigüenza & Domínguez, 2021).

En un estudio realizado por Pérez y colaboradores (2020) se validó que el uso de probióticos logra una baja tasa de mortalidad en los estadios iniciales del camarón ocasionadas por factores estresantes del medio en que se encuentra, tales como, alteraciones en la temperatura y la salinidad. El caso hace referencia a utilizar bacterias probióticas para lograr un descenso en la incidencia de afecciones al motivar acciones inhibitorias frente a agentes bacterianos patógenos y, por lo tanto, hacer de esta una medida efectiva para la producción de camarones sostenible (Toledo, Castillo, Carrillo, & Arenal, 2018).

2. PROBLEMÁTICA

Los agentes patógenos que provocan las principales patologías en los estadios larvarios son las bacterias y son ampliamente controlados de manera continua. Estas anomalías se encuentran distribuidas en todo el sector camaronero, los principales géneros bacterianos que se encuentran como problema de la salud de las larvas son los del género *Vibrio*, los cuales se han detectado a *V. Harveyi*, *V. parahaemolyticus* *V. vulníficus* y algunas especies de *Pseudomonas sp.* como responsables de estas infecciones en larvas. Las anomalías fisiológicas que están causando son retrasos por problemas de muda, estrés, debilitamiento, retraso en crecimiento, lo que resulta en una alta mortalidad y una disminución en la producción. Las alternativas de protección de control bactericida en la actualidad, contra bacterias patógenas son principalmente los probióticos, ya que actúan como preventivos y controladores de aquellas patologías de origen bacteriano, también se suele hacer uso de ácidos orgánicos, vitaminas, inmunoestimulantes, etc., que tienen funciones similares.

La importancia de darle uso a microorganismos vivos radica en el reemplazo de los antibióticos, que ya no se utilizan ni emplean para la producción, debido a su impacto negativo al generar resistencia bacteriana, sin embargo, se han reportado algunos inconvenientes por el uso de probióticos o la selección de sus cepas antagónicas, lo que hace importante seleccionar cocteles o conjuntos de bacterias idóneos para poder controlar patologías bacterianas. En los protocolos de uso suele existir una falta de estandarización en cuanto a las dosificaciones y frecuencias de los cocteles probióticos a suministrar, esto conlleva a tener resultados poco fiables referente al control de las patologías, que se traduce en seguir observando problemas productivos en los sistemas larvarios. Por ello se debe establecer al conjunto de cepas idóneas que, al ser colocadas en determinados periodos y dosis, puedan asegurar una respuesta favorable al final de los ciclos, reafirmando que el uso de probióticos es una alternativa amigable para tener resultados exitosos frente a agentes patógenos.

3. JUSTIFICACIÓN

Los probióticos son requeridos en la industria de la acuicultura con la finalidad de utilizar a las bacterias de una forma pura, inhibiendo la proliferación de aquellas que tienen un efecto patógeno en el medio de cultivo. Por esta razón es necesaria que la selección de las cepas que se incorporan en un tratamiento profiláctico sea realmente eficiente al generar respuestas antagónicas dentro de los cultivos, proporcionando un medio idóneo con las dosificaciones correctas que permitan mantener las cargas patógenas dentro de los rangos normales, mínimos o nulos, generando un buen ambiente para el crecimiento y desarrollo de las larvas, direccionando al acuicultor a producciones exitosas.

La aplicación de mezclas probióticas durante los ciclos de producción se debe a la pureza que poseen y su potencial aplicación directa a los tanques, sin la necesidad de añadirle otro medio líquido como es el caso de los productos en polvo. Estas bacterias benéficas tienen la capacidad de actuar de forma inmediata frente a agentes patógenos bacterianos del medio, por lo que su adición reduce las cargas bacterias no favorables para los laboratorios y a su vez tienen un valor más accesible dentro del mercado.

Teniendo presente el concepto de profilaxis, que se refiere al conjunto de acciones preventivas ante la aparición y propagación de enfermedades, reduciendo la mortalidad y mejorando el bienestar de los individuos, se puede concluir que va direccionada al aumento de la productividad y rentabilidad de las operaciones acuícolas. En ello se centra la importancia de poder determinar la acción inhibitoria que tiene el compuesto de cepas probióticas utilizado en el desarrollo de larvas, para demostrar que mediante la valoración profiláctica se puede evaluar la disminución de bacterias patógenas en el desarrollo de los organismos para lograr un ambiente que genere una supervivencia considerable en las cosechas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad del probiótico líquido aplicado en tanques de producción larvaria determinando la supervivencia de los organismos y su resistencia a agentes patógenos.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la cinética bacteriana del cóctel Probiótico en diferentes lotes de cultivo.
- Aplicar un desafío *in vitro* con patógenos para el establecimiento de la capacidad inhibitoria de las cepas.
- Emplear las bacterias con acción inhibitoria para el análisis de su efecto en el desarrollo de los organismos.
- Determinar la probiosis en base a la supervivencia en larvas para la verificación de su eficacia frente a agentes patógenos del medio acuícola.

5. HIPÓTESIS

H0. La utilización del cóctel probiótico si ejerce un aumento en el control de bacterias patógenas, que se ve reflejado en la supervivencia de post larvas de *Litopenaeus vannamei*.

Hi. La utilización del cóctel probiótico no ejerce aumento en el control de bacterias patógenas, que se ve reflejado en la supervivencia de post larvas de *Litopenaeus vannamei*.

CAPÍTULO II

6. MARCO TEÓRICO

6.1. La larvicultura del camarón blanco

Ecuador fue el primer productor y exportador de camarón en el mundo, enfocándose en la producción de larvas de calidad que pertenecen a la clase *Litopenaeus vannamei*, destinando un aproximado de 210000 hectáreas al desarrollo de estos organismos, ubicándose en las provincias de Guayas (60%), El Oro (15%), Esmeraldas (9%), Manabí (9%) y Santa Elena (9%) (Piedra, 2022). Teniendo una excelente acogida en los mercados europeos y asiáticos al generar un alto número de exportaciones del producto, en el año 2022 se remitió un volumen de 1.069 TM y 7.289 millones de dólares, superando cifras de años anteriores (Cámara Nacional de Acuicultura, 2023).

La obtención de nauplios de calidad se debe a correcta selección genética de los reproductores, sumada a buenas prácticas sanitarias y cuidado animal idóneo, de acuerdo a la Subsecretaría de Acuicultura, dentro del país se cuenta con 320 laboratorios direccionados a la larvicultura, 20 enfocados en maduración y el resto larvicultura, siendo Santa Elena poseedor de más de 250 laboratorios de larvas, estando en constante desarrollo y crecimiento, provincias como el Oro, Guayas y demás provincias también destacan, inclusive en el año 2017 se abrieron 30 laboratorios de larvicultura nuevos para Esmeraldas (Líderes,2018).

Posterior a la incubación los individuos pasan por los estadios de zoea (I, II y III), mysis (I, II y III) para llegar a la etapa de postlarva, donde su alimentación será a base de microalgas, Artemia y suplementos alimenticios seleccionados por personal capacitado, con la finalidad de obtener individuos sanos para su transferencia a cisternas, tanques o

reservorios de pre-engorda, culminando en las piscinas de engorda que se enfocan en lograr que los camarones alcancen las tallas preferenciales para su comercialización nacional e internacional (Bermudes et al., 2023). En el transcurso del desarrollo larval se utilizan técnicas profilácticas basadas en probióticos que están enfocadas en controlar la presencia bacteriana no benéfica, a la vez que ayudan a mantener en buen estado la calidad del agua, asimilación del alimento, etc.

6.2. Enfermedades en la larvicultura

El mayor cuidado que debe tener el productor de camarón es durante la etapa de vida larvaria, puesto que, existe mayor susceptibilidad ante agentes infecciosos presentes en el medio, la infección del cultivo puede conllevar a un descenso elevado del número de organismos sembrado, lo que se traduce en afectaciones económicas para el acuicultor (Camara Nacional de Acuicultura, 2023). La implementación de normas de bioseguridad es un factor clave para controlar la presencia de virus, protozoarios, hongos y bacterias que resultan altamente dañinos en los distintos estadios que atraviesa la larva, desde la fase de nauplios hasta llegar a postlarvas, evidenciándose aquellas infecciones en la morfología irregular del animal, falta de movilidad, tamaño y demás características de los individuos durante las fases antes mencionadas (Mejía, 2018).

6.2.1. Enfermedades bacterianas

Las infecciones causadas por bacterias son las principales generadoras de mortandades en los tanques de producción, sobre todo en los estadios de zoea, mysis, postlarva y juvenil. Las características que adquieren los organismos al presentar una enfermedad bacteriana suelen ser las siguiente: La cutícula que recubre la parte superficial de su cuerpo, branquias y apéndices se erosiona; dentro de su morfología se empiezan a

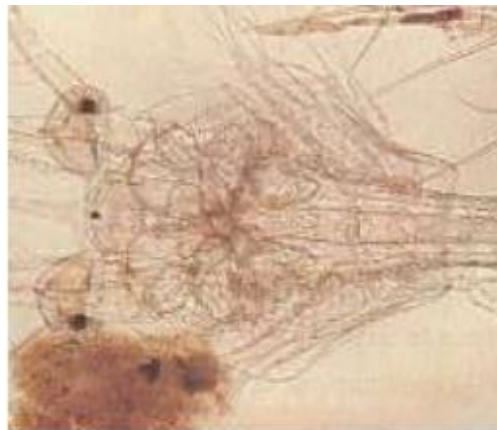
denotar lesiones localizadas y se visualiza a individuos con septicemia en toda su anatomía (Monrroy, 2015).

6.2.2. Síndrome de bolitas

Es una patología fácil de ser encontrada en los ambientes acuícolas, adquiriendo también el nombre de “bolitas” ha generado alzas en las densidades de mortandad dentro de la mayoría de las instalaciones dedicadas a la larvicultura. La sintomatología clínica de forma visual se puede describir como una descamación celular dentro del trago gastrointestinal de los organismos como se ve en la figura 1, esto provoca una muerte rápida, consiguiendo inclusive la pérdida total de los organismos sembrados (Villacís, 2023). En la literatura se ha descrito que la causante de este padecimiento es *Vibrio harveyi*, si no se controla las densidades del mismo y los parámetros de temperatura, las infestaciones de esta bacteria serán cada vez más difícil de controlar.

Figura 1.

Síndrome de bolitas



Fuente: Villacis, 2023

6.2.3. Síndrome de Zoea

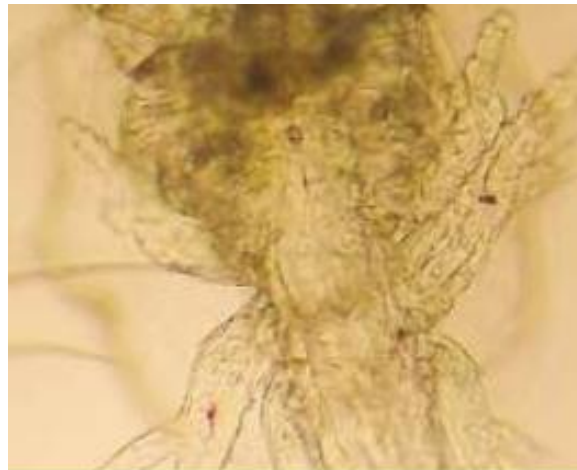
Se distingue de las otras enfermedades al generar una menor asimilación del alimento, por lo que las larvas dejan de comer con normalidad, esto a su vez provoca que

no puedan mudar y para concluir, los organismos mueren, es decir, las tasas de mortandad se elevan a un ritmo rápido. La microscopía ha permitido la observación de anomalías en los organismos con este padecimiento, donde la hepatopáncreas y el intestino se ven notoriamente afectados.

Mediante histopatología se ha establecido que los daños que estos órganos de vital importancia para los animales presentan son vacuolización, desprendimiento de sus células epiteliales y daños al nivel del epitelio de su intestino. (Kumar, 2017).

Figura 2.

Daños en el hepatopáncreas



Fuente: Villacís, 2023

6.2.4. Síndrome de mortalidad temprana (EMS o AHPND)

Es una enfermedad que desde hace no mucho tiempo está generando malestar en el ámbito camaronero, provocando muertes a gran escala de los individuos, por lo que productores de los continentes asiáticos han tenido muchas pérdidas debido a este síndrome. La sintomatología más sencilla de evidenciar es por la forma en que se desplazan, puesto que se vuelve errantes y descoordinado, su desarrollo se vuelve lento, tomando una coloración blanquecina con marcas en la parte del hepatopáncreas, el mismo que ve con un tamaño más

pequeño que lo usual, esto conlleva a no alimentarse de forma idónea y por ende su intestino se refleja vacío. (Opesca, 2013)

Se tiene conocimiento de la existencia de pérdidas económicas que rondan más de \$4 millones para Asia y Estados Unidos debido a esta patología en sus sistemas de producción, no obstante, las metodologías de manejo contra enfermedades infecciosas han estado en constante desarrollo, por lo que, se han implementado nuevas técnicas de mitigación que promuevan un ambiente libre o en su defecto lo mayormente regulado de estos patógenos oportunistas (Araguren, 2020).

6.2.5. Hepatopáncreas necrotizante (NHP)

Es posible encontrarse con esta patología en cualquier parte del mundo ya que su proliferación no ha tenido límites, siendo reportada constantemente por los acuicultores, por lo que es importante el mantenimiento de un ambiente libre de estrés y con los parámetros físico químicos controlados que puedan evitar la entrada de estos agentes infecciosos dentro de los tanques de producción larvaria, utilizando aceites esenciales o ácidos orgánicos con medida profiláctica.

Se ha estudiado más a profundidad la forma en que estas bacterias pueden llegar tan fácilmente a contaminar las siembras, esto nos ha permitido saber que su acción patógena se da mediante toxinas que dañan directamente las células eucariotas de los organismos, logrando adherirse sus tejidos y continuar con su actividad infecciosa volviéndose resistente inclusive a los antibióticos. Las bacterias patógenas que suelen tener esta capacidad de daño celular se pueden mencionar a los géneros como *Brucella*, *Legionella*, *Mycrobacterium* y *Salmonella* (Sanjuan, 2013).

Figura 3.

Juveniles, animal del parte inferior afectado por NHP



Fuente: Cuellar, 2013

6.3. Cultivos con altas cargas bacterianas

Las bacterias oportunistas utilizan el estrés de los animales como principal medio para poder llevar a cabo una infección (FAO, 2004) , por lo que al llevarse a cabo siembras en sistemas de cultivos donde los organismos tienen poco espacio y muchas densidades lo más seguro es que estén propensos a ser víctimas de estas bacterias presentes en el medio, razón por la cual los sistemas intensivos son los más se encuentran afectados por cepas virulentas de bacterias, que aprovechan estos lugares reducidos que suelen presentar organismos con afectaciones fisiológicas por la misma razón, el poco espacio que tienen, adentrándose en su sistema inmunológico y generando alteraciones en el mismo, todo esto termina con la obtención de organismos sensibles poco viables para continuar los demás ciclos de producción. (Guarnner, 2018)

En el caso de los criaderos, se suelen identificar cepas patógenas del tipo “primario”, estas promueven una microflora que es dañina para los individuos, generando

malestar dentro de las piscinas debido a que contiene medios con niveles altos de materia orgánica, lo que ayuda a la población patógena a seguir proliferándose (Suquilanda, 2017).

Las bacterias utilizan muchas formas de obtener ventajas para seguir multiplicándose, inclusive utilizando a los antibióticos, ya que estos al ser colocado suelen eliminar del medio a las bacterias con efecto benéfico y esto es aprovechado por las cepas virulentas para incrementar su población en pocos periodos de tiempos no es identificado por el biólogo para controlarlo. (Guarnner, 2018). También se debe tener en consideración que la falta de bioseguridad en los procesos de secado, limpieza de superficies, suelos y demás controles dentro de la infraestructura, son motivos por los que las infecciones tienen vía libre para su desencadenamiento (Suquilanda, 2017).

6.3.1. Profilaxis ante la presencia de enfermedades bacterianas

Uno de los métodos más utilizados para poder generar una profilaxis en el ambiente larvarios es la utilización de microorganismos, esto se debe a que su acción benéfica e inhibitoria de agentes patógenos, sumada a su fácil adhesión a tracto intestinal de los organismos y su interacción positiva con el sistema inmune de los mismos ,proporcionando un ambiente propicio para el desarrollo de larvas y prevención de patologías comúnmente encontradas en el ambiente acuático, siendo a la vez, amigable para el ecosistema (Vega., 2019)

Por esta razón se desarrollan métodos de manejo que beneficien los cultivos y los remedien en caso de encontrarse en mal estado, donde no solo las bacterias probióticas tienen el protagonismo, sino también, las algas, proteínas que ejerzan un correcto desenvolvimiento de los animales y buenas asimilaciones de los alimentos suministrados

(Gutiérrez, 2015). Las algas han demostrado ser capaces de aumentar las defensas de los crustáceos ante bacterias víricas oportunistas, llegando a porcentajes de 40-96% en reducción de patogenicidad dentro de los tanques de cultivo.

La ambición y constante anhelo de seguir en crecimiento ha vuelto a los acuicultores exigentes en sus cultivos, por lo que suelen optar por grandes volúmenes de siembra, si bien, como se mencionó con anterioridad, el estrés por falta de espacio es un factor detonante para el acceso a patógenos, esto se considera uno de las acciones consideradas a evitar, pues en ocasiones por la alta demanda del mercado internacional se quiere generar más, con poco, esto solo direcciona a los laboratorios a pérdidas económicas por descarte de organismos que terminan infectados (Cuéllar., 2018)

6.4. Principales actores de riesgo en la larvicultura

Dentro del ámbito de la larvicultura se comprende como factores de riesgo a aquello que es considerado como un potencial signo de amenaza en caso de no ser controlado, tal es el caso de las posibles enfermedades a presentarse dentro de los organismos cultivados, por aquella razón, al obtener los nauplios de los reproductores se procura garantizar que estén libres de patógenos, evaluando las condiciones de siembra, la calidad del agua de cultivo, alimento libre de contaminantes, ausencia de vectores mecánicos, densidades de siembra idóneas para evitar futuros problemas de estrés animal que conlleva a una mayor facilidad de infección por bacterias oportunistas del medio, etc. (Sarango, 2021). Las buenas prácticas referentes a la bioseguridad son cruciales para avalar un entorno eficaz y libre de padecimientos en la larvicultura.

Los principales factores de riesgo asociados a las enfermedades en la larvicultura del camarón blanco incluyen la introducción de reproductores portadores de patógenos, la contaminación del agua de cultivo, el alimento vivo contaminado, la presencia de vectores

6.4.1. Medidas de bioseguridad y desinfección en los sistemas larvarios

Siendo Ecuador uno de los mayores exportadores de camarón dentro de la acuicultura, ha desarrollado prácticas de manejo con la meta de poder tener un control dentro de las instalaciones de sus laboratorios, por ello aplican dentro de sus protocolos de desinfección se encuentran los tratamientos con luz UV, el uso de cloro para la desinfección de superficies, filtración, entre otros. No basándose únicamente en los equipos sino también, haciendo uso de alimento vivo estéril, como es el caso de las microalgas, le buen mantenimiento del stock de las mismas, le higiene al momento de manipular Artemia, etc.

El uso de antibióticos también cuenta como una estrategia de desinfección, sin embargo, es de amplio conocimiento que tanto en personas como animales, el uso a largo plazo de estos productos generan resistencias microbianas que terminan afectando a los cultivos, pero son necesarios ya que las bacterias suelen encontrarse en la microflora normal de las agua de siembra, razón por la que el uso de pequeñas dosis es imprescindible dentro de ciertos laboratorios, ya que, cada instalación se acopla a las medidas de desinfección de su preferencia. (Molina. C. , 2021).

6.4.2. Desinfección del agua

En el interior de los laboratorios se cuenta con sistemas de filtración, estos son utilizados para que por ellos circule el agua y pueda ser tratada con el fin de evitar el paso de vectores de riesgo y patógenos en general. Para ello el líquido pasa por un filtro inicial mediante pozos excavados de arena, consecuentemente se le agrega cloro para luego proceder con la decantación, donde nuevamente es circulada el agua a través de un filtro con menor micraje como se indica en la tabla 1, en este paso se aplica luz ultravioleta (UV) y ozono. También hacen uso de filtros de carbón activado, añadidura de EDTA y control de parámetros como temperatura y salinidad. (FAO 2011).

Tabla 1.

Tamaños de filtro y temperatura para la desinfección.

USO DEL AGUA	TAMAÑO DE FILTRO (µM)	TEMPERATURA (°C)
Cria larvaria	5	28 a 33
Cultivo de algas	0,5	18 a 24

Fuente: FAO, 2011

6.4.3. Desinfección de superficies

Al terminar las cosechas se procede con las limpiezas de los equipos, priorizando el área donde se encontrarán los futuros organismos, por lo que, en el proceso de secado se preparan los tanques o piscinas con la finalidad de garantizar superficies sin presencia de sustancias que pongan en riesgo la próxima producción, evitando y diseminando las posibles patologías con un tratamiento idóneo a efectuarse en fondos de cultivo.

En los tanques de producción larvaria se realizan las limpiezas previo al sembrado de Nauplios y posterior al mismo, con el afán de exterminar agentes infecciosos adheridos en los fondos y bordes. Se comienza con el lavado usando agua salada en grandes cantidades y

una solución de amonio cuaternario a concentraciones de 10-20 ml/litro, se prosigue con la adición de vitamina C que fue diluida en agua dulce, finalmente se vuelve a hacer uso de agua dulce con el objetivo de enjuagarlos, quedando recubiertos con polietileno traslúcido no tóxico hasta su utilización (Skretting, 2020).

La esterilización del equipo en la camaronicultura es mediante la preparación de Hidróxido de calcio Horcalsa (cal), sumándole un litro agua, de esto se obtiene una mezcla homogénea que será la aplicada en tanques o piscinas durante 10-15 días hasta que se visualicen grietas de alrededor 10 cm de profundidad. (Horcalsa, 2020)

6.4.4. Empleo de productos preventivos de las enfermedades bacterianas

Las bacterias con actividad benéfica colaboran en gran medida a un ambiente sano para el cultivo de los organismos, presentando las siguientes acciones: Inducen a que el pH se encuentre en niveles menores a 4, inhiben la multiplicación de bacterias víricas oportunistas que se albergan en los tanques y medios de producción de forma constante, producen ácido láctico que ayuda a estabilizar los desechos de los individuos, disminuyen la permeabilidad del tracto intestinal, elevan la actividad de la lactasa, producen inmunidad frente a otras cepas no beneficiosas ocupando el espacio disponible ejerciendo un efecto competitivo.

6.5. Ácidos orgánicos

Se consideran agregados viables para ser útiles ante microbios perjudiciales dentro de la producción (Defoirdt et al, 2009), la aplicación de ácidos orgánicos ha llevado a un mejoramiento en los sistemas larvarios debido a la respuesta positiva que genera dentro del intestino de los animales, pues al ser suministrados alteran la microbiota de las larvas

con la finalidad de mantener un control de cargas bacterianas y parásitos intestinales en los cultivos. (da Silva et al., 2014).

Su acción antimicrobiana primaria radica en modificar el pH de las células bacteriana, produciendo una acción inhibitoria dentro del hospedero, esto imposibilita el crecimiento de dichos agentes infecciosos patógenos y sus metabolitos de acción virulenta. (Kumar *et al.*, 2016). Entre los más destacables en Ecuador se tiene a:

- ácido propiónico.
- Ácido butírico.
- Ácido cítrico.
- Ácido fumárico.

6.5.1. Ácidos orgánicos utilizados

Dentro de la acuicultura se puede mencionar a los siguientes ácidos orgánicos como los más utilizados dentro de la tabla 2. La adición de estos ácidos ha permitido evidenciar un alza en la tasa de conversión alimenticia y un aminoramiento en la presencia de agentes infecciosos dentro de tracto gastrointestinal de los organismos. (Magazine, 2021)

Tabla 2.

características físicas de los principales ácidos orgánicos.

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

Fuente: Krish, 2010

6.5.2. Actividad de los ácidos orgánicos en el medio acuícola

Su actuar frente a bacterias dañinas es la potencializando el control de las mismas dentro del medio de cultivo, optimizan la palatabilidad y facilita la asimilación del alimento, mejoran la explotación energética lo que ayuda a un mejor metabolismo, tienen una acción inhibitoria de la de las cepas no beneficiosas de la microflora autóctona, a través de la liberación de iones de hidrógeno tiene una disminución del pH y poseen una capacidad amortiguadora. (Magazine, 2021).

6.6. Aceites esenciales

Estos combinados son líquidos lipofílicos generados como metabolitos secundarios, en su estructura poseen sustancias encargadas de proporcionar la fragancia en las plantas, llamando la atención de polinizadores y generando una buena defensa frente a la gran variedad de cepas dañinas de la microflora autóctona, siendo esa la razón principal por la que se lo ha estado empleando en el ámbito de la larvicultura, ya que rompen la capa externa de las células al igual que su membrana citoplasmática, evitando la síntesis de sus proteínas, ATP Y ADN, inhiben la secreción de enzimas e imposibilitan su comunicación mediante quórum sensing (Molina 2021) Sus componentes químicos participan en la traslocación de protones y fosforilación del ATP, teniendo un efecto de ataque contra bacterias Gram negativas. (Ortega., 2018).

En la actualidad se tiene gran variedad de aceites esenciales que son implementados en el área de la producción acuícola, entre los principales se menciona a: Aceite esencial de

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

6.6.1. Actividad de los aceites esenciales en el medio acuícola

No permiten la existencia de la comunicación entre cepas patógenas al interferir con el quórum sensing de estas, logrando la existencia de cargas bacterianas muy bajas en cuanto a sus densidades, esto permite que sea más sencillo poder eliminar a los agentes infecciosos. (Guitierrez, 2018). La forma en que actúan es a través de la generación de toxicidad en la pared celular, sintetiza proteínas, disminuye los niveles intracelulares de ATP, aminora el pH dentro de las células y produce alteraciones en el citoplasma (Guitierrez, 2018)

6.7. Antibióticos

Los antibióticos como oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin son utilizados en la larvicultura de camarones para controlar infecciones bacterianas específicas diagnosticadas, pero su aplicación es estrictamente controlada ya que pueden generar resistencia bacteriana si se emplean en exceso. Varios autores recomiendan la rotación de diferentes antibióticos en periodos cortos cuando ocurren brotes agudos a dosis adecuadas para eliminar la infección sin dejar residuos, con un retiro previo a la cosecha; su uso excesivo puede afectar negativamente el microbiota benéfico, incrementar la susceptibilidad de condiciones óptimas para la proliferación de otros patógenos y requerir el desarrollo de alternativas parciales como probióticos (Mejías, Mora, Mora, & Ramsés, 2018). El monitoreo bacteriológico para detectar las resistencias, el uso responsable y regulado de antibióticos puede ayudar a prevenir eventos infecciosos agudos durante la larvicultura de camarones.

6.7.1. Resistencia bacteriana

La resistencia antimicrobiana (RAM) es la capacidad de los microorganismos, ya sea bacterias, virus, hongos y parásitos, de resistir a fármacos a los que son aplicados. Esto se vuelve un complejo tratamiento ante las infecciones provocadas por agentes patógenos, produce el aumento de las condiciones más agresivas y letales de las enfermedades, e incrementa la susceptibilidad de proliferación y mortalidad. El uso de los antibióticos son empleados libremente en el cultivo y la precaución de enfermedades en organismos de interés comercial. Sin embargo, el uso irresponsable y excesivo de estos medicamentos ha contribuido al incremento de la RAM y la propagación de bacterias resistentes (Boeckel, 2015). El objetivo de la administración de antibióticos es aplicar únicamente a los individuos enfermos a través de tratamientos sin incluir a los organismos sanos dentro de la población. Algunos productores usan los probióticos de manera estratégica, pero incluyen animales no infectados, incrementado el riesgo o resistencia de enfermedades letales (McEwen, 2018).

6.8. El uso de probióticos

El uso y análisis de probióticos como parte de los elementos que impulsan en la industria acuícola, es una investigación reciente, que a nivel de producción sostenible pretender disminuir el impacto ecológico que producen las actividades acuícolas (SEGOB, 2013). En función a los microorganismos probióticos, funcionan beneficiando al hospedero, que favorecen el desarrollo, supervivencia e inmunoresistencia ligadas a procesos fisiológicos. sin embargo, según las investigaciones demuestran que estos microorganismos deben permanecer evaluados, asilados y empleados de manera estratégica a los hospederos destinados (Ochoa, 2012). La microbiota de los probióticos es posible aislar en diferentes fuentes, aunque ocurre en el tracto digestivo de animales acuáticos y en el mucus de algunos

peces. Básicamente, los probióticos pueden ser desarrollados en cultivos aislados o también encontrarse en sustratos acuáticos.

6.8.1. Mecanismos de acción de los probióticos

El uso de probióticos en el campo acuícola se ha aplicado desde hace varios años. Diferentes funciones han sido reportadas, tales como: potencializar la respuesta inmune, mantener un equilibrio a nivel del tracto gastrointestinal, incrementar exponencialmente la supervivencia en fases larvarias, aumentar la síntesis vitelogenina estimulando la maduración de los folículos (Pérez et al., 2020). Los mecanismos de acción contribuyen directamente al ecosistema intestinal, desempeñando los mecanismos inmunológicos, interactuando con microorganismos potencialmente patógenos, que generan metabolitos finales, como ácidos grasos de cadena corta (Guarner, 2007).

6.8.1.1. Biorremediadores

La utilización de cepas probióticas dentro de la camaronicultura tiene resultados positivos respecto al mejoramiento del agua y suelo, al tener efectos biorremediadores en el área de cultivo, bacterias como *Bacillus sp.*, *Paracoccus sp.*, entre otras, al ser agregadas de forma directa en el medio acuoso tienen una acción reguladora en la microbiota de los tanques, ayudando en la degradación de residuos de amonio, nitrito, sulfuro de hidrógeno y demás desechos procedentes de los organismos que se están desarrollando, aminorando la cantidad de minerales que han sido resultado de la materia orgánica presente, evitando los cúmulos de lodo en los fondos y en simultáneo reducen las condiciones anaeróbicas de la superficie de las piscinas (Santos, 2015).

Las enzimas generadas por las bacterias poseen la capacidad de deteriorar la materia orgánica en los laboratorios de producción, siendo de provecho para la obtención de un

cultivo saludable con un número idóneo de organismos en las cosechas, tanto en la crianza de larvas como en las fases de crecimiento y engorde.

Los compuestos nitrogenados son tratados mediante la acción nitrificante y desnitrificantes de las cepas empleadas, donde la nitrificación bacteriana se comprende como la oxidación de amonio/amoniaco a nitrato mediante la hidroxilamina junto al nitrito; mientras la acción desnitrificante se lleva a cabo con el descenso del nitrato a óxido nitroso y en última instancia a gas nitrógeno, el mismo que al culminar vuelve a la atmosfera.

6.8.1.2. Inmunoestimuladores

Las cepas bacterianas que se tengan en consideración para el uso en los cultivos deben contar con un efecto estimulante en el sistema inmunológico de los individuos, con la finalidad de mantenerlo altas las defensas del hospedero, incrementando su capacidad antagonica frente a bacterias no benéficas que puedan ser perjudiciales al estar presentes en el medio (Pérez et al., 2020). En la acuicultura se conoce mayormente a los estimulantes con funciones celulares, siendo los B-glucanos (BG), lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglucanos (PG) los más mencionados, estos últimos provienen de la pared de microorganismos Gram (+) con una respuesta eficaz ante vibrios y el virus de la mancha blanca (Días & Montes, 2012).

6.8.1.3. Mejoramiento de la salud

EL aumento y mejoría en el balance de la flora microbiana dentro del intestino del organismos es lo que le da buenas referencias al uso de bacterias probióticas que se emplean como medida profiláctica, puesto que, al adherirse y colonizarse en el interior del tubo digestivo, genera una mejor asimilación del alimento y absorción de los nutrientes consumidos, sumándole la buena respuesta del sistema inmune y menor presencia de padecimientos patológicos causados por infecciones de bacterias oportunistas (Molina, 2019).

Optimizan la recepción de nutrientes debido a la síntesis de sus enzimas que ayudan en la digestión, teniendo una actividad inmunoreguladora e incentivando a la microbiota benéfica del intestino para tener una mayor adaptabilidad por parte del huésped. Como se ha mencionado con anterioridad, las bacterias tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos, estos pueden ser ácidos grasos, antibióticos, peróxido de hidrógeno, sideróforos de hierro, enzimas bacteriolíticas, proteasas y amilasas, entre otros. Los metabolitos que se producen gracias a las bacterias con función de control biológico ante cepas patógenas por su acción antibiótica dentro de la industria acuícola son los del género *Streptomyces*, mientras el género *Bacillus* y *Enterococcus* generan bacteriocinas, se detalla en la tabla 3.

Tabla 3.

Principales metabolitos producidos por bacterias probióticas.

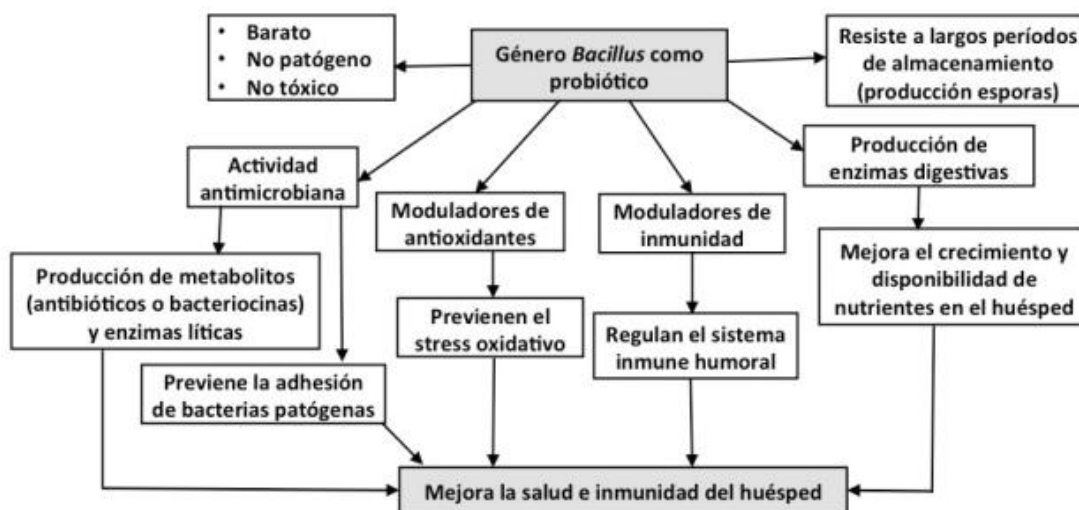
Metabolito	Microorganismo	Referencia
Bacteriocinas	<i>Lactobacillus</i> sp.	Zhang <i>et al.</i> , 2013, Gomez-Sala <i>et al.</i> , 2015; Lobos <i>et al.</i> , 2017; Lyapraj <i>et al.</i> , 2013.
	<i>Streptococcus</i> sp.	
	<i>Enterococcus</i> sp.	
Terpenoides, Alcaloides y policétidos	<i>Pseudomonas alteromonas</i>	Offret <i>et al.</i> , 2016
Antibióticos	<i>Streptomyces</i>	Aponte-Ubillus <i>et al.</i> , 2015; Evangelista-Martínez <i>et al.</i> , 2017

Fuente: Pérez et al., 2020

En una investigación realizada por Prieto y colaboradores (2012) se aisló bacterias del género *Bacillus* recolectadas de algas marinas, arena de mar y agua de mar proveniente de Irlanda, en aquel proyecto se identificó a las cepas con las mayores capacidades para producir compuestos antimicrobianos que puedan tener una actividad positiva en el mejoramiento de la salud de los individuos evaluando varios aspectos, se puede apreciar en la figura 4.

Figura 4.

Características del género *Bacillus* como probiótico en la acuicultura.



Fuente: Pérez et al., 2020

6.8.1.4. Competencia por nutrientes

Las bacterias probióticas presentan determinada competitividad ante otras cepas (patógenas), por lo que, se observa un requerimiento sincronizado de los recursos presentes en medio, en que dos o más bacterias de diferentes especies compiten por dichos nutrientes, debatiendo en quién podrá adquirirlos en el menor tiempo posible y en mayores volúmenes, logrando la estimulación del sistema inmune local y sistemático a través de la incorporación de macrófagos y el aumento de la concentración de inmunoglobulinas (López et al., 2023). Así también, dicha competitividad se ve reflejada en la rápida adhesión de las bacterias benéficas dentro del tracto intestinal de los organismos, abarcando el mayor espacio posible para evitar que los microorganismos oportunistas puedan efectuar una colonización dentro del animal.

Al tener a varias cepas compitiendo por nutrientes, se emplea una investigación exhaustiva para poder establecer cuáles son las necesidades que requiere la bacteria de

interés, más aún si tiene un propósito de control dentro del cultivo, conociendo sus capacidades y los patógenos direccionados a combatir (Pacheco et al., 2023).

6.8.1.5. Capacidad antagónica

La actividad antagónica de las bacterias se debe a la producción de antibióticos y compuestos antimicrobianos, puesto que, mediante investigaciones realizadas a lo largo de los años, se han llevado a cabo pruebas in vitro enfrentando a las cepas del medio marino con actividad probiótica ante cepas patógenas, determinando la capacidad inhibitoria de las mismas.

De acuerdo a Pérez y colaboradores (2020), se pueden mencionar las siguientes respuestas de inhibición en patógenos obtenidos por *Bacillus sp.*:

- Despolarización debido a la presencia de poros en la membrana de las células.
- Se adhieren a las superficies e inhiben la colonización de patógenos.
- No permiten que se exprese el gen virulento, inhibiéndolo (quorum sensing).
- Generan enzimas líticas (proteasas, quitinasas, celulasas, β -1,3-glucanasas)
- Incitan a producir antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).
- Alertan a los genes responsables de modular la inmunidad humoral para tener una acción de control ante la presencia de bacterias oportunistas
- Al haber un aumento de lisozima, peroxidasas, SOD, CAT, proteasas y mieloperoxidasas (MPO) dentro del organismo, se presenta una mejor respuesta inmunológica contra cepas dañinas.

6.9. Principales géneros probióticos

En la producción de probióticos se tiene preferencia para aquellos géneros que producen ácido láctico (BAL) debido al hallarse en cantidades ideales previene las infecciones por bacterias patógenas, pues colonizan y se fijan en las paredes gastrointestinales de los organismos e interactúan con el sistema inmune, entre los géneros más destacables de bacterias probióticas tenemos a *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterim*, *Nitrosococcus*, *Pediococcus*, entre otras (Reyes & Rodriguez, 2012). Se describe un poco a las antes mencionadas:

6.9.1. *Lactobacillus*

Las bacterias ácido láctico (BAL) como se ve en la figura 5, son el principal grupo y se caracterizan por elaborar ácido láctico como resultado de procesos metabólicos en los carbohidratos, es decir sustancias contenidas de azúcares. Generalmente, los lactobacilos no provocan enfermedades, ayudan a descomponer los alimentos, aprovechar los nutrientes y responder a microorganismos potencialmente patógenos que pueden causar enfermedades (Velayati & Karim, 2021).

Figura 5.

Bacterias del género Lactobacillus.



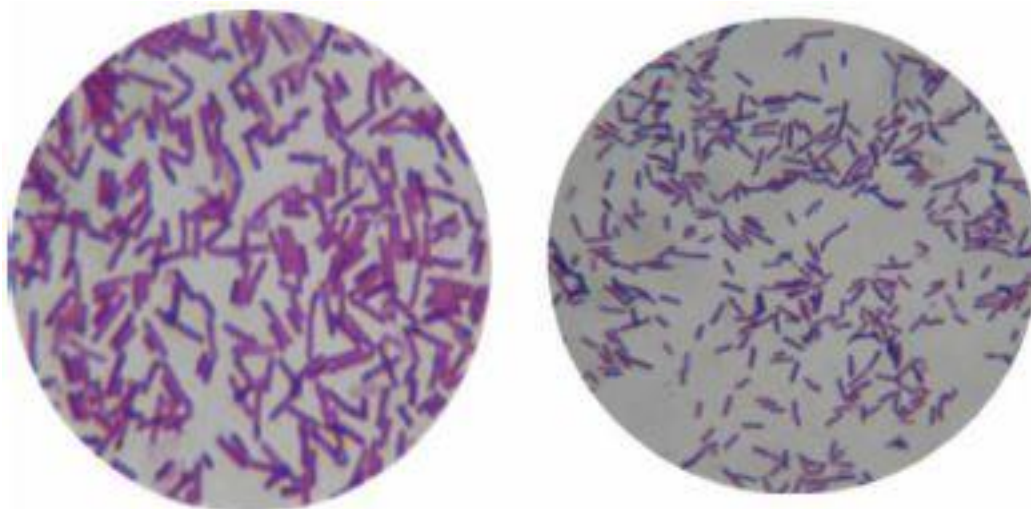
Fuente: Briseno, 2023

6.9.2. *Bacillus*

El género *Bacillus* como se ve en la figura 6, se ha destacado al estar presentes en grandes cantidades dentro de ambientes acuáticos, terrestres e inclusive en plantas, contiene más de 336 especies, los grupos que destacan son *B. cereus* debido a su patogenicidad y el grupos de *Bacillus subtilis* que cuentan con una capacidad de adherencia y proliferación positiva dentro de los organismos, teniendo una acción probiótica gracias a sus enzimas hidrofílicas extracelulares, ya que estas tienen efecto sobre los ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos que actuarán de forma activa para la generación de antibióticos dentro de los individuos, aminorando la incidencia de patógenos como *E. coli*, *Pseudomonas*, entre otros agentes infecciosos y promoviendo la presencia de demás bacterias benéficas presentes, tales como las del género *Lactobacillus* (Velayati & Karim, 2021).

Figura 6.

Bacterias Gram positivas del género Bacillus vista al microscopio.



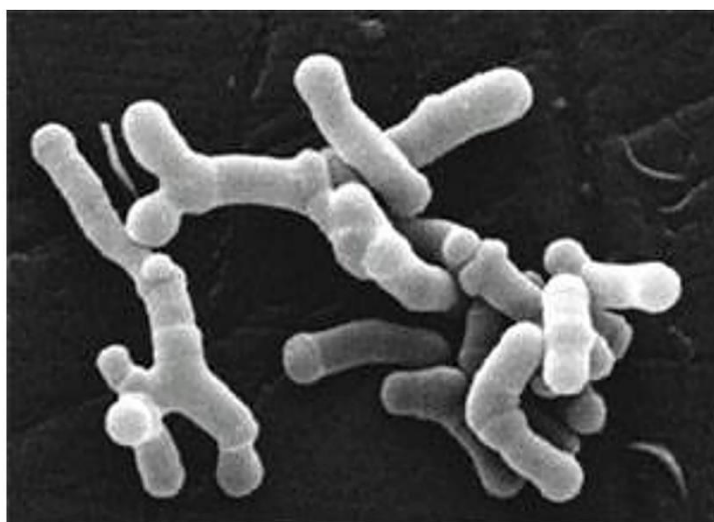
Fuente: Corrales et al., 2014

6.9.3. *Bifidobacterim*

El género forma parte del Grupo de BAL y su descubrimiento data de 1899, siendo utilizado primero en humanos mediante la suministración en yogurt, mejorando la microbiota del intestino, posterior a esto se evaluó su efectividad en diferentes ámbitos y resultó tener un efecto probiótico tanto en humanos como en animales, se puede apreciar su morfología en la figura 7. Su acción es facilitar la descomposición de los alimentos, permitiendo una mayor absorción de nutrientes, esto a su vez permite enfrentarse a cepas o microorganismos no beneficiosos para el sistema de producción, ayudando a prevenir enfermedades de infecciones bacterianas, forma parte de múltiples compuestos del mercado(Aguilera & García, 2021).

Figura 7.

Aspecto morfológico de las bacterias del género Bifidobacterim, especie B. longum.



Fuente: Barrón et al, 2019

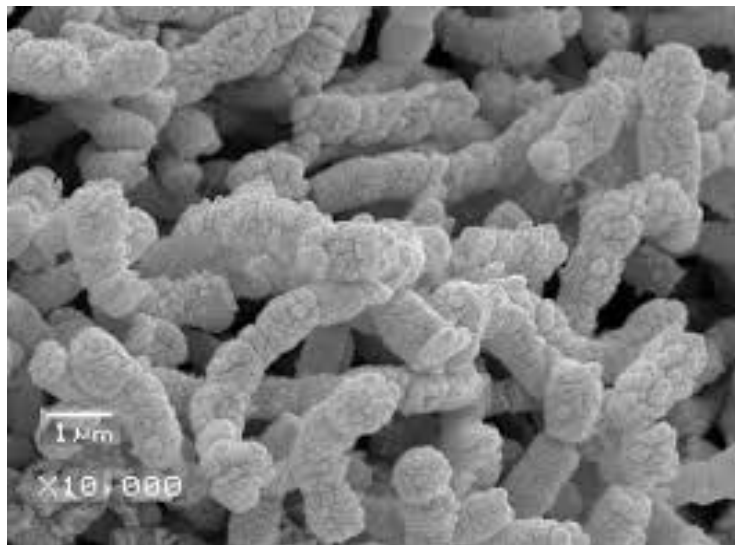
6.9.4. *Streptomyces*

Dentro de este género se encuentran cepas filamentosas prolíficas del grupo Gram positivas situadas en diferentes áreas, tanto en la tierra como del agua e incluso excremento

de animales, no obstante, se las suele tomar a la provenientes del mar para destinarlas al aislamiento y obtención de los ceparios (Quiñones et al., 2016). El enfoque dentro de este género esta direccionado en el aspecto biotecnológico debido a su gran capacidad de generar metabolitos que tienen una acción de antibiótico, antitumoral, inmunoestimulante, antiparasitaria, sideróforos, exoenzimas, entre los más destacados, los mismos que tienen un eficaz aminoramiento de bacterias como: *Vibrio sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* y *Aeromonas sp* (Pérez et al., 2020). Se puede observar su morfología en la figura 8.

Figura 8.

Bacterias del género Streptomyces vistas en microscopía electrónica de barrido.



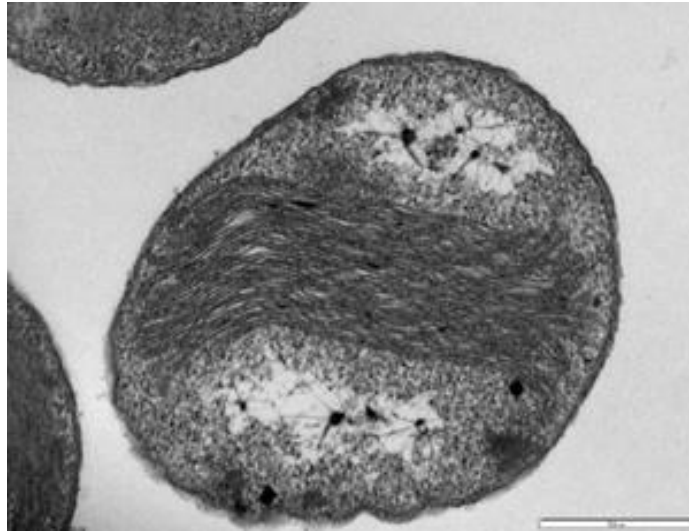
Fuente: Ávalos et al., 2019

6.9.5. Nitrosococcus

Las cepas del género *Nitrosomonas sp.*, *Nitrosococcus sp.* se especializan en procesos oxidativos del nitrógeno amoniacal con la finalidad de obtener nitritos, logrando la disminución del amonio, razón por la que este grupo de bacterias, como se ve en la figura 9 son consideradas de acción nitrificantes, además de ser autótrofas y aerobias. (Muñoz, 2018).

Figura 9.

Micrografía electrónica de transmisión de Nitrosococcus oceani.



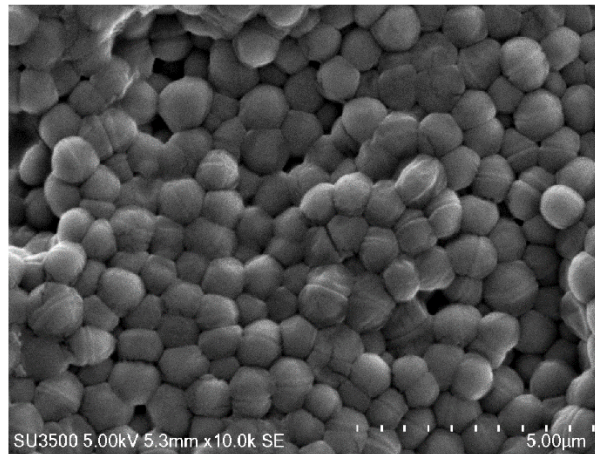
Fuente: Klotz et al., 2006

6.9.6. *Pediococcus*

Esta bacteria ácido láctica se ha establecido con un gran potencial probiótico ya que al ser puesta en tanques de producción ha tenido una respuesta positiva dentro de los animales, no obstante, no todas las cepas de este grupo cuentan con estas capacidades benéficas, por lo que García y colaboradores (2017) sugieren realizar más investigaciones como las que ellos efectuaron, donde evaluaron las capacidades antimicrobianas de *P. pentosaceus* y sus resultados reflejaron ser positivas contra agentes infecciosos patógenos, dando luz verde para su aplicación en la acuicultura, se la visualiza en la figura 10.

Figura 10.

Micrografía electrónica de barrido de la bacteria Pediococcus acidilactici.



Fuente: Herdian et al., 2018

6.10. Cinética de crecimiento bacteriano.

Comprende el estudio de crecimiento de las bacterias, la forma en las que aumentan densidades y su desarrollo en diferentes periodos de tiempo, siendo un proceso que conlleva 4 fases: Latencia, logarítmica o también conocida como crecimiento exponencial, fase estacionaria y muerte celular, las mismas están representadas en la figura 11 (CSA, 2021).

En la primera fase los microorganismos se centran en adaptarse al entorno para poder realizar un crecimiento idóneo, que se ve reflejado en la fase logarítmica, multiplicándose rápidamente al presentar una multiplicación celular acelerada, tras alcanzar su número celular máximo se mantienen en fase estacionario causado por la escasas de nutrientes en el medio o por el exceso de productos de desecho, para llegar finalmente al deterioro de sus células por no contar con los recursos necesarios para que continúen su división (CSA, 2021).

Figura 11

Fases de crecimiento bacteriano.



Fuente: Christian, 2023

6.10.1. Mecanismos de comunicación bacteriana.

La forma utilizada para poder tener una comunicación entre los microorganismos como es el caso de las bacterias se denomina como percepción de quorum (Quorum sensing), que tiene como finalidad producir, liberar e identificar diminutas moléculas conocidas como autoindicadores, posibilitando el conocimiento de la densidad poblacional presente en el entorno, actuando de forma ordenada con el propósito de generar un beneficio en común para la sobrevivencia de las mismas, competencia, colonización o persistir en un área determinada (Vila, 2021)

Ahondando más en el concepto de quorum sensing, hace referencia a una comunicación química mediante la fabricación y localización de antes mencionado autoindicadores que cumplen la función de ser las moléculas señalizadoras. Al tener altas densidades bacterianas se promueve dicha señalización, que es detectada por las bacterias cercanas ya sean del mismo género o no, las mismas que proceden a la activación de determinados genes que conllevan a la realización de variados comportamientos sistematizados. Esto es de vital importancia para las células, puesto que, regulan la

producción de biopelículas, carga vírica, generación de esporas y expresiones genómicas, permitiendo su supervivencia y acoplamiento en entornos variados (Vila, 2021).

6.11. Métodos para la detección de vibrios

Se comienza con la acción de aislar a la bacteria, para ello se debe obtener el tejido o hemolinfa de camarones que muestre sintomatologías de infecciones muy probablemente ocasionadas por vibrios sp., por lo que, mediante la preparación de agar TCBS, agar TSA o agar de sangre, con adición de 0.5 a 3% de ClNa o agar Marino Zobell, logrando identificar a las cepas dañinas a través de análisis bioquímicos y por identificación morfológica de las colonias (Soluap, 2019).

El establecimiento de Vibriosis puede ser afirmado con revisiones al microscopio o con histopatología de los tejidos de los organismos afectados. Las muestras pueden ser de cualquier estadio de la larva del camarón, siempre y cuando se tenga sospecha de la presencia de alguna patología, también se toma en ocasiones a los huevos que no lograron eclosionar, con el fin de realizar un macerado con los mismos y efectuar siembras en los agares antes mencionados.

Las colonias de *V. parahaemolyticus* crecerán en el agar TCBS tras 18-24 horas de haber sido incubadas de 30 a 32°C con un aspecto verde azulado y de un tamaño relativamente pequeño de 1 mm (Soluap, 2019); Mientras tanto, otras especies de *Vibrios*, como *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginus* se verán de color amarillo y con un tamaño que sobrepasa los 3 mm, las cepas que pertenecen a *V. alginolyticus* se reflejan como colonias grandes, un poco brillantes y con leve mucosidad (Soluap, 2019), no obstante, las pruebas bioquímicas son de mucha ayuda para confirmar con seguridad la especie con la que se esté manejando dentro de los agares. También se le pueden sumar otras metodologías, como la aplicación de pruebas de mortalidad, indol, fermentación de los azúcares, test de

catalasa y oxidasa, pruebas del metabolismo respiratorio oxidativo como fermentativo, etc. (Soluap, 2019).

6.12. Técnica tradicional de cultivo en microbiología

El método tradicional es el mencionado por Carrasco (2004), siendo uno de los más popularizados por la fácil forma de realización y por la facilidad al contabilizar las colonias que crecen dentro de él, cuenta con 5 etapas :

- 1.La muestra que se tenga debe ser llevada a diluciones.
- 2.Seleccionar el medio de cultivo idóneo para el desarrollo de los microorganismos.
- 3.Siembra en determinados medios de cultivo, con el fin de seleccionar grupos específicos.
4. Cuantificación.
5. Determinación taxonómica de las bacterias cultivadas.

Es estudio de las cepas se complementa al visualizar su desarrollo mediante siembras en medio líquidos o sólidos, para tener un análisis descriptivo de las características de sus colonias. Aquellos medios poseen compuestos nutritivos, algunos con azúcares y otros inclusive con sangre o extracto de caldo de carne (Pozo., 2005).

6.12.1. Medios de cultivo sólidos

Las bacterias tienen diferentes necesidades nutricionales para poder crecer y desarrollarse en un medio, varias solo necesitan azúcares y otras requieren medios muchos más compuestos para la formación de colonias. Parámetros físicos y químicos como temperatura, pH, presión osmótica, fuentes de carbono, nitrógeno y oxígeno (Pozo, 2005). En ocasiones se implementa indicadores de pH que pueden modificar la carga nutricional

ocasionando que se fermente para generar catabolitos ácidos, también se suelen observar en cultivos cerrados aquellas fermentaciones y la forma en que las bacterias producen gases (Carvana, 2019).

A continuación, se mencionan a varios medios sólidos para el crecimiento bacteriano (Britania, 2021):

Agar Thiosulfato Citrato Sales Biliares (TCBS): Medio direccionado a la observación de *Vibrios*, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias que puedan estar presentes en las muestras con las que se realice la siembra, tales como cepas gram (+), *Pseudomonas*, entre otras, gracias al pH de 8,6 y al 0,5% de NaCl que posee y ayuda a diferenciar *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* por su capacidad de fermentar la sacarosa que tiene el agar (Kobayashi, 2018).

Agar Triptona-Soja (TSA): Es un medio comúnmente utilizado debido al correcto desarrollo y facilidad al momento de aislar una gran variedad microorganismos, puesto que, al tener adicionado sangre posibilita la existencia de especímenes aerobios y anaerobios con un alto grado de exigencia nutricional, permitiendo a la vez observar la presencia de reacciones de hemólisis (Britania, 2021).

Agar Papa y Dextrosa (DEXTROSA): Los hongos y levaduras tienen dentro de este medio de cultivo sus medios predilectos para poder desarrollarse de manera excesiva, por lo que no es un medio selectivo, pero puede llegar a serlo si se los lleva a un pH de 3.5 ± 0.2 al agregarle ácido tartárico tras su esterilización. El crecimiento es lento por lo que suele tardar de 5 a 7 días para la visualización de los microorganismos (Britania, 2021).

Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Es el medio de cultivo idóneo para aislar y cuantificar bacterias del género *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas, debido a que

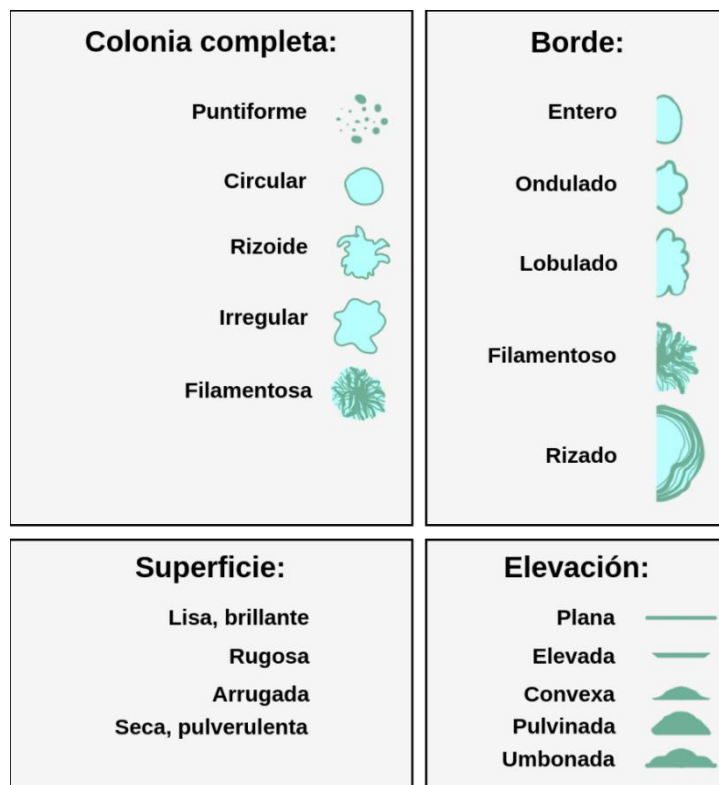
contiene proteosa peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa en sus compuestos nutricionales que contribuyen con nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. En su formulación contiene citrato de amonio que no permite el desarrollo de cepas Gram negativas (Britania, 2021).

6.12.2. Morfología de las colonias

Las colonias están conformadas por más de una célula, por lo que dependiendo del tamaño de la misma dependerá el número de microorganismos que la alberguen, una de las particularidades referente a su crecimiento es la movilidad que posee y la manera en la que se va a presentar dentro de los agares de siembra (Escolar, 2023). Pueden presentar tamaños que van desde los 0.5 mm, con variedad de formas, bordes, superficies y elevaciones como se presenta en la figura 12.

Figura 12.

Morfología de las colonias



Fuente: Labster Theory, 2021.

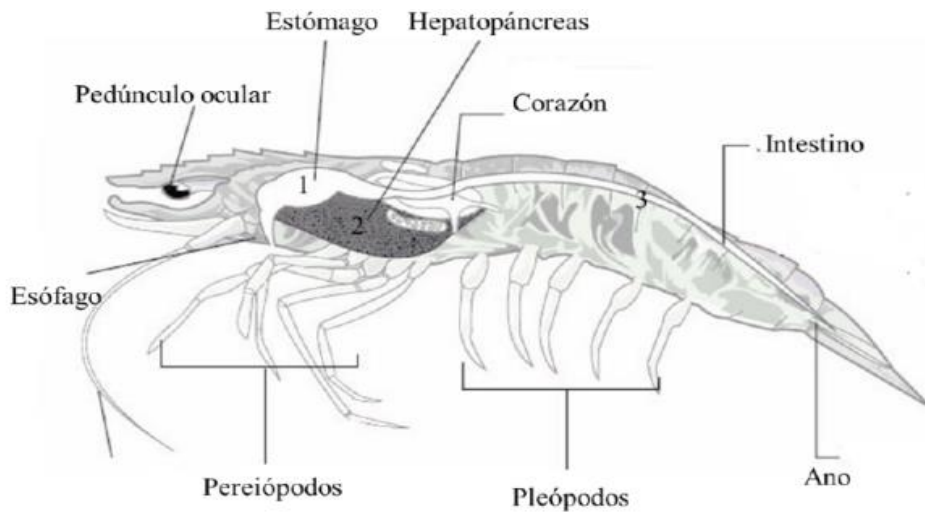
Las consistencias de las colonias pueden ser Mucoide con aspecto acuoso, brillante, en general se ve en cepas que están capsuladas; Aquellas que son lisas se ven homogéneas, con una superficie uniforme y las colonias con una consistencia rugosa se ven granuladas, esto se debe a la escases de proteínas y polisacáridos en la parte superficial (Escolar, 2023).

6.13. Fisiología digestiva de larvas de camarón.

La familia Penaeidae presentan una variedad de nichos ecológicos en los que se encuentran proliferando múltiples comunidades microbicas, que poseen una estrecha relación simbiótica entre el huésped y hospedero. Esta relación simbiótica mutualista facilita importantes procesos metabólicos, siendo responsables en la protección frente a patógenos, en la elaboración de nutrientes, y en el dominio y control de los procesos metabólicos y fisiológicos propias del hospedero (Tremaroli & Backhed, 2012). En el grupo de camarones peneidos, investigaciones recientes han demostrado centenares de bacterias que pertenecen a eslabones taxonómicos relacionados en ecosistemas marinos y terrestres (Rungrassamee, 2014), lo que concluye que, al igual que la mastofauna, la fisiología de los camarones peneidos está estrechamente relacionada a la microbiota ligada al tracto digestivo. Generalmente, el tracto digestivo en camarones peneidos está constituido por: intestino proximal, donde se ubica el estómago y sucede la masticación; el intestino medio, o también llamado hepatopáncreas, donde ocurre la absorción de nutrientes y la secretar enzimas digestivas, y el metabolismo de ciertos compuestos orgánicos; y el intestino distal que consiste en estructuras especializadas ubicadas en la parte dorsal, terminando en el ano, como se muestra en la figura 13 (National Research Council, 2011).

Figura 13.

Morfología de camarón blanco.



Fuente: (Pérez et al., 2020)

6.13.1. Procesos implicados en la colonización bacteriana.

La microbiota asociada a organismos vegetales y animales, son microorganismos indispensables para un óptimo desarrollo (Bordenstein, 2015). Sin embargo, investigaciones basadas en la función y composición de microorganismos en el tracto digestivo, demuestran que las bacterias que asisten en el tracto digestivo estén relacionadas a procesos fisiológicos de gran importancia para el hospedero. Estos procesos son considerados de suma importancia debido a la adición directa de nutrientes y la elaboración de enzimas que participan en la generación de nutrientes (Anghong et al., 2021). Estudios han demostrado que la comunidad bacteriana puede contribuir un papel fundamental en el porcentaje de supervivencia de las larvas a nivel de la evaluación en la calidad y el desarrollo de las larvas de camarón, especialmente en potencializar la inmunidad intestinal. Es probable que esta relación inmunitaria sea capaz de inhibir el antagonismo frente a organismos patógenos. Pero ciertos factores reportados modifican directamente la microbiota en relación al tracto digestivo en camarones peneidos, principalmente el empleo de probióticos y prebióticos (Er-Chao Li et

al., 2018) el tipo de ecosistema o ambiente, la susceptibilidad de estrés responsable de algún patógeno, así como el desarrollo del organismo.

6.13.2. Microbiota intestinal de camarones.

Investigaciones previas han reportado una intensa relación entre la microbiota ubicada en los intestinos de los camarones y el medio externo, lo que hace posible que los microorganismos del medio externo pueden interactuar con la microflora de los animales acuáticos. Estos microorganismos se encargan de transformar los nichos en cantidades considerables de nitrógeno en formas metabólicas, que pueden ser aprovechadas por el hospedero (Estefanía et al., 2020). El hospedero le permite desarrollar múltiples nichos ecológicos que favorece a la colonización de diversas comunidades bacterianas simbióticas, presentando una relación mutualista entre el huésped y hospedero. Esta relación es posible gracias al tracto digestivo, donde los microorganismos interactúan, cataliza y facilita cantidades exponenciales a nivel del metabolismo, capaces de participar en la protección de microorganismos patógenos (Shen, 2023).

6.14. Influencia del tratamiento probiótico en composición del agua de cultivo.

Los probióticos, son considerados como suplementos nutritivos empleados en la dieta del organismo que contienen una comunidad microbiana, contribuyendo a un equilibrio en la microbiota intestinal. Generalmente, los probióticos contienen aditivos acuosos a manera de cepas, ya sean individuales o múltiples, combinadas con prebióticos u otro tipo de inmunoestimulantes que aportan mejoras en la calidad del agua, para potencializar los procesos fisiológicos y reforzando las respuestas inmunes en los animales acuáticos, evitando el empleo de antibióticos y compuestos químicos sintéticos en la acuicultura (Estefanía et al., 2020).

La función principal de las bacterias probióticas usadas en el campo acuícola, tiene como función principal en la actividad antimicrobiana, para así lograr inhibir a las bacterias patógenas de forma competitiva que se presentan en diferentes especies y condiciones ambientales. Los probióticos se encargan, principalmente, de producir ácido láctico que son aprovechados por los animales terrestres o de interés comercial (Lauzon, 2008). Los compuestos antimicrobianos, son previamente sintetizados y excretados a través de las bacterias, y producen metabolitos con mayor potencial para ser usados como biocontroladores de poblaciones patógenas en la acuicultura (Pérez et al., 2020).

6.15. Supervivencia y sanidad larval.

La tasa de supervivencia en los cultivos de camarones, representa uno de los principales indicadores de la eficiencia y el éxito en la producción. El cálculo se trata del porcentaje entre los organismos vivos en un intervalo de tiempo, en relación a la cantidad de organismos sembrados. La nutrición no solo influye en el desarrollo y el crecimiento del animal, también está ligada directamente a la tasa de supervivencia del camarón, es decir, que a calidad de la dieta suministrada reforzara los procesos fisiológicos y las respuestas inmunes de las larvas, frente a agentes patógenos externos o parámetros medioambientales. El valor nutricional no solo es un factor crucial a nivel del desarrollo larval, es un elemento indispensable que producen sustancias biológicas activas, tales como enzimas, anticuerpos y hormonas (Saul, 2022).

6.16. Protocolo de manejo

Dentro de los laboratorios de larvas realizan la aplicación de variados productos para una dieta enriquecida de las larvas, adición de suplementos, vitaminas, bacterias, entre otros,

dentro del protocolo de manejo que se utiliza en la empresa del estudio, podemos mencionar la utilización de los siguientes productos de la tabla 4 y 5.

Tabla 4

Alimentos suministrados en la dieta del protocolo de producción larvaria.

ALIMENTOS			
ZOEA	MYSIS	POST LARVA	
SPIRULINA MICROFINA PRILABSA	ROYAL SEAFOOD 100- 200	SUPER LARVA RACEWAY # 1	LARVAMAX 3.0
	ROYAL CAVIAR 50-100	EPIBAL PL 300; EPIBAL PL 150	ARTEMIA
FRIPPAK FRESH CAR #1	ADVANCE FEED II (250)	ARTEMIA	LARVIVA PL 300 55% 250 - 375 MICRAS
	SUPER LARVA # 1	STARTER 2 zeigler2 600-850	LARVIVA PL 200 55% 150 - 250 MICRAS
ABM 4000 HG 50 MICRAS	SURVIVAL 200	EPILITE M	STAR PLUS
	LANZY ZM	ULTRA BLACK FLAKE HESTIA-G	

Tabla 5

Bacterias, vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos implementados.

BACTERIAS		VITAMINAS, AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS	
EPICIN	HGS-7	ALP SEA	VIUSID
TRATAMIENTO 1	HL-BAC	BIO B COMPLEX	PANCREATIN
TRATAMIENTO 2	AQUASTART BIOMIN POND	NUPROWALL	SHRIMP LYTE- POLLSTRESS (PROKURA)
TRATAMIENTO 3	MELAZA	COMPLEX B FORTE	LIPTOAMINOVIT
HGS-7		NEXT ENHACE	NUFOCID

CAPITULO III

7. METODOLOGÍA

7.1. Tipo de estudio

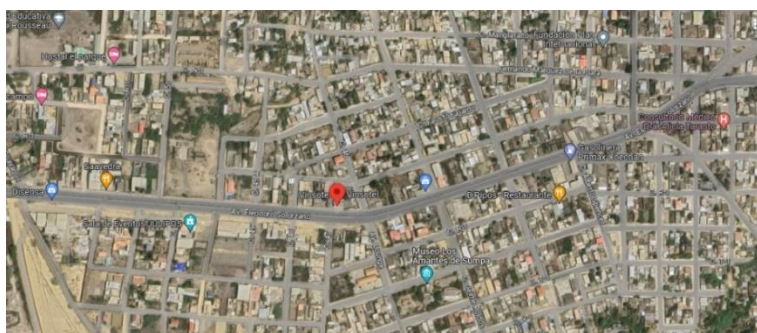
En enfoque de este proyecto fue cuantitativo para la determinación de la cinética de las bacterias, esto generó la obtención de datos para realizar las mezclas de los tratamientos del probiótico de forma mecánica, manteniéndose experimental y correlacional a través de las mediciones comparativas en los tanques utilizados para la aplicación del tratamiento profiláctico. El periodo en el que se llevó a cabo la investigación fue en los meses de verano, siendo efectuado a finales de agosto, septiembre, octubre y comienzos de noviembre.

7.2. Área de estudio

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Empresa Labmarcorsa S.A. de la figura 14, donde se llevó a cabo el establecimiento de la cinética, mezcla de cepas y microbiología; En cuanto a las pruebas en los organismos vivos se desarrolló dentro del laboratorio de larvas MARCOR 1 ubicado próximo a la playa Pacoa de la comuna Monteverde, que pertenece a la empresa antes mencionada y la habilitación de un módulo extra, ubicado en Ballenita del cantón Santa Elena, se aprecia mejor en las figuras 15 y 16. La muestra de las bacterias probióticas con las que se trabajó fue proporcionada por la empresa.

Figura 14.

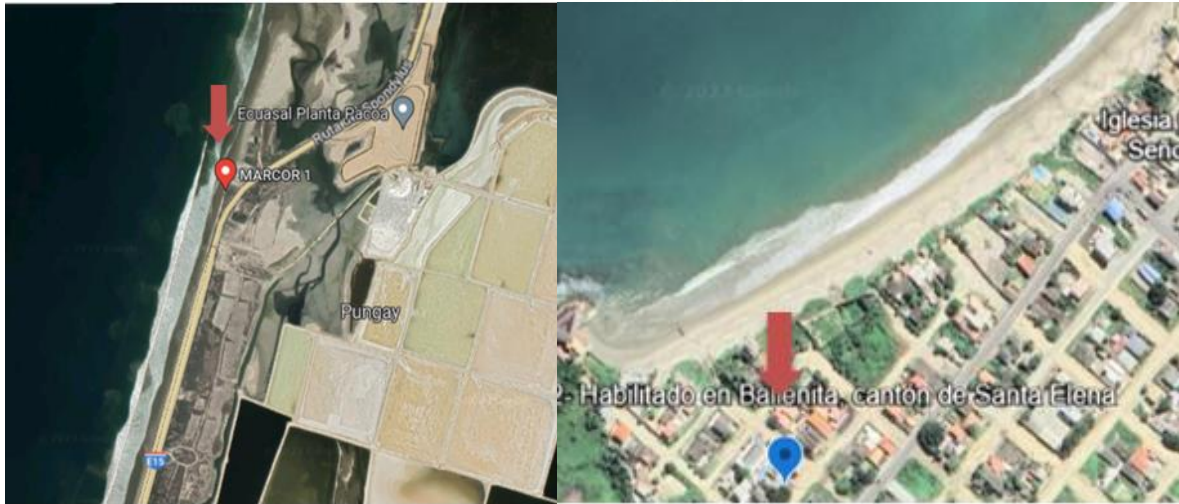
Laboratorio de microbiología, coordenadas 2°13'54.2"S 80°52'09.2"W



Fuente: (Google Maps, 2023)

Figura 15.

Laboratorio MARCOR 1 ubicado en comuna Monteverde, en las cercanías de la Playa Pacoa(derecha); módulo 2 habilitado en Ballenita, cantón Santa Elena (izquierda).



Fuente: (GoogleMaps, 2023)

Figura 16.

Laboratorio DULODER S.A (derecha); extensión Mar bravo (izquierda).



Fuente: (Google earth, 2023)

7.3. Preparación del producto de acuerdo al protocolo de la empresa.

Se utilizaron 3 cepas bacterianas Gram positivas, cuyas actividades de inhibición hacia agentes patógenos se consideraban efectivas dentro del laboratorio (Fernández et al., 2021); Se aplicaron las siguientes técnicas:

Criopreservación

El Stock se encontró en tubos eppendorf con caldo de Lisogenia (LB) más glicerol al 10% en congelación a -20 °C dentro del área de microbiología (Lea et al., 2018).

Activación bacteriana

De manera individual se realizó la técnica de siembra por agotamiento, utilizando Agar Tríptico de Soya (TSA) con el asa metálica, posterior se llevaron a incubación por 24 horas a 32°C (Guzmán et al., 2016).

Resiembra en tubos

Se tomó a una colonia aislada de las cepas ya incubadas y se realizó nuevamente una siembra individual en tubos de ensayo con caldo LB que se incubó 8 horas a 32°C (María & José, 2003).

Resiembra en matraz

En cada matraz con 100 ml de caldo LB de se sembró con la micropipeta 1000 ul provenientes de la resiembra en tubos. Se colocó dentro de la incubadora un lapso de 12 horas a 32°C (Sarmiento, 2014).

Siembra en placas

Se utilizó cajas Petri de vidrio de 15 mm con agar TSA, aplicando la técnica de siembra en superficie se inoculó con la ayuda de la pipeta 4 ml de la resiembra de cada matraz de forma individual en cada placa, se direccionaron a incubación un periodo de 48 horas a 32°C (Cristiano, 2012).

Cosecha y Cultivo

Con el asa de Drigalsky y agua estéril se extrajo la capa de colonias crecidas en incubación y se depositaron 5 cajas Petri por cada envase de 1000 ml (Boggini, 2022). Siguiendo los descrito por la empresa, se procedió a mezcla las cepas representadas en la tabla 6 (Mieles, 2020).

Tabla 6.

Porcentajes establecidos por la empresa para la obtención de cada tratamiento

PROBIÓTICO	CEPA A	CEPA B	CEPA C	Total
Tratamiento 1	63,80%	12,10%	24,10%	100,00%
Tratamiento 2	19,10%	37,20%	43,70%	100,00%
Tratamiento 3	11,50%	82,60%	5,90%	100,00%

Fuente: Mieles,2020

Preservación

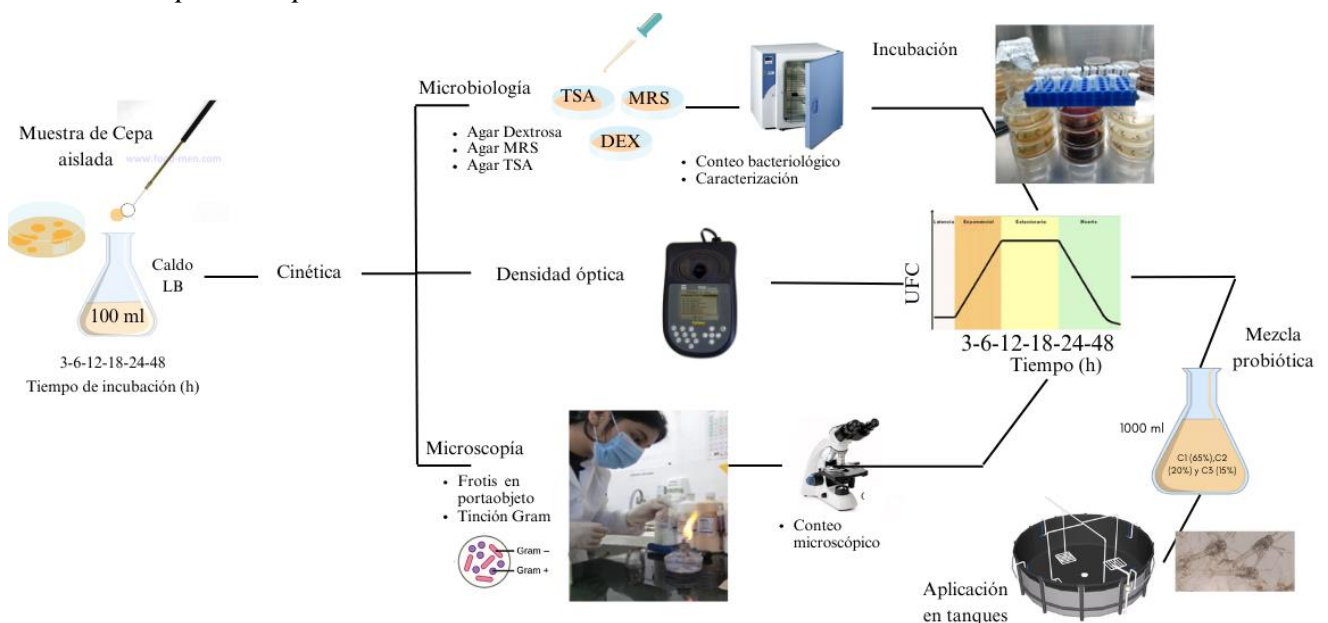
Se mantuvieron en refrigeración a 4 ° C hasta su aplicación, con una durabilidad de 15 días posterior a la técnica de cultivo mixto (Guillaume, 2022).

7.4. Cinética bacteriana en diferentes lotes de cultivo.

Se recibió por parte de la empresa las placas Petri con las colonias aisladas correspondientes a las cepas probióticas utilizadas (A, B y C) y se realizaron 3 lotes de siembra, cada uno propio de cada cepa (Vera,2021). Se procedió como se muestra en la figura 17.

Figura 17.

Métodos aplicados para la determinación de la cinética bacteriana.



7.4.1. Cultivos discontinuos o por lotes

Se tomó una colonia con el asa metálica que fue sembrada utilizando la técnica de cultivo por lotes (Palomino, 2022) dentro de matraces con caldo LB, cuyas cargas bacterianas se revisaron en lapsos de 3, 6, 12, 18, 24 y 48 horas.

7.5. Análisis microbiológico

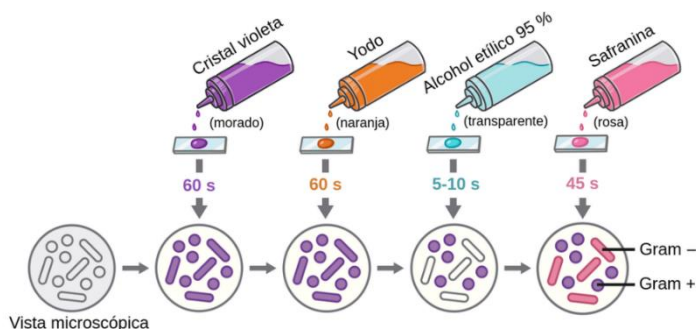
Se realizó diluciones seriadas en todas las revisiones y se contabilizó las UFC/ml en 3 agares diferentes: TSA (Agar Triptona-Soja), MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) y DEX (Dextrosa de papa), las placas previamente fueron incubadas durante 24 horas a 32°C para TSA, 35 °C para MRS y 72 horas a 27 °C para MRS (Boggini, 2022). También se procedió a su caracterización a través de la morfología de las colonias de la guía de Vargas y Kuno (2014).

7.6. Análisis microscópico

Se realizó la técnica de Tinción Gram tradicional (Cercenado, 2013) como se ve representada en la figura 18 para la visualización de las bacterias, utilizando el objetivo 100X con una gota de glicerol para su correcta apreciación, se las cuantificó con la ayuda de la aplicación denominada “calculadora celular” aplicando el método de recuento de células en la cámara de Neubauer durante los periodos de revisión ().

Figura 18.

Pasos para la tinción gram tradicional.



Fuente: (LabsterTheory, 2021)

7.7. Densidad óptica

Para establecer la Densidad óptica (DO), se siguió los pasos indicados por Domínguez con algunas modificaciones (2020), que se basa en la metodología de Clements & Col (1972):

Las muestras correspondieron a cada lapso de tiempo, fueron colocadas en las cubetas del fotómetro, seleccionando la opción absorbancia con el factor x1, colocando 5 ml de la muestra y 5 ml del blanco, que en este caso fue agua destilada esterilizada. Primero se colocó el blanco y luego se registraron los datos en el rango de 450 nm.

Para establecer el número de células presentes en cada revisión se utilizó una cepa ya conocida en el mercado, denominada Enterogermina, que en 5 ml posee 2 billones de bacterias del género *Bacillus*, con lo que se facilitó la relación del número de bacterias por revisión. Finalmente, ya teniendo los datos celulares, se comprende que 1 DO indica la presencia de 1900000000 células, por lo que, se las relaciona mediante regla de tres y se obtiene la DO de cada revisión.

7.8. Mezcla probiótica

Las cargas bacterianas presentes en cada envase de bacterias también fueron determinadas tomando como cepa control al *Bacillus clausii* de la Enterogermina, por lo que, para la obtención de los tratamientos se llevó a cabo la mezcla de los mismos y se obtuvieron botellas de 1 litro con las diferentes proporciones que se indican en la Tabla 6 (Mieles, 2020).

7.9. Desafío *in vitro* con patógenos

Se realizaron análisis de laboratorio con agentes patógenos que suelen afectar en gran medida a los laboratorios de producción larvaria, donde se puso a prueba a cada cepa con especies de *V. Harvey*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Pseudomonas* y *Pseudomona fluorescens*; Esto me permitió medir los halos de inhibición que se generaron en el laboratorio DULODER S.A. (Gutiérrez, 2003).

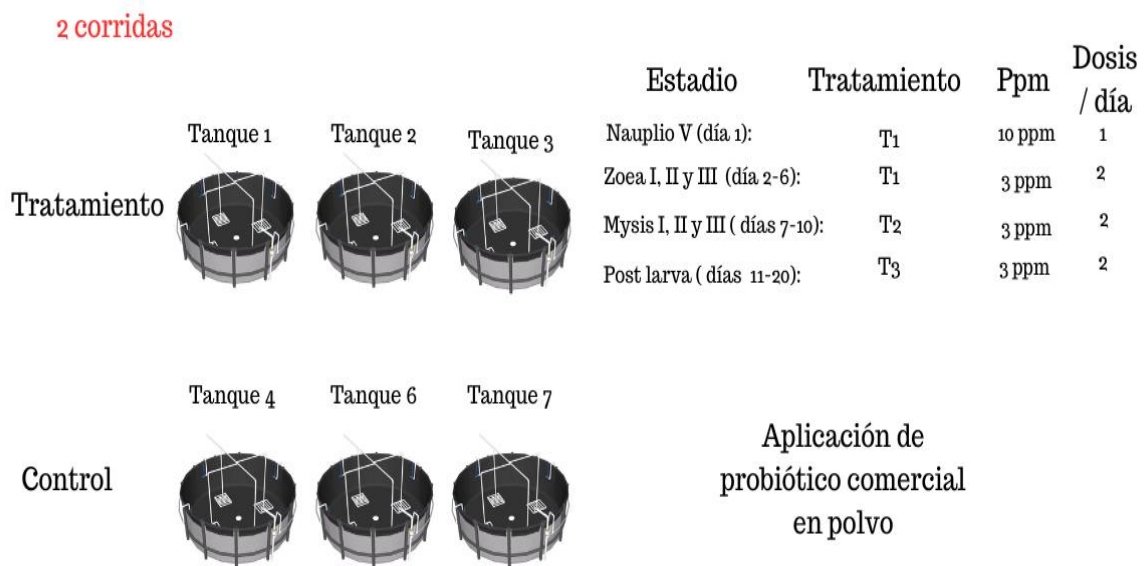
7.10. Aplicación en tanques de producción

Para la realización de los diferentes ensayos de concentraciones de producto bacteriano se utilizaron 6 tanques de 17 toneladas con revestimiento de liner, los tanques tuvieron densidades de siembra 220000 organismos por tonelada. El coctel probiótico fue adicionado dos veces al día en periodos de 12 horas a excepción de la fase Nauplio que fue una sola aplicación (Villacís, 2023).

Las dos primeras corridas fueron realizadas comparando la mezcla probiótica con las dosis que el laboratorio sugiere y como grupo control se usó un producto del mercado en su reemplazo, se visualiza en la figura 19.

Figura 19.

Mezcla probiótica (Tratamiento) y Probiótico comercial (control).









Para la última corrida se tuvieron las mismas densidades de siembra en los 6 tanques, con 220000 organismos por tonelada. Al tener antecedentes de resultados positivos y constatar que su eficacia es igual o mejor que un producto comercial con las dos corridas realizadas, se procedió al aumento de una dosis para analizar la carga bacteriana de agentes patógenos infecciosos de la cosecha, el aumento de la dosis se ve reflejado en la figura 20.

Figura 20.

Aumento de la dosis (Tratamiento) y dosificación normal (control)

1 corrida

			Estadio	Tratamiento	Ppm	Dosis / día
Tratamiento	Tanque 1	Tanque 2	Nauplio V (día 1):	T1	10 ppm	2
			Zoea I, II y III (día 2-6):	T1	3 ppm	3
			Mysis I, II y III (días 7-10):	T2	3 ppm	3
			Post larva (días 11-20):	T3	3 ppm	3
Control	Tanque 4	Tanque 6	Estadio	Tratamiento	Ppm	Dosis / día
			Nauplio V (día 1):	T1	10 ppm	1
			Zoea I, II y III (día 2-6):	T1	3 ppm	2
			Mysis I, II y III (días 7-10):	T2	3 ppm	2
		Post larva (días 11-20):	T3	3 ppm	2	

7.11. Detección de patógenos

Se utilizó el agar selectivo para *Vibrios* TCBS como parte del método de identificación de colonias, ya que en él se pudo cuantificar colonias amarillas y verdes, hallando de 30 a 300 colonias por placa (Pavone, 2020).

Las siembras en el agar TCBS fueron realizadas con la técnica de siembras por esparcimiento, donde fue aplicado 100 ul de las diluciones seriadas provenientes del macerado de 1 gramo de larva, analizando los grados de severidad en cuanto a las UFC registradas, como se visualiza en la tabla 7 (Muñoz, 2022).

Tabla 7.

Grados de severidad de UFC en larvas y postlarvas de camarón

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

Fuente: Muñoz, 2022

7.12. Probiosis en base a la supervivencia

Mediante la metodología de la Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos (2014) se aplica la observación directa o análisis en fresco, donde se procede a la revisión de los organismos al final de los ciclos de producción para evaluar el estado de salud que presenten, se ve en la tabla 8; A la vez, se realiza la técnica de conteo volumétrico (Morla, 2010) que se basa en un muestreo para determinar la densidad de animales, calculando la población al multiplicar esta densidad por el volumen total del tanque, obteniendo las cifras de supervivencia.

Tabla 8.

Formato para realizar patología en fresco de la guía técnica de patología e inmunología de camarones Penaeidos.

Fecha: _____			
Procedencia: _____			
Especie: _____			
No. Estanque: _____		Tamaño de la muestra: _____	
No. de muertos: _____		No. de examinados: _____	
Estado de vida: _____		Peso promedio: _____	Tamaño promedio: _____
Características externas	Observaciones	Características internas	Observaciones
Actividad de los camarones		Hepatopáncreas	
Coloración del organismo		Tamaño	
Contenido del intestino		Coloración	
Presencia de heces en forma de cadena o discontinua		Presencia de los virus BP y MBV	
Presencia de epicomensales, bacterias y hongos en la cutícula del camarón		Deformación de los túbulos	
Características de la cutícula		Nódulos hemocíticos y/o Encapsulación de hemocitos	
Melanización (color café claro).		Presencia de cúmulos de bacterias	
Deformidades en el rostrum, antenas abdomen, telson, uropódos y pleópodos		Túbulos melanizados y/o necróticos	
Coloración anormal de los apéndices		Cantidad de lípidos	
Apéndices rotos		Intestino	
Branquias		Presencia endoparásitos	
Coloración		Presencia de cianobacterias	
Presencia de ectoparásitos		Cuerpos de oclusión de BP	
Nódulos hemocíticos en las lámelas branquiales		Músculo	
Micosis (hifas, conidios)		Textura	
Melanización		Color	
Necrosis		Microsporidios	
		Síndrome del acalambamiento	

Fuente: Morales & Cuellar, 2014

CAPITULO IV

8. RESULTADOS

8.1. Determinación de la cinética bacteriana

Para el establecimiento de la cinética se tomó a consideración las revisiones mediante fotometría, microbiología y microscopía, como se detalla a continuación:

8.1.1. Densidad óptica

Para el establecimiento de la cinética se realizó la siembra de 3 lotes, cada uno correspondiente a las bacterias que conforman el probiótico que utiliza la empresa, donde se pudo evidenciar lo reflejado en la tabla 9.

Tabla 9.

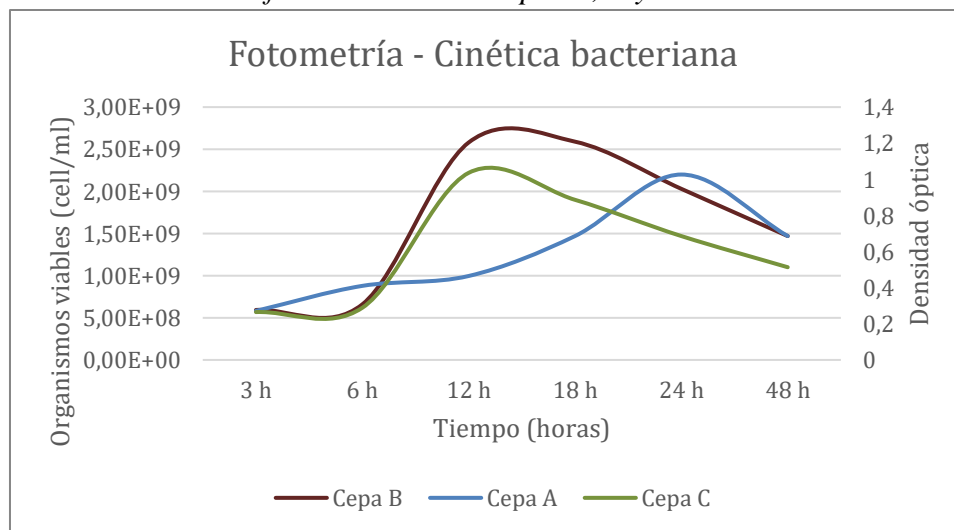
Datos de densidad óptica y organismos viables/ml en cada revisión.

CEPA	Revisiones	Organismos viables(UFC/ml)	Densidad Óptica
A	3 h	5,82E+08	0,31
	6 h	8,79E+08	0,46
	12 h	9,96E+08	0,52
	18 h	1,47E+09	0,77
	24 h	2,20E+09	1,16
	48 h	1,47E+09	0,77
B	3 h	5,93E+08	0,31
	6 h	6,59E+08	0,35
	12 h	2,58E+09	1,36
	18 h	2,59E+09	1,36
	24 h	2,03E+09	1,07
	48 h	1,47E+09	0,77
C	3 h	5,68E+08	0,3
	6 h	6,19E+08	0,33
	12 h	2,22E+09	1,17
	18 h	1,90E+09	1
	24 h	1,47E+09	0,77
	48 h	1,10E+09	0,58

La cepa B tuvo un desarrollo acelerado, muy similar a la cepa C, esto se vio reflejado al notar que en ambas su crecimiento exponencial comenzó a las 6 horas, el mismo que continuó hasta llegar a las 12 horas donde se mantuvieron 3 horas en fase estacionaria con $2,58E+09$ y $2,22E+09$ cell/ ml, para posterior empezar con la muerte celular, por el contrario, la cepa A tuvo un crecimiento lento, por lo que, mediante los datos recolectados se demostró que a las 24 horas llegó al máximo en su escala de crecimiento, mantuvo el mismo lapso de tiempo en fase estacionaria con $2,20E+09$ cell/ml para finalmente direccionarse al deceso de sus células, tal como se observa en la figura 21 .

Figura 21.

Cinética individual mediante fotometría de las cepas A, B y C.



8.1.2. Siembras microbiológicas

Se presentó crecimiento únicamente en el medio de siembra TSA, visualizando un incremento constante en el número de UFC/ml con el transcurso de las horas, donde las cepas B y C poseen una cuantificación máxima similar al presentar $7,00E+07$ (B) y $5,10E+07$ (C) en el transcurso de las 12 a las 18 horas; La cepa A llega a su valor más alto con $5,50E+07$ UFC/ ml en la revisión 4 que corresponde a las 24 horas reflejado en la figura 22, en el

conteo de la revisión 5 se evidencia la muerte celular ya que tuvieron que ser sembradas a una dilución menor para poder llevar a cabo su contabilización como se ve en la tabla 10.

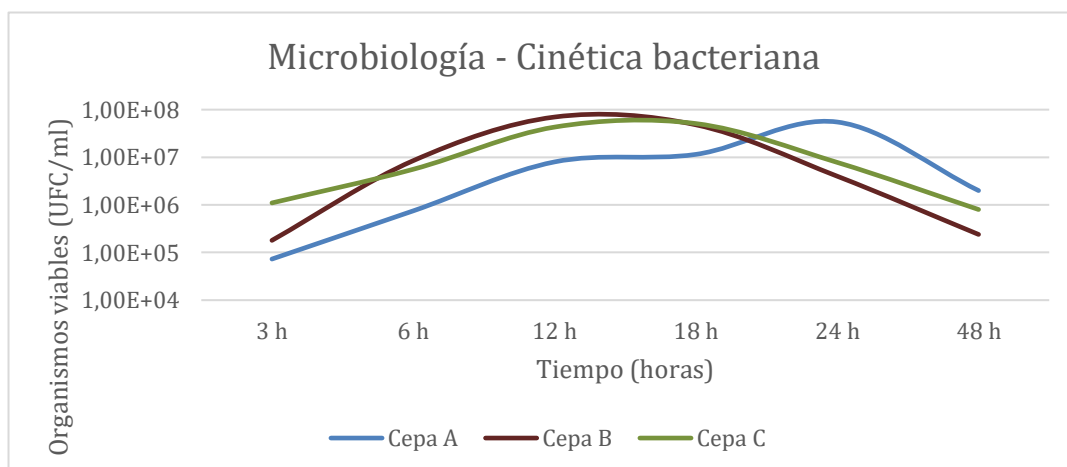
Tabla 10.

Diluciones de las siembras de cepas realizadas en los diferentes periodos de tiempo con su respectiva contabilización de UFC.

Revisiones		0		1		2		3		4		5	
Tiempo		3 h		6 h		12 h		18 h		24 h		48 h	
		Dilución	UFC	Dilución	UFC	Dilución	UFC	Dilución	UFC	Dilución	UFC	Dilución	UFC
CEPAS	A	-2	73	-3	75	-4	80	-4	115	-5	55	-4	20
	B	-3	18	-4	85	-5	70	-5	48	-4	40	-3	24
	C	-3	110	-4	56	-5	51	-5	51	-4	78	-3	80

Figura 22.

Cinética individual obtenida en las siembras microbiológicas de las cepas A, B y C.



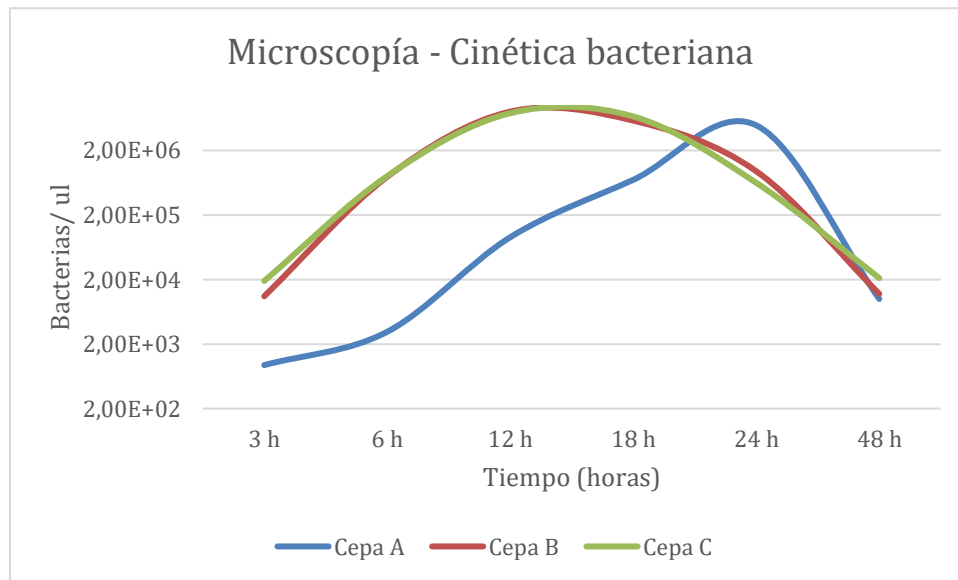
8.1.3. Revisiones microscópicas:

Mediante las tinciones realizadas se validó que las 3 cepas pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas, visualizándose de color violeta en las revisiones de las placas, las mismas que fueron contabilizadas, siendo los valores máximos 8,00E+06 y 7,56E+06 de

bacterias/ul correspondientes a las cepas B y C en la revisión de la hora 12, cuyas cifras se acercaron mucho; mientras tanto, para la cepa A se determinó que llega a la cúspide en cuanto a su densidad celular a las 24 horas con un total de $4,90E+06$ bacterias/ul, se ve representado en la figura 23.

Figura 23.

Cinética individual obtenida en las siembras microbiológicas de las cepas A, B y C.



8.2. Carga bacteriana por envase

Las cantidades de bacterias que se presentaron en cada envase se reflejó en los resultados de la fotometría, cuyos datos fueron analizados tomando a la cepa de *Bacillus clausi* para determinar la cantidad de células por ml, donde se pudo establecer qué, los envases de 1 litro, abordan en su interior lo siguiente: Cepa A con $4,00E+11$ UFC/ml, Cepa B con $6,96E+11$ UFC/ml y Cepa C con $5,57E+11$ UFC/ml, se ve representado en la tabla 11.

Tabla 11.

Cuantificación de cargas bacterianas presentes en diferentes volúmenes.

<i>Cepas</i>	<i>Fotómetro</i>	<i>Cantidad de bacterias (UFC /ml)</i>		
	YSI (450nm)	5 ml	100 ml	1000 ml
CONTROL	2,18	2,00E+09	4,00E+10	4,00E+11
A	3,80	3,48E+09	6,96E+10	6,96E+11
B	3,17	2,91E+09	5,81E+10	5,81E+11
C	3,04	2,79E+09	5,57E+10	5,57E+11

8.3. Carga bacteriana para cada tratamiento

De acuerdo a los porcentajes de cepa establecidos en por la institución para cada tratamiento, se calculó la cantidad de bacterias totales los mismos, por lo que, se puede indicar que en el tratamiento 1 (T1) se hallaron 6,49E+11 cell/L; mientras en el tratamiento 2 (T2) y 3 (T3) a pesar de encontrarse en diferentes cantidades porcentuales, las cargas bacterianas finales coinciden al tener 5,93E+11 Cell/L, se ve representado en la tabla 12.

Tabla 12.

Cuantificación de cargas bacterianas presentes en cada envase de los tratamientos.

Probiótico	Cepa A	Cepa b	Cepa c	Total
T1	4,44E+11	7,03E+10	1,34E+11	6,49E+11
T2	1,33E+11	2,16E+11	2,43E+11	5,93E+11
T3	8,00E+10	4,80E+11	3,29E+10	5,93E+11

8.4. Caracterización

Durante las revisiones microbiológicas y microscópicas se pudo asignar características a las bacterias tomando en consideración las guías descritas en la metodología, se consideran de un tamaño

pequeño al medir 1 mm, medianas con 2 mm y grandes al sobrepasar los 3 mm, los resultados se ven expresados en la tabla 13.

Tabla 13.

Caracterización de la morfología de las colonias.

8.5. Medición de halos de inhibición

Características	Cepas		
	A	B	C
Tamaño	Grande	Mediana	Pequeña
Forma	Circular	Circular	Circular
Borde	Entero	Rizado	Entero
Transparencia	Opaca	Traslúcida	Opaca
Brillo	Sin brillo	Brillante	Sin brillo
Color	Blanco Hueso	No pigmenta	Blanco
Textura	Rugosa	Lisa	Rugosa
Elevación	Plana	Plana	Umbonada
Consistencia	Suave	Mucoide	Suave

El desafío *in vitro* fue llevado a cabo con las 3 cepas de forma individual, la respuesta de los agentes patógenos generalmente encontrados en tanques de producción, como lo son *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *Pseudomona sp.* Y *P. fluorescens* fueron tomados en consideración para la presente prueba, se ve en la tabla 14.

Tabla 14.

Medición de halos de inhibición de las cepas de forma individual.

<i>Cepas</i>	<i>Desafío in vitro</i>	<i>Halos de inhibición (mm)</i>
--------------	-------------------------	---------------------------------

A



V. parahaemolyticus: 20 mm

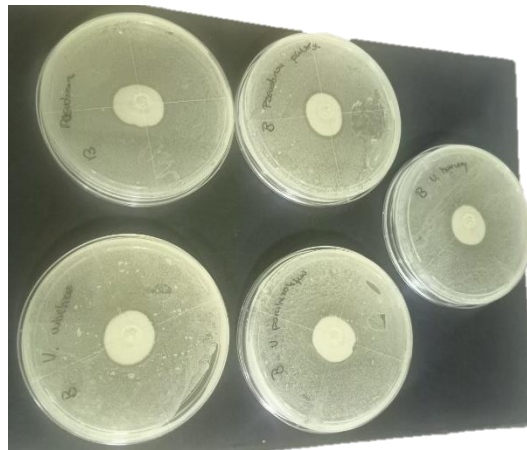
V. harveyi: 24 mm

V. vulnificus: 26 mm

Pseudomonas sp: 22 mm

P. fluorescens: 20 mm

B



V. parahaemolyticus: 10 mm

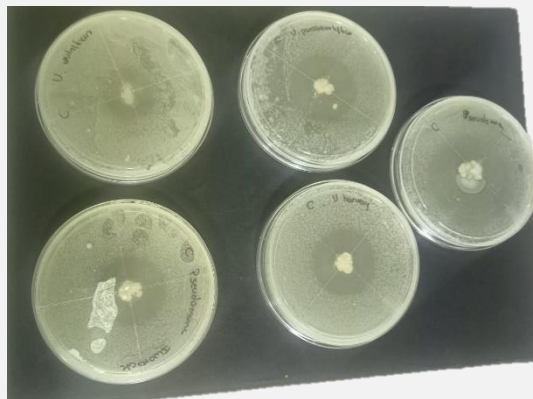
V. harveyi: 8 mm

V. vulnificus: 8 mm

Pseudomonas sp: 4 mm

P. fluorescens: 4 mm

C



V. parahaemolyticus: 30 mm

V. harveyi: 26 mm

V. vulnificus: 22 mm

Pseudomonas sp: 28 mm

P. fluorescens: 20 mm

8.6. Conteo bacteriológico

Para el registro de datos y generación de gráficas se utilizó la herramienta digital Excel, donde se tabuló cada una de las 42 muestras que fueron tomadas dentro del estudio, estas corresponden a los 3 meses destinados al desarrollo de la parte experimental del proyecto. La siembra fue realizada en agar TCBS para la identificación de colonias amarillas y verdes. A continuación, se detalla mejor en los siguientes puntos:

8.6.1. Mezcla probiótica y producto del mercado

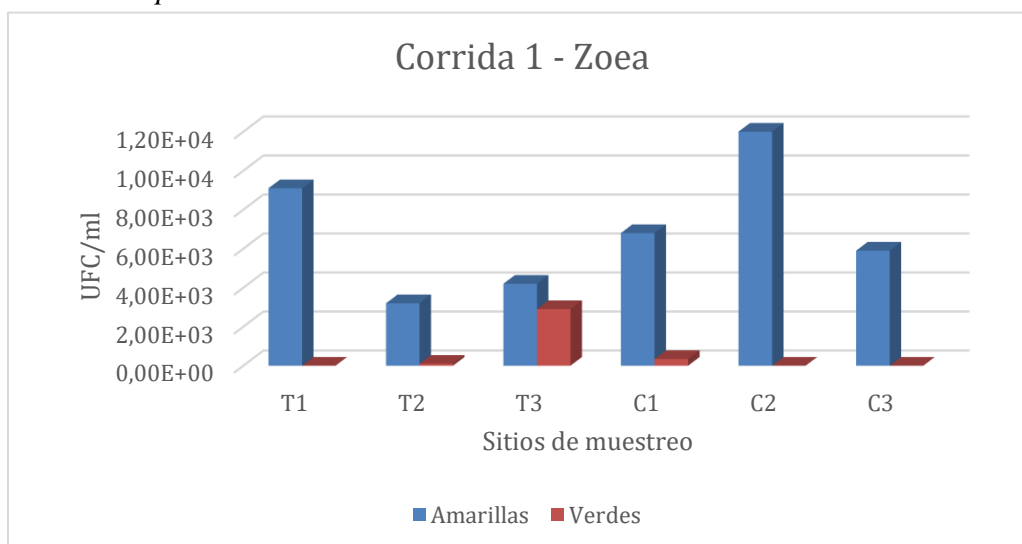
Se procedió a la validación del control de patógenos durante el ciclo de producción mediante la comparación de carga bacteriana en las dos primeras corridas, comparando la eficacia del tratamiento profiláctico (T) con un producto generalmente comercializado en el mercado al que se le denominó control (C).

Corrida 1 y 2: Estadio Zoea

En el grupo tratamiento se obtuvo una carga promedio de $5,50E+03$ de colonias amarillas y $1,00E+03$ colonias verdes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $8,23E+03$ amarillas y $1,13E+02$ verdes, se observa en la figura 24.

Figura 24.

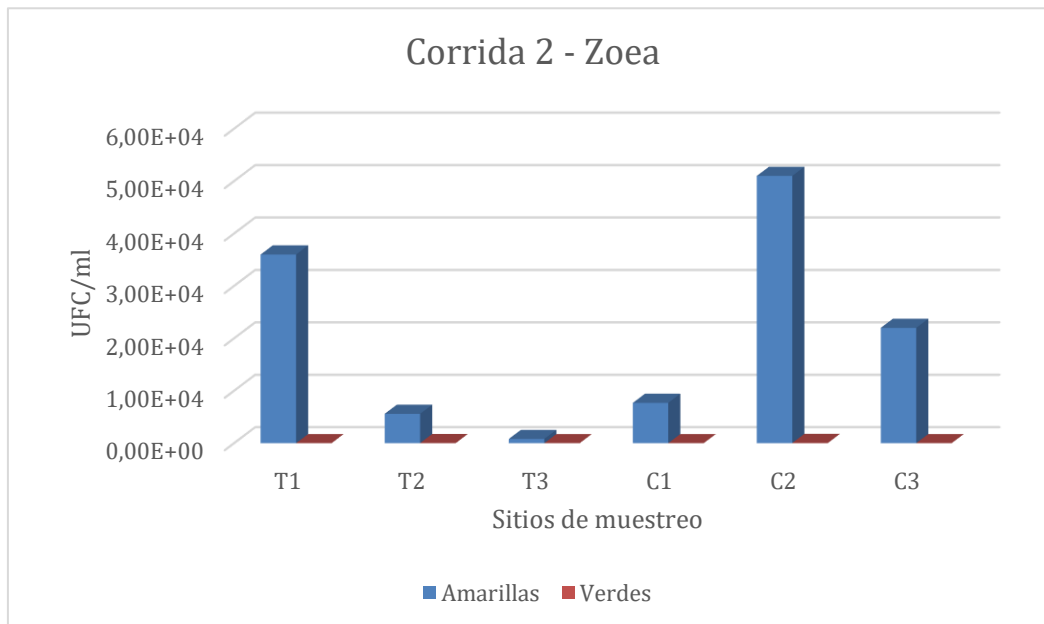
Carga bacteriana presente en la corrida 1 del estadio Zoea.



Para el estadio Zoea de la corrida 2, representado en la figura 25, se obtuvo en el grupo con el tratamiento una carga promedio de $1,41E+04$ de colonias amarillas y $1,41E+04$ colonias verdes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $2,69E+04$ amarillas y $1,00E+01$.

Figura 25.

Carga bacteriana presente en la corrida 2 del estadio Zoea.

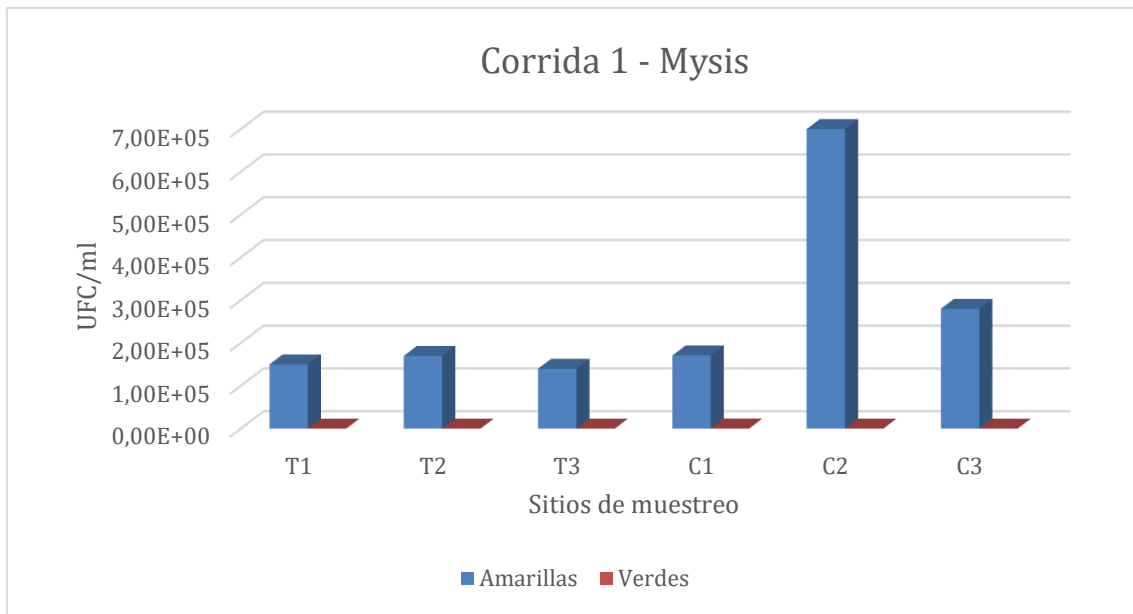


Corrida 1 y 2: Estadio Mysis

Para la corrida 1 en el grupo tratamiento se obtuvo una carga promedio de $1,53E+05$ de colonias amarillas y $3,33E+01$ colonias verdes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $3,84E+05$ amarillas y $7,33E+01$ verdes, representado en la figura 26.

Figura 26.

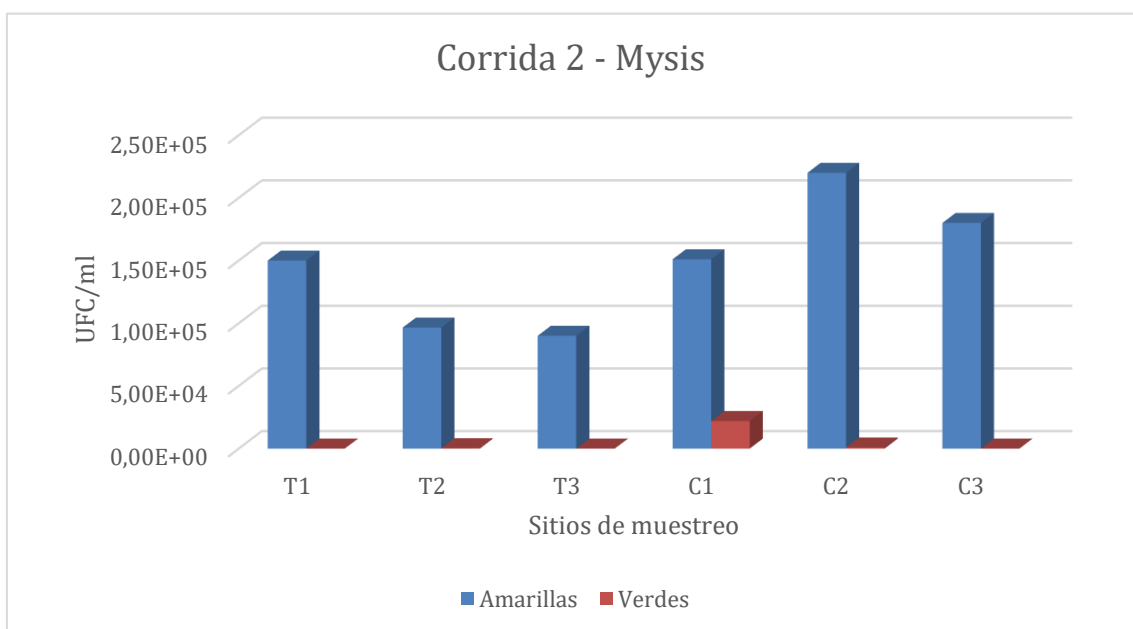
Carga bacteriana presente en la corrida 1 del estadio Mysis.



Para la corrida 2 en el grupo tratamiento se obtuvo una carga promedio de $1,12E+05$ de colonias amarillas y $1,03E+02$ colonias verdes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $1,84E+05$ amarillas y $7,63E+03$ verdes, representa en la figura 27.

Figura 27.

Carga bacteriana presente en la corrida 2 del estadio Mysis.

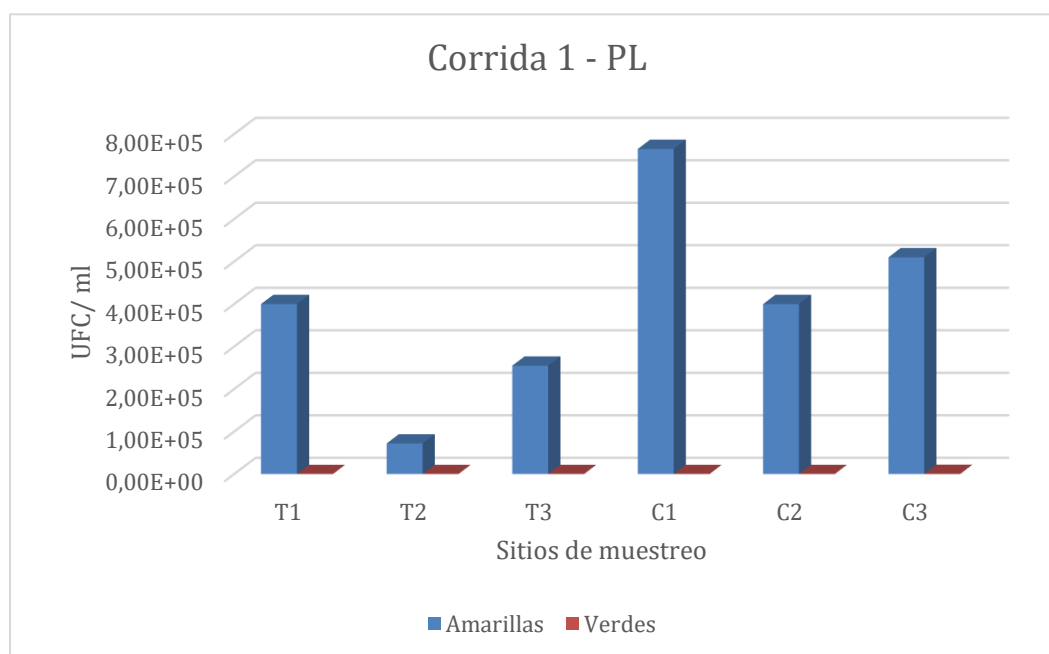


Corrida 1 y 2: Estadio PL

En el grupo tratamiento se obtuvo una carga promedio de $2,42E+05$ de colonias amarillas y $0,00E+00$ colonias verdes al no hacerse presentes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $5,58E+05$ amarillas y $4,00E+01$ verdes, representa en la figura 28.

Figura 28.

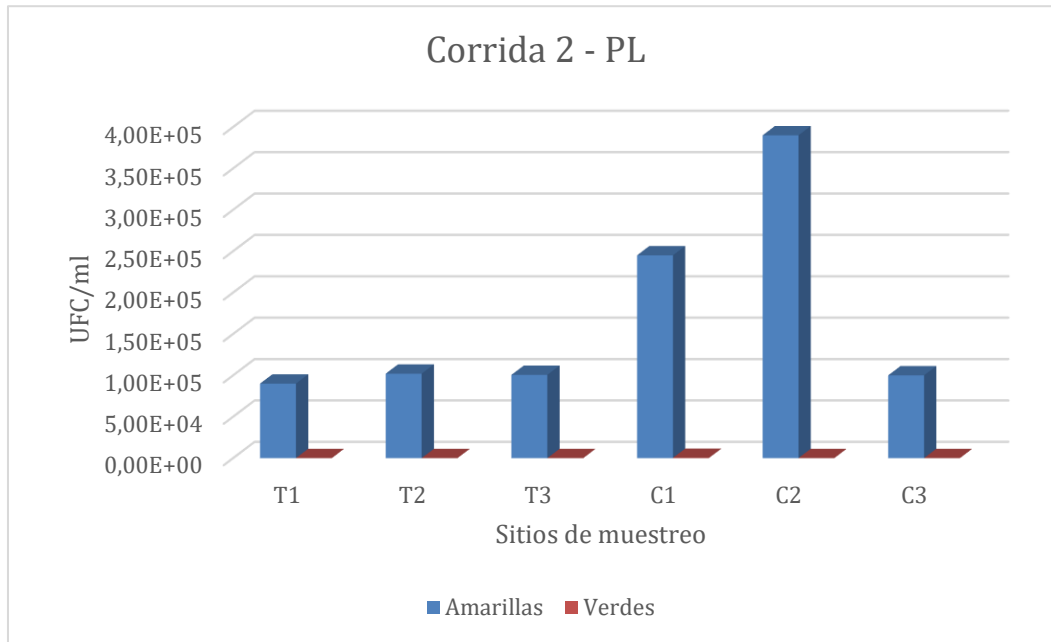
Carga bacteriana presente en la corrida 1 del estadio PL.



Para el estadio PL de la corrida 2 , se obtuvo en el grupo con el tratamiento una carga promedio de $9,75E+04$ de colonias amarillas y $0,00E+00$ colonias verdes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $2,45E+05$ amarillas y $1,00E+02$ verdes, representada en la figura 29.

Figura 29.

Carga bacteriana presente en la corrida 2 del estadio PL.



8.6.2. Dosificación

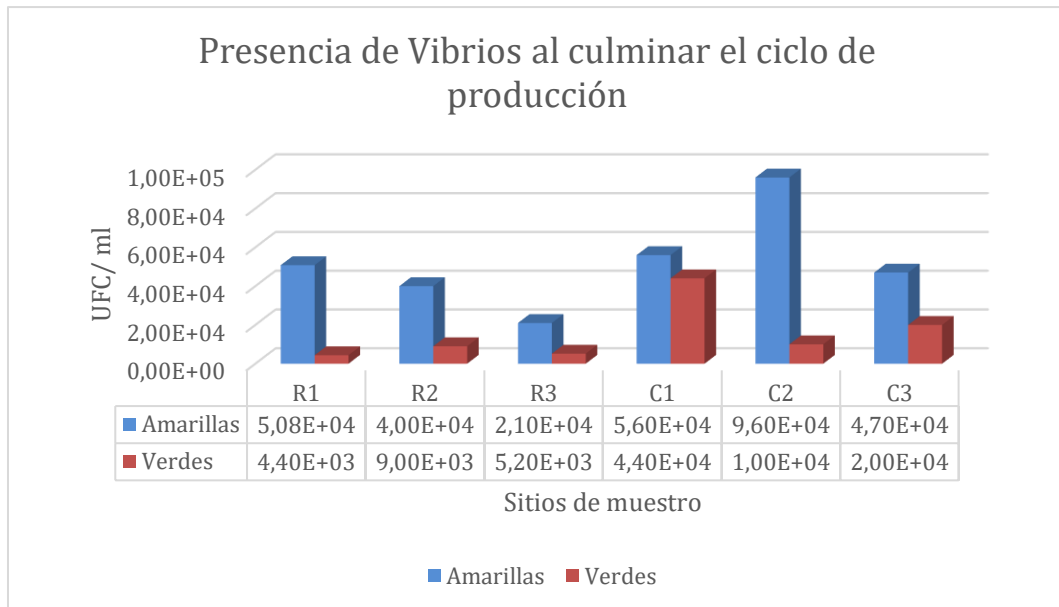
Al tener presente su eficacia frente a agentes patógenos, se procedió al aumento de una dosis (R) para evaluar la carga bacteriana tomando como grupo control la dosificación normal (C) que se presentó al final de la cosecha y el resultado fue el siguiente:

Corrida 3: Cosecha de postlarvas

Para el estadio PL de la corrida 3 representada en la figura 30, se obtuvo en el grupo de las réplicas que contienen una dosificación más con una carga promedio de $3,73E+04$ de colonias amarillas y $6,20E+03$ colonias verdes; en el control se alcanzó una media en las colonias de $6,63E+04$ amarillas y $2,47E+04$ verdes. La aplicación de una dosificación más de la normal reflejó un leve aumento en el control de Vibrios amarillos y la reducción de un exponente en cuanto a los Vibrios verdes.

Figura 30.

Carga bacteriana presente en la cosecha de la corrida 3 del estadio PL.



8.7. Patología en fresco

En el estadio de zoea, del total de muestras de los 6 tanques con los tratamientos se encontró que un 10,03% de las larvas denotaron anomalías visualizadas de forma microscópica a nivel branquial; Mientras en el tanque control, con el mismo número de muestras se obtuvo un 16,2% de anomalías en branquias.

En el estadio de Mysis del total de muestras de los 6 tanques con los tratamientos se encontró que un 21,01% de las larvas denotaron anomalías en parte del tracto intestinal; Mientras en el tanque control, con el mismo número de muestras se obtuvo un 25,04% en la misma sección morfológica de los individuos.

En el estadio de Postlarva del total de muestras de los 12 tanques con la aplicación del coctel probiótico, se encontró que un 7,62% de las larvas presentaron anomalías.

8.8. Análisis estadístico

Para la tabulación de los datos y generación de gráficos se utilizó el programa GraphPad, analizando la media que se presentó en cuanto a la carga bacteriana registrada en las siembras microbiológicas. En todas las identificaciones los grados del intervalo de confianza corresponden al 95%.

8.8.1. Media de colonias amarillas y verdes en estadio zoea para la corrida 1 y 2

Se agrupa los datos de las corridas 1 y 2 en la tabla 15, tomando en cuenta los tanques con la aplicación del tratamiento sirvieron para la obtención del valor de una media con $9,81E+03$ para colonias amarillas con una desviación estándar de 13119 y referente a colonias verdes la media generada fue de $7.56E+03$ con una desviación estándar de 14092; Para los tanques control de ambas corridas se obtuvo una media de $1.75E+04$ para colonias amarillas con una desviación estándar de 17423 y correspondiente a colonias verdes la media formada fue de $6.1E+01$ con una desviación estándar de 137.

Tabla 15.

Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 1 y 2 del estadio Zoea.

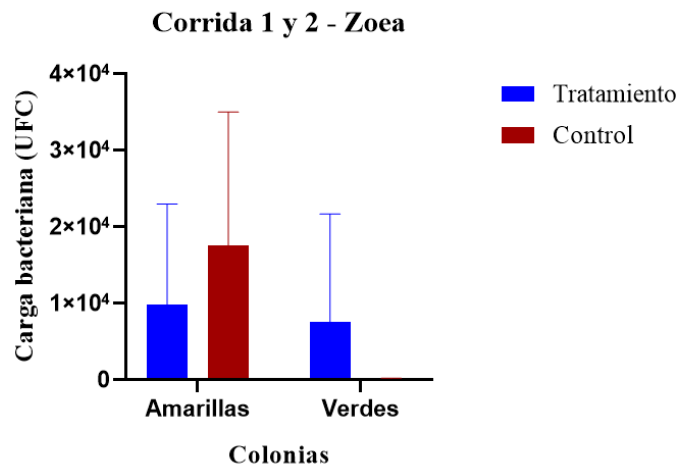
	Colonias	T1	T2	T3	C1	C2	C3
Corrida 1	Amarillas	9,10E+03	3,20E+03	4,20E+03	6,80E+03	1,20E+04	5,90E+03
	Verdes	0,00E+00	1,00E+02	2,90E+03	3,40E+02	0,00E+00	0,00E+00
Corrida 2	Amarillas	3,60E+04	5,60E+03	8,00E+02	7,70E+03	5,10E+04	2,20E+04
	Verdes	1,00E+00	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+01	0,00E+00

Los valores son mayores para Vibrios amarillos, evidenciándose que para los del tratamiento se contó con un exponente menor en comparación con los controles, no obstante,

en uno de los tanques del tratamiento se vio reflejado una mayor carga de Vibrios verdes, pero que se mantiene dentro del rango de lo normal, representado en la figura 31.

Figura 31.

Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en el estadio de Zoea.



8.8.2. Media de colonias amarillas y verdes en estadio Mysis para la corrida 1 y 2.

Se adjuntan los datos de las corridas 1 y 2 en la tabla 16, tomando en cuenta los tanques con la aplicación del tratamiento sirvieron para la obtención del valor de una media con 1.32E+05 para colonias amarillas con una desviación estándar de 32177 y referente a colonias verdes la media generada fue de 6.8E+01 con una desviación estándar de 120; Para los tanques control de ambas corridas se obtuvo una media de 2.83E+05 para colonias amarillas con una desviación estándar de 209017 y correspondiente a colonias verdes la media formada fue de 3.85E+03 con una desviación estándar de 8896.

Tabla 16.

Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 1 y 2 del estadio mysis.

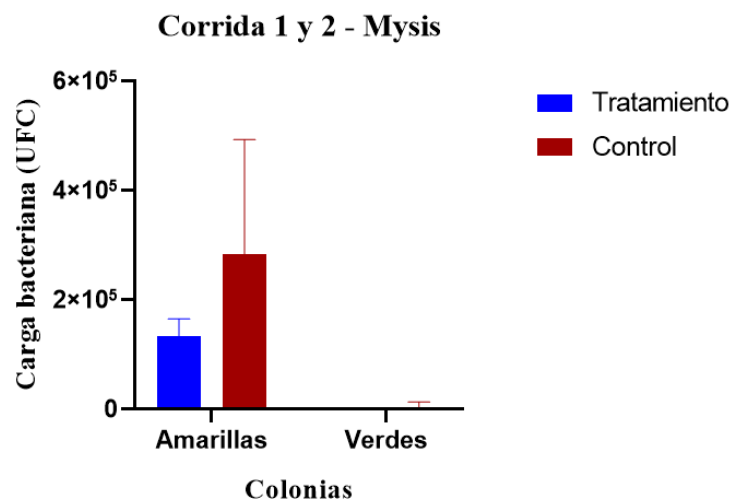
	Colonias	T1	T2	T3	C1	C2	C3
Corrida 1	Amarillas	1,50E+05	1,70E+05	1,40E+05	1,71E+05	7,00E+05	2,80E+05

	Verdes	0,00E+00	1,00E+02	0,00E+00	2,20E+02	0,00E+00	0,00E+00
Corrida 2	Amarillas	1,50E+05	9,65E+04	9,00E+04	1,51E+05	2,20E+05	1,80E+05
	Verdes	0,00E+00	3,00E+02	1,00E+01	2,20E+04	9,00E+02	0,00E+00

Los valores son mayores para *Vibrios* amarillos, denotando una carga bacteriana elevada al encontrarse en el exponente 5 tanto en el grupo control cómo en el grupo tratamiento, sin embargo, este último tiene por poco, una menor presencia patógena; En *Vibrios* verdes la carga es mínima en el grupo tratamiento, mientras que en el grupo control se mantienen en el rango normal, se ve representado en la figura 32.

Figura 32.

Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en el estadio de Mysis.



8.8.3. Media de colonias amarillas y verdes en estadio PL para la corrida 1 y 2.

Se adjuntan los datos de las corridas 1 y 2 en la tabla 17, tomando en cuenta los tanques con la aplicación del tratamiento sirvieron para la obtención del valor de una media con 1.7E+05 para colonias amarillas con una desviación estándar de 130777 y no hubo presencia de colonias verdes; Para los tanques control de ambas corridas se obtuvo una media de 4.01+05 para colonias amarillas con una desviación estándar de 227786 y correspondiente a colonias verdes la media formada fue de 7.0E+01 con una desviación estándar de 122.

Tabla 17.

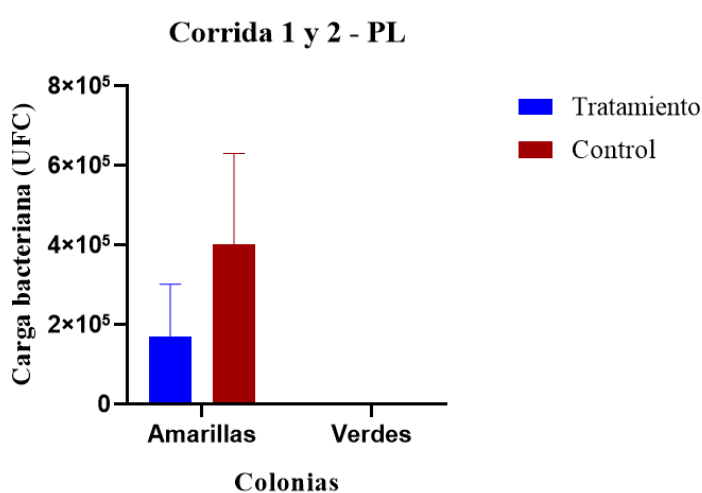
Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 1 y 2 del estadio PL.

	Colonias	T1	T2	T3	C1	C2	C3
Corrida 1	Amarillas	4,00E+05	7,20E+04	2,55E+05	7,65E+05	4,00E+05	5,10E+05
	Verdes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,20E+02
Corrida 2	Amarillas	9,00E+04	1,02E+05	1,01E+05	2,45E+05	3,90E+05	1,00E+05
	Verdes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+02	0,00E+00	0,00E+00

Los valores son mayores para *vibrios* amarillos, denotando una carga bacteriana elevada al encontrarse en el exponente 5 tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento, sin embargo, este último tiene por poco, una menor presencia patógena; En *vibrios* verdes la carga es nula en el grupo tratamiento, mientras que en el grupo control se mantienen en el rango mínimo, se ve representado en la figura 33.

Figura 33.

Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en el estadio de PL.



8.8.4. Media de colonias amarillas y verdes en estadio PL de la cosecha de la corrida 3.

Se adjuntan los datos de los tanques con el aumento de la dosis (Replicas) y sus controles con la dosis generalmente aplicada (C) que se ve en la tabla 18, tomando en cuenta los tanques con una dosis más del tratamiento sirvieron para la obtención del valor de una media con $9,81E+03$ para colonias amarillas con una desviación estándar de 13118 y referente a colonias verdes la media generada fue de $7.56E+03$ con una desviación estándar de 14092; Para los tanques control de ambas corridas se obtuvo una media de $1.75E+04$ para colonias amarillas con una desviación estándar de 17423 y correspondiente a colonias verdes la media formada fue de $6.1E+01$ con una desviación estándar de 137.

Tabla 18.

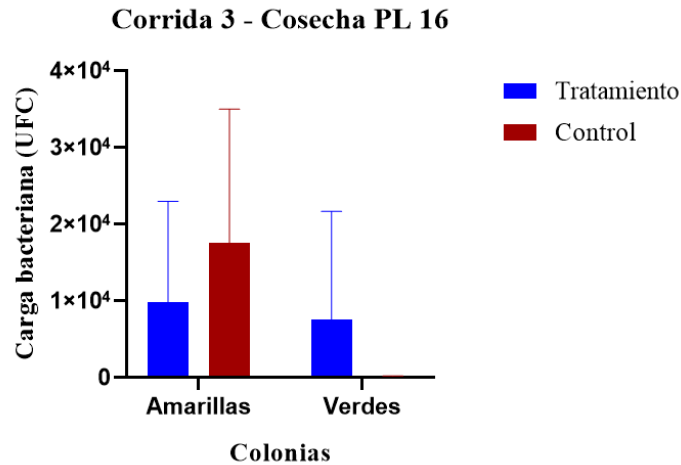
Agrupación de bacterias patógenas correspondientes a la corrida 3 del estadio PL.

	Colonias	T1	T2	T3	C1	C2	C3
Corrida 3	Amarillas	5,08E+04	4,00E+04	2,10E+04	5,60E+04	9,60E+04	4,70E+04
	Verdes	4,40E+03	9,00E+03	5,20E+03	4,40E+04	1,00E+04	2,00E+04

En ambos grupos hubo un control de *vibrios* que se mantuvo en el rango de lo normal, tomando en consideración que el grupo tratamiento no se presentaron colonias verdes a diferencia del que posee la dosis normal, por lo que al haber mayor presencia de *vibrios* una dosis más en el cultivo es idóneo para mantener controlada la carga patógena. Para las colonias amarillas, se mantienen en el rango de lo normal al estar con un exponente 3, se ve representado en la figura 34.

Figura 34.

Carga bacteriana de colonias amarillas y verdes en la cosecha de PL 16.



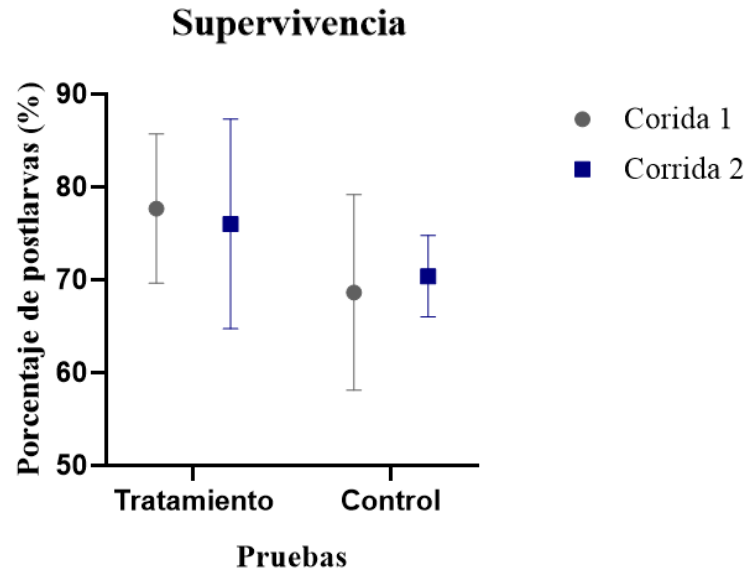
8.8.5. Supervivencia al final del ciclo de producción

Corrida 1 y 2: Mezcla probiótica vs Control

En la sobrevivencia de la primera corrida se observó una media para el grupo tratamiento del 77,67% con una desviación estándar de 8,036 y en el grupo control se registró 68,64% en cuanto al promedio con 10,54 correspondientes a la desviación estándar; En la corrida 2 se manifestó una media del 76,03% para los tanques del tratamiento y 70,39% propio del grupo control, cuya desviación estándar para el primer grupo es de 11,29 y 4,38 para el segundo. Los porcentajes son cercanos en ambos conjuntos, pero se denota un aumento del 6 al 9 % en la sobrevivencia de larvas correspondientes a los tanques del grupo tratamiento, se ve representado en la figura 35.

Figura 35.

Porcentaje de sobrevivencia del grupo tratamiento y control.



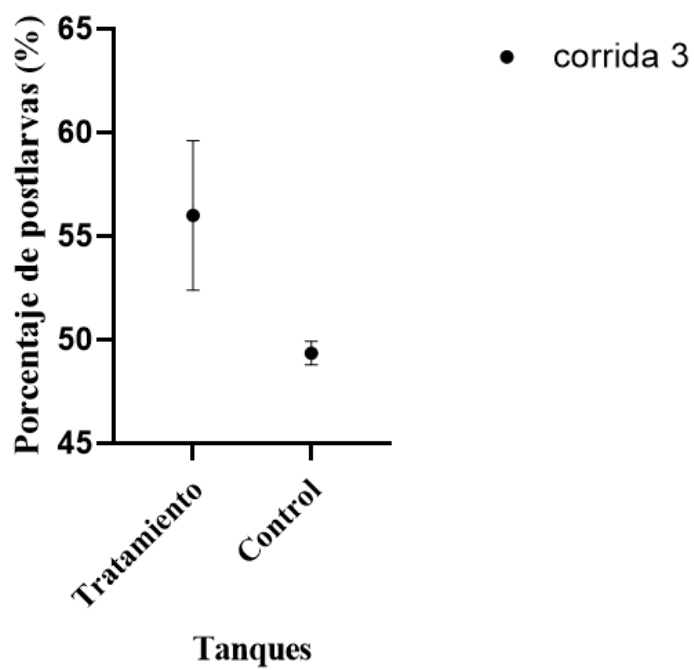
Corrida 3: Cosecha de postlarvas

La supervivencia de la corrida 3, donde el grupo Tratamiento correspondientes a las réplicas que albergan 1 dosis más de la mezcla probiótica se presentó una media del 56% en cuanto a la cosecha de las postlarvas y una desviación estándar del 3,6; Mientras tanto, en el grupo control se registró una media de 49,36% de supervivencia con una desviación estándar de 0.56. En la presente corrida se visualiza las réplicas con una dosificación agregada tuvieron en cuanto a los valores del promedio, un 7% más de organismos cosechados en comparación con la dosis normal, se ve representado en la figura 36.

Figura 36.

Porcentaje de supervivencia del grupo tratamiento y control.

Supervivencia



CAPITULO V

9. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1. DISCUSIÓN

El actual proyecto de investigación se efectuó con el propósito de evaluar la efectividad de un probiótico líquido utilizado dentro de los cultivos de larvas, tomando en consideración la salud de los organismos y su resistencia a agentes patógenos, ya que estas eran consideradas con una buena capacidad profiláctica dentro de la instalación que nos proporcionó dichas bacterias para su validación.

La cinética de las cepas del probiótico indicaron un crecimiento exponencial a partir de las 6 horas para las cepas B y C que se prolongó hasta las 12 horas, mientras la cepa A fue creciendo exponencialmente a partir de las 12 horas hasta las 24 horas con densidades de 1×10^9 UFC/ml, para luego reflejar una desaceleración en su multiplicación celular, estos resultados fueron similares en el artículo publicado por Vera y colaboradores (2021), en su investigación analizaron la cepa de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC para la obtención de un posible probiótico, donde sus resultados en cuanto a la cinética reflejaron crecimientos acelerados dentro de las 10 horas para poder comenzar con la fase de crecimiento logarítmico que se extendía hasta las 30 horas cuyas densidades alcanzaban 1×10^9 UFC/ml para iniciar con la muerte celular, considerándolo un tiempo viable para la producción de probióticos, sus datos en cuanto a la densidad celular máxima y periodos de tiempo nos permiten tener seguridad en cuanto a la viabilidad de las cepas como potenciales bacterias probióticas por su rápida multiplicación celular.

En el desafío *in vitro* mostraron una respuesta positiva frente agentes patógenos del medio acuícola como lo son *Vibrios sp.* y *Pseudomonas sp.*, con valores de 4 mm hasta llegar

a los 30 mm en sus halos de inhibición, si tomamos en consideración esta actividad inhibitoria podemos hacer mención de Hernández y colaboradores (2019) en su artículo titulado “Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77” indican que en las pruebas de antagonismo las bacterias debían contar con halos de 10 o más mm de diámetro para ser consideradas con capacidad inhibitoria, sus resultados fueron favorables al obtener diámetros aceptables en sus halos, teniendo una mejor capacidad antimicrobiana *L. acidophilus* SS80 que *S. thermophilus* SS77; Al igual que los del presente proyecto, la cepa A y C tuvieron una mejor respuesta antagónica, no obstante las tres bacterias de la presente mezcla probiótica se sitúan dentro de los rangos para ser consideradas con acción inhibitoria.

En los periodos de aplicación se observó un control de cargas patógenas similares dentro de los tanques tratamiento y control, demostrando tener una actividad profiláctica semejante en el manejo de bacterias dañinas en comparación a productos generalmente utilizados, esto se reflejó con mayor notoriedad en el tercer ciclo de producción con el aumento de la dosis en el tratamiento, puesto que, hubo una respuesta efectiva por parte de los organismos ante agentes patógenos que se verificó en los conteos microbiológicos con una reducción de colonias amarillas en los tanques con la dosis extra, también se generó un alza del 7% en la sobrevivencia, de esta manera, se mencionan los resultado de Amoah et al.(2019) ya que en sus estudios al adicionar bacterias probióticas dentro de sus cultivos lograron obtener un aumento del 10,8% de supervivencia y la disminución de bacterias del género *Vibrios sp.*, concordando con los datos obtenidos en el actual proyecto realizado, haciendo constancia de la respuesta favorable por parte de los organismos al implementar bacterias benéficas en los ciclos de producción de *L. vannamei*.

9.2. CONCLUSIONES

En las revisiones de los lotes pertenecientes a cada cepa, se pudo establecer mediante conteo microscópico, microbiológico, densidad óptica y de forma visual, las curvas pertenecientes a la cinética de cada bacteria, concluyendo que las cepas B y C tienen un crecimiento acelerado en el lapso de 12 horas obteniendo una densidad máxima de $2,5E+09$ y $2,2E+09$ UFC/ml, en comparación con la cepa A que necesitó 24 horas para llegar a una densidad similar con $2,20E+09$ UFC/ml.

Mediante pruebas de antagonismo de forma individualizada para las tres cepas se realizaron las mediciones de sus halos de inhibición y se estableció que las Cepas A y C tienen una mejor capacidad de defensa ante cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *Pseudomonas sp.* y *P. fluorescens* al poseer de 20 a 30 mm de diámetro en sus halos, mientras la Cepa B presentó un halo de 4 a 10 mm para las mismas bacterias nocivas tomadas en consideración en las pruebas antagónicas.

La aplicación del coctel probiótico en los tanques larvarios nos permitió concluir que sí tienen un efecto positivo dentro del cultivo, debido a que se reflejaron cifras de densidad bacteriana patógena similar e incluso menores que al usar un producto comercial, manteniéndose en un rango aceptable dentro de los cultivos presentando valores exponenciales máximos en colonias amarillas de $1.7E+04$ UFC/ml para zoea, $2.8E+05$ UFC/ml en mysis y $4.0E+05$ UFC/ml en postlarva; en colonias verdes los mayores rangos fueron de $7.56E+03$ UFC/ml en zoea, $3.85E+03$ UFC/ml en mysis y $7.0E+01$ UFC/ml en postlarva.; en la cosecha de la tercera corrida direccionado a la verificación de la dosificación, también se confirmó que las cargas se mantuvieron normales en cuanto a colonias amarillas y verdes, con una media de $9,81E+03$ UFC/ml y $7.56E+03$ UFC/ml en aquellos tanques con una dosis adicional; en los tanques con la dosificación normal se elevó

un exponente en colonias amarillas, considerando la carga elevada con $1.75E+04$ UFC/ml, no obstante se mantuvo en niveles reducidos con $6.1E+01$ UFC/ml para colonias verdes, lo que nos indica subir la dosis del coctel para la obtención de organismos con cargas patógenas controladas.

Las supervivencias obtenidas nos permiten establecer que la aplicación de la mezcla de cepas probióticas sí tiene una actividad profiláctica dentro del cultivo de los organismos, esto se evidencio en los resultados obtenidos en las dos primeras cosechas donde los tratamientos tuvieron una acción similar e inclusive mejor al mostrar del 5 al 10% más densidad larval al final de ciclo de producción que en los tanques control, además en la cosecha de la tercera corrida donde fue evaluada la dosis aplicada del coctel probiótico en todos los tanques, aquellos con una dosificación extra tuvieron valores en la media del 7% más de densidad larval; A todo esto se le suma que en las revisiones de patología en fresco de los 18 tanques con la mezcla de bacterias benéficas se denotaron anomalías mínimas porcentuales del 10.03 % en estadio zoea, 21,01% en Mysis y 7,6% en postlarva.

9.3. RECOMENDACIONES

Las bacterias probióticas tienen gran potencial en la acuicultura como medida profiláctica, por lo que es recomendable que se hagan más investigaciones sobre las necesidades en particular de cada bacteria nueva o con posible potencial antimicrobiano que se decida aplicar en cultivos, con la finalidad de seleccionar el medio de cultivo idóneo que cumpla con sus requerimientos nutricionales, agares de siembra y todo lo que conlleva al momento de masificar las cantidades y elaborar las mezclas probióticas.

Dentro del desarrollo del presente proyecto se utilizó dos ciclos de producción para validar su acción probiótica en comparación a un producto del mercado, no obstante, esto se realizó por los antecedentes de la empresa, ya que con anterioridad se aplicaba en los tanques de producción larvaria, por lo que, se sabía con certeza que las cepas de estudio no tendrían un efecto contradictorio en el desarrollo de los organismos, recomendando a futuros investigadores que toman este proyecto como una guía, que, previamente deben tener completa confiabilidad de sus bacterias mediante análisis microbiológicos y revisión de literatura propia de fuentes certificadas e investigaciones previas.

En el caso de estas bacterias, se sugiere seguir variando las dosificaciones y con un mayor número de réplicas, con la finalidad de poder generar un protocolo con un mayor grado de exactitud en cuanto a las dosificaciones, de la misma manera, se propone emplear a las cepas a pruebas antagónicas con bacterias del género enterobacterias, donde se encuentran especies como *E. coli* y *salmonella sp.* en búsqueda de una respuesta antagónica contra contaminantes ambientales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Amoah, K., Huang, Q. C., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y., Yang, Q. H., ... Dong, X. H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87(February), 796–808.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- Anghong, P., Uengwetwanit, T., Arayamethakorn, S., Chaitongsakul, P., Karoonuthaisiri, N., & Rungrassamee, W. (2021). *Global Seafood*. Obtenido de <https://www.globalseafood.org/advocate/colonizacion-microbiana-en-las-primeras-etapas-de-desarrollo-del-camaron-tigre-negro/>
- Aguilera, K., & García, B. (2021). *Factibilidad de aplicar secuenciación de alto rendimiento para el descubrimiento de bacterias probióticas para larvas *Penaeus vannamei**. Guayaquil: proyecto integrador.
- Araguren., F. (2020). Este estudio es el primero en reportar una “fase persistente” de esta importante enfermedad. GLOBAL SEAFOOD.
- Arteaga, F. (2017). *Influencia de la actividad probiótica de (*Lactobacillus plantarum*) EN CAMARONES (*Litopenaeus vannamei*) en estanques artificiales de la espam mfl*. Calceta: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”.
- Ávalos-García, M., Ruiz, B., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2019). Aislamiento y caracterización de una cepa de *streptomyces thermocarboxydus* con actividad antibiótica. *ResearchGate*.

- https://www.researchgate.net/publication/340076801_Aislamiento_y_caracterizacion_de_una_cepa_de_Streptomyces_thermocarboxydus_con_actividad_antibiotica
- Barrón-González, M. P. (2019). *Inhibición de Enterobacter cloacae por bifidobacterium longum*. <https://www.redalyc.org/journal/674/67459697003/html/>
- Bermudes-Lizárraga F., Nieves-Soto M., Flores-Higuera F., López-Peraza D., (2021). *Supervivencia, desarrollo y crecimiento de larvas de Penaeus vannamei alimentadas con dietas tradicionales y no-tradicionales*. Rev MVZ Córdoba. 2023; 28(1): e2682. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2682>
- Boeckel, T. V. (2015). *PNAS*. Obtenido de <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1503141112>
- Boggini, S. (2022). *Microbiología de los alimentos (Parte 14)*. Obtenido de <https://bagginis.blogspot.com/2022/06/microbiologia-de-los-alimentos-parte-14.html>
- Bordenstein, S. (18 de agosto de 2015). *Plos biology*. Obtenido de <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002226>
- Briseno, E. (2023, 8 enero). Lactobacillus (LAB) para plantas beneficios y aplicación. *Mountainside Orgánicos*. <https://mountainsideorganicos.com/blogs/cultivar/lactobacillus-lab-para-plantas-beneficios-y-aplicacion>
- Britania. (2021). *M.R.S. Agar*. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd2543f1d.pdf
- Britania. (2021). *Tripteína Soya Agar*. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e7678b1e3.pdf

Britania. (2021). *Papa Glucosado Agar*.

https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707ad8180cb.pdf

Cámara Nacional de la Acuicultura. (2021). *El camarón ecuatoriano y su presencia en el mundo*. AQUACULTURA.

Cámara Nacional de Acuicultura. (2023). Estadísticas. *Aquacultura*, 154, 65-69. Obtenido de <https://www.cna-ecuador.com/revista-acuicultura/>

Camara Nacional de Acuicultura. (2023). Patología. *Aquacultura*, 154, 24-36. Obtenido de <https://www.cna-ecuador.com/revista-acuicultura/>

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

Carvana., F. (2019). *Manual práctico de Bacteriología Marina*. Laboratorio de. Guayaquil.

Castro, C. (1989). *Manual práctico de bacteriología marina*. Guayaquil: Lab. Larvas de Camarón: Escuela Superior Politécnica Litoral.

Cercenado., E. (2013). Métodos de identificación bacteriana de microbiología.

CMED. (2020). *¿Qué es la microbiota? ¿Qué funciones tiene? ¿Cómo mantener la microbiota sana?* Obtenido de https://www.cmed.es/actualidad/que-es-la-microbiota-que-funciones-tiene-como-mantener-la-microbiota-sana_840.html

Christian. (2023b, junio 3). *Análisis del crecimiento microbiano*. Microbiología. <https://microbiologia.net/microbiologia/analisis-crecimiento-microbiano/>

Cristiano, S. (2012). *Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de Bacillus subtilis 83*. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.

- CSA. (2021). *¿Qué es la cinética microbiana?* Obtenido de <https://csaconsultores.com/que-es-la-cinetica-microbiana/#:~:text=Podemos%20definir%20la%20cin%C3%A9tica%20microbiana,ciclos%20celulares%20e%20interacciones%20ambientales>.
- Cuellar, J. (2013). *Enfermedad de las manchas blancas*. Obtenido de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/white-spot-disease-es.pdf>
- Cuellar, J. (2013). *Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)*. Obtenido de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/necrotizing-hepatopancreatitis-es.pdf>
- Cuellar, J. (2013). *Vibriosis*. Obtenido de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- CUN. (2023). *Sintomatología*. Obtenido de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/sintomatologia>
- Cristiano, S. (2012). *Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de Bacillus subtilis 83*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Días, M., & Montes, M. (2012). *Efecto de probiótico a base de Bacillus sp., Enterococcus sp., Pediococcus sp.* San Salvador: Tesis de grado.
- Domínguez, C. (2020). *Aceites esenciales como inhibidores de la virulencia de vibrio*. Guayaquil: escuela superior politécnica del litoral.
- Drut, R. (2020). *Qué es la patología*. Obtenido de <https://www.patologia.org.ar/que-es-la-patologia/>

ECA Sinergia. (2019). Application del enfoque y control de procesos en la reducción de la mortalidad de nauplios y postlarvas de camarón en un laboratorio de producción.

Redacly, 10(2), 129-139. doi:https://doi.org/10.33936/eca_sinergia.v10i2.1587

Er-Chao Li, Chang Xu, Xiao Dan Wang, & Wang Shifeng. (marzo de 2018). *ResearchGate*.

Obtenido de ResearchGate:

https://www.researchgate.net/publication/323564012_Gut_Microbiota_and_its_Modulation_for_Healthy_Farming_of_Pacific_White_Shrimp_Litopenaeus_vannamei

Escolar, R. C. (2023). Microbiología. Descripción inicial de colonias. *RCE*.

<https://www.redcientificaescolar.com/post/microbiolog%C3%ADa-descripci%C3%B3n-inicial-de-colonias>

Español, A. (2015). El papel de la biorremediación en el manejo de la calidad del

agua. AquaFeed Español. [https://aquafeed.co/entrada/el-papel-de-la-biorremediacion-en-el-manejo-de-la-calidad-del-agua-](https://aquafeed.co/entrada/el-papel-de-la-biorremediacion-en-el-manejo-de-la-calidad-del-agua-20399/#:~:text=En%20la%20acuicultura%2C%20la%20aplicaci%C3%B3n,que%20se%20cr%C3%ADan%20los%20animales.)

[20399/#:~:text=En%20la%20acuicultura%2C%20la%20aplicaci%C3%B3n,que%20se%20cr%C3%ADan%20los%20animales.](https://aquafeed.co/entrada/el-papel-de-la-biorremediacion-en-el-manejo-de-la-calidad-del-agua-20399/#:~:text=En%20la%20acuicultura%2C%20la%20aplicaci%C3%B3n,que%20se%20cr%C3%ADan%20los%20animales.)

Estefanía, G., Marcel, M., Cadiya, C., Teresa, G., Luis, M., Francisco, V., & Arvayo, M.

(2020). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte. *Biotecnia*, 11-13.

FAO. (2022). *Estado y tendencia generales de la producción*. Obtenido de

<https://doi.org/10.4060/cc0461es>

FAO. (2011). *Manual básico de sanidad piscícola*. Paraguay: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Fernández, J. (2019). *Cultivos por lotes, continuos y semicontinuos*. Obtenido de Cultivos por

lotes, continuos y semicontinuos:

<https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-5-modos-de-cultivo.html>

Fernández, M., Moreno, P., Bianchinotti, M., Cubitto, M., & Sequeiros, C. (2021). *Efecto antagónico de bacterias probióticas aisladas de ambientes acuáticos patagónicos contra Flavobacterium psychrophilum, uno de los principales patógenos en el cultivo de trucha arcoíris*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/182892>

García, J., Ulloa, J., & Mendoza, S. (2021). Patógenos bacterianos y su resistencia a los antimicrobianos en los cultivos de tilapia en Guatemala. *Scielo*, 14.

Gómez, G., Roque, A., & Guerra, F. (2018). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. *Scielo*, 117.

Gonzabay, A. (2021) *Análisis de la producción de camarón en el ecuador para su exportación a la unión europea en el periodo 2015-2020*. UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/17632>

Google earth. (2023). *Módulo 2 habilitado en Ballenita, cantón Santa Elena*. Obtenido de [CigiJgokCRCOZjPE1QHAEYNTIvwE4AHAGZrbI4RFN1TAIe6sjsLxN1TAMikKJwolCiExbGE1TS1HVDA1bVJPamFhR1RzUnpITWp3T0tZVkpEUXQgAToDCgEw](https://www.google.com/maps/place/2%C2%B013'54.2%22S+80%C2%B052'09.2%22W/@-2.2317317,-80.8698777,196m/data=!3m2!1e3!4b1!4m4!3m3!8m2!3d-2.231733!4d-80.869234?hl=es&entry=ttu)

GoogleMaps. (2023). *Google Maps*. Obtenido de Google Maps:
<https://www.google.com.ec/maps/place/2%C2%B013'54.2%22S+80%C2%B052'09.2%22W/@-2.2317317,-80.8698777,196m/data=!3m2!1e3!4b1!4m4!3m3!8m2!3d-2.231733!4d-80.869234?hl=es&entry=ttu>

GoogleMaps. (2023). *Google Maps*. Obtenido de

<https://www.google.com.ec/maps/place/2%C2%B005'03.3%22S+80%C2%B044'28.4%22W/@-2.0842446,-80.7437971,783m/data=!3m2!1e3!4b1!4m4!3m3!8m2!3d-2.08425!4d-80.741222?hl=es&entry=ttu>

Guarner, F. (2007). Obtenido de

<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>

Guillaume, L. (2022). *Blog - El factor frío en los probióticos*. Sura Vitasan.

https://www.suravitasan.com/blog/El_factor_frio_en_los_probioticos/

Guitierrez, L. (2018). Aceites esenciales: mecanismo de acción sobre bacterias patógenas .

Plusvet animal health, págs. 12-16.

Gutiérrez., e. a. (2015). Tratamientos de prevención para camarones blancos.

Gutiérrez, J., Gutiérrez, O., Nieto, D., Téliz, D., Zavaleta, E., Delgadillo, F. & Vaquera, H.

2003. Evaluación *in vitro* de agentes biológicos y físicos para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Rev. Mex. Fitopatol. 21:199-206.

Guzmán, T., Anaya, M., & Yarindra, M. (2016). Activación de cultivos probióticos tratados con campo magnético de frecuencia extremadamente baja. *Scielo*, 9.

Herdian, H., Istiqomah, L., Damayanti, E., Suryani, A. E., Anggraeni, A. S., Rosyada, N. D., & Susilowati, A. (2018). Isolation of cellulolytic Lactic-Acid bacteria from mentok (*Anas moschata*) Gastro-Intestinal tract. *Tropical Animal Science Journal*, 41(3), 200-206. <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.3.200>

Hernández, J., Sebastián, L., Rodríguez, J., Valdez, G., Virginia, M., & Calero, I. (2019).

Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y

Streptococcus thermophilus SS77. *Scielo*, 7-8. Obtenido de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000100001

Hoben, H., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peatt. En *Applied and Environmental Microbiology* (págs. 1246-1247). Obtenido de *Applied and Environmental Microbiology*.

Kim, M., Kim, J., Jang, G., Kwon, M., & Kim, K. (2023). Evaluación de la transmisión horizontal del virus del Síndrome de la Mancha Blanca en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) según el grado de severidad de la enfermedad y la tasa de desprendimiento viral. *Aquacultura*, 154, 24-36. https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion_154_100_

Klotz, M. G., Arp, D. J., Chain, P., El-Sheikh, A. F., Hauser, L., Hommes, N. G., Larimer, F. W., Malfatti, S., Norton, J. M., Poret-Peterson, A. T., Vergez, L. M., & Ward, B. B. (2006). Complete Genome Sequence of the Marine, Chemolithoautotrophic, Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosococcus Oceani* ATCC 19707. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6299-6315. <https://doi.org/10.1128/aem.00463-06>

Kobayashi, T. (2018). A new selective isolation médium for vibrio group on a modified Nakanishishi's.

LabsterTheory. (2021). *Reactivos utilizados en la tinción de Gram*. Obtenido de <https://theory.labster.com/reagents-es/>

Labster Theory. (s. f.). *Identificación de la morfología de la colonia*. Labster. Obtenido de <https://theory.labster.com/es/colony-morphology-identification/>

- Lauzon. (2008). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599226/>
- Llave, A (2021). *Proyecto de granja camaronesa destinada a la obtención de 30 toneladas de langostino blanco "Litopenaeus vannamei" en la comarca de La Jara (Toledo) con modelo de economía circular*. E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM), Madrid. <https://oa.upm.es/72168/>
- Lea, B., Annelies, G., Frederik, H., Christophe, L., & Clarissa, S. (2018). Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial technology*, 13. Obtenido de <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.13265>
- Lideres. (2018). *Estas son las 'maternidades' de larvas*. Obtenido de <https://www.revistalideres.ec/lideres/camaron-produccion-exportaciones-acuacultura-lideresexpres.html>
- López. (2020). *Morfología de las células procariotas*. Obtenido de https://biologia-geologia.com/biologia2/6221_morfologia_de_las_celulas_procariotas.html
- López, Y., Torres-Rosas, R., & Argueta-Figueroa, L. (2023). Mecanismos de acción de los probióticos en la inhibición de microorganismos cariogénicos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 34(3), 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2023.03.010>
- Magazine, P. A. (2021). ¿Cómo actúan los ácidos orgánicos en el camarón? *ISSU*, VOL.26 .
- María, S., & José, B. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *AquaTIC*, 8.

- McEwen, S. (29 de marzo de 2018). *Microbiology Spectrum*. Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Mejías, V., Mora, A., Mora, A., & Ramsés. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1-14.
<http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/315>
- Mieles, A. (2021). *Protocolo de producción de probióticos*.
- Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal1. *Redalyc*.
<https://www.redalyc.org/journal/437/43759027020/html/#:~:text=Se%20ha%20reportado%20que%20el,disminuyen%20la%20incidencia%20de%20enfermedades>
- Molina., C. (2021). Health management in shrimp ponds Society, Baton Rouge. L. A., USA.
- Molina., C. e. (2021). Acción antibacterial de los aceites esenciales y su efecto sobre el crecimiento en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Guayaquil.
- Montes, M. (2005). *Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antárticos: descripción de cuatro nuevas especies*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Morales, V., & Cuellar, J. (2014). *Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones Pennaeidos*. Panamá: OIRSA. Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Morla, M. (2010). *Manual para la compra, cuantificación, análisis y aclimatación de semilla silvestre en camarones*. ESPOL.
- Muñoz, D. (2022, 12 julio). *Validación de estrategias profilácticas en larvicultura del camarón *Penaeus vannamei* en la provincia de Santa Elena, Mar Bravo*.
<https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/8074>

Muñoz, V. (2018). Contribución del biofloc inoculado con diferentes probióticos sobre el crecimiento y niveles de actividad enzimática digestiva en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus* Var SPRING). Ensenada, Baja California, México, Maestría en Ciencias en Acuicultura.

National Research Council . (2011). Obtenido de

<https://nap.nationalacademies.org/catalog/13039/nutrient-requirements-of-fish-and-shrimp>

Newman, S. (2022). Una actualización sobre la vibriosis, la principal enfermedad bacteriana que enfrentan los camarones. Obtenido de

<https://www.globalseafood.org/advocate/una-actualizacion-sobre-la-vibriosis-la-principal-enfermedad-bacteriana-que-enfrentan-los-camaroneros/>

NHGR. (2023). *Bacteria*. Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria>

NIH. (2022). *Probióticos* . Obtenido de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/>

NLM. (2021). *Antibióticos*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/antibiotics.html>

Ochoa, L. S. (28 de mayo de 2012). Obtenido de

https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/9808/4/0675500_00000_0000.pdf

OIE. (2012). *Enfermedad de la cabeza amarilla*. Obtenido de <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>

OIE. (2021). *Infección por el virus del Síndrome de Taura*. Obtenido de

<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>

Pacheco, C., Saucedo, G., Rodríguez, L., & Pérez, M. (2023). Características de microorganismos utilizados como probióticos tradicionales y nuevos probióticos.

Actualidades biológicas, 45(119), 1-12.

<https://doi.org/10.17533/udea.acbi/v45n119a05>

Pavone, P. (2020). Contando colonias en placas de agar. *Tecnovita*.

<https://tecnovitaca.com/wp-content/uploads/2021/06/Colonias-agar.pdf>

Peña, N., & Valera, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica.

Scielo, 51, 1-12. doi:10.4067/S0718-19572016000300007

Pérez Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, & Imanol & de Blas, I. &. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 1-14.

Piedra, M. (2022). *Análisis del sector camaronero de la provincia del Guayas y sus ventajas competitivas en el mercado internacional, año 2021 [Trabajo de titulación,*

Universidad Politécnica Salesiana]. Obtenido de

<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23759>

Palomino, R. (2022). *Cultivo por lotes, Fisiología Microbiana*. Obtenido de

<https://es.scribd.com/presentation/574044292/Practica-7-Cultivo-Por-Lotes>

Pérez, M., Alvarez, Y., Soriano, J., & Pérez, M. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Scielo*, 1-7.

Pondo, J., & Gardey, A. (2023). *Supervivencia - Qué es, utilidad, definición y concepto*.

Obtenido de <https://definicion.de/supervivencia/>

Pozo., Y. (2005). “Análisis microbiológico y caracterización de poblaciones bacterianas en sistemas de engorde de camarón” .

Prieto, A. (2004). La prevención y el control de enfermedades en el cultivo de peces.

REDVET, 1-2.

- Prieto, M., & Atencio, V. (2008). Zooplancton en la larvicultura de peces neotropicales. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682008000200017#:~:text=La%20t%C3%A9cnica%20de%20larvicultura%20adop tada,la%20alimentaci%C3%B3n%20ex%C3%B3gena%20\(9\)](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682008000200017#:~:text=La%20t%C3%A9cnica%20de%20larvicultura%20adop%20tada,la%20alimentaci%C3%B3n%20ex%C3%B3gena%20(9).).
- Prieto, M. L., L. O'Sullivan, S. P. Tan, P. Mc-Loughlin, H. Hughes, P. M. O'Connor & G. E. Gardiner (2012). Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. *Marine drugs* 10 (10): 2280-2299. DOI:10.3390/md10102280.
- Quiñones-Aguilar, E. E., Z. Evangelista-Martínez & G. Rincón-Enríquez.(2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos* 101: 59-64. <https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000000626.pdf>
- Ramírez, J., Parra, J., & Adalucy, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Programa de Microbiología*, 8.
- Reyes. (2018). *Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus Litopenaeus vannamei**. La Libertad. UPSE, Matriz. Facultad de Ciencias del Mar. <http://repositorio.upse.edu.ec:8080/jspui/handle/46000/4432>
- Reyes, J., & Rodriguez, L. (2012). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo? *Scielo*, 7-13.
- Romero Dextre, J. A. (2018). *Diseño de criaderos y cultivo del langostino (*Litopenaeus vannamei*)*. Universidad Nacional del Callao. <https://hdl.handle.net/20.500.12952/4056>

- Rungrassamee, W. (2014). *PLOS ONE*. Obtenido de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091853>
- Sandoval, L. (2020). *Papel de la salinidad, temperatura y pH sobre el nivel de expresión de mRNA de las toxinas PirA y PirB en Vibrio Parahaemolyticus*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. DOI:10.7773/cm.y2023.3234
- Sanjuan., N. (2013). MECANISMOS DE LESIÓN INDUCIDOS POR BACTERIAS PATÓGENAS INTRACELULARES. Buenos Aires.
- Santiago, M., Espinosa, A., & Bermúdez, M. d. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Redalyc*, 22-32.
- Sarango, E. (2021) *Identificación de microorganismos patógenos que afectan en el estado larval de camarón blanco (Litopenaeus vannamei)*. UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/17520>
- Sarmiento, L. (2014). *Bacillus circulans E9 productora de ácido indol acético en un medio de cultivo de bajo costo a nivel de biorreactor*. Instituto Politécnico Nacional.
- María, S., & José, B. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *AquaTIC*, 8.
- McEwen, S. (2018). *Microbiology Spectrum*. Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Mejías, V., Mora, A., Mora, A., & Ramsés. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *evista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1-14. Obtenido de Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29(1), 1-14.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL . (2011). Obtenido de <https://nap.nationalacademies.org/catalog/13039/nutrient-requirements-of-fish-and-shrimp>
- NHGR. (2023). *Bacteria*. Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria>
- NIH. (2022). *Probióticos* . Obtenido de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/>
- NLM. (2021). *Antibióticos*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/antibiotics.html>
- Ochoa, L. S. (28 de mayo de 2012). Obtenido de https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/9808/4/0675500_00000_0000.pdf
- Ortega., A. (2018). Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo.
- Reyes, J., & Rodriguez, L. (2012). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo? *Scielo*, 7-13.
- Rungrassamee, W. (2014). *PLOS ONE*. Obtenido de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091853>
- Sarmiento, L. (2014). *Bacillus circulans E9 productora de ácido indol acético en un medio de cultivo de bajo costo a nivel de biorreactor*. Instituto Plotécnico Nacional.
- Saul. (2022). *Molinos Champion S.A.S*. Obtenido de Molinos Champion S.A.S.: <https://www.molinoschampion.com/influencia-nutricional-en-la-supervivencia-del-camaron/#:~:text=La%20tasa%20de%20supervivencia%20del%20camar%C3%B3n%20es%20uno%20de%20los,contraparte%2C%20la%20tasa%20de%20mortalidad.>
- SEGOB. (2013). Obtenido de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313326&fecha=09/09/2013#gsc.tab=0

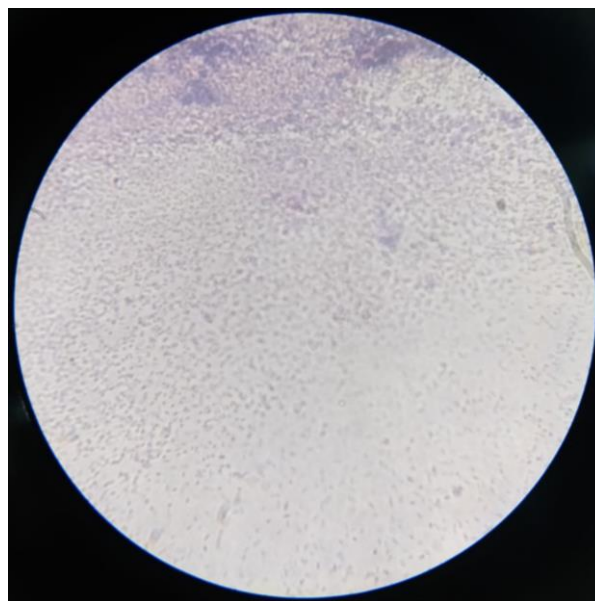
- Shen, H. (2023). *Global Seafood*. Obtenido de <https://www.globalseafood.org/advocate/diferencias-en-la-microbiota-intestinal-en-camarones-blancos-del-pacifico-de-invernadero-y-sistemas-acuaponicos/>
- Sigüenza, J., & Domínguez, J. (2021). *Producción y comercialización de balanceado para la alimentación de camarón a partir de pasta de soya*. ESPAE - ESPOL.
- Siñoes., N. (2007). Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. memorias del 1er. Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 2003-2007. Ecuador, Guayaquil.
- Soluap, E. (2019). *Introducción a las Patologías de Camarones Penaeus en Cautiverio*. Guayaquil, Ecuador : "Ediciones Cabal Ltda"
- Tania, G., Matilde, A., & Mesa, Y. (2016). Activación de cultivos probióticos tratados con campo magnético de frecuencia extremadamente baja. *Scielo*, 9.
- Toledo, A., Castillo, N. M., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Scielo*, 11.
- Tremaroli, V., & Backhed, F. (2012). *nature*. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/nature11552>
- UNAM. (2020). *Manual de microbiología general I*. Obtenido de https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/10_MANUAL_MICROBIOLOGIA_GENERAL_I_2020.pdf
- Vargas, F., & Kuno, V. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 2594-2598.

- Villamil, L., & Martínez, M. (2009). PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA. *Scielo*, 23.
- Villacís, D. (2023). *Evaluación de tres probióticos frente a bacterias patógenas en tanques de producción de post larvas litopenaeus vannamei en wanbri s.a.* Guayaquil: Tesis de grado.
- 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/bitstream/48000/14670/1/DE00006_examencilivo.pdf
- Velayati, A., & Karim, I. (2021). *National Library of Medicine* . Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34077686/>
- Vera, R., Sánchez, L., Zambrano, P., & Rodríguez, Y. (2021). Obtención de un candidato a probiótico de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC a partir de un medio de cultivo natural con materas primas agroindustriales. *Scielo*, 2-5.
- Vikash, K., Suvra, R., Bijay, B., Peter, B., & Basanta, D. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 13(8). Obtenido de <https://panoramaacuicola.com/2022/05/13/necrosis-hepatopancreatica-aguda-ahpnd-virulencia-patogenesis-y-estrategias-de-mitigacion-en-la-acuicultura-del-camaron/>
- Yunda, A. (2017). *Análisis de la evolución del sector exportador camaronero en el Ecuador y su incidencia en la economía nacional (período 2008-2016).* Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/8936>

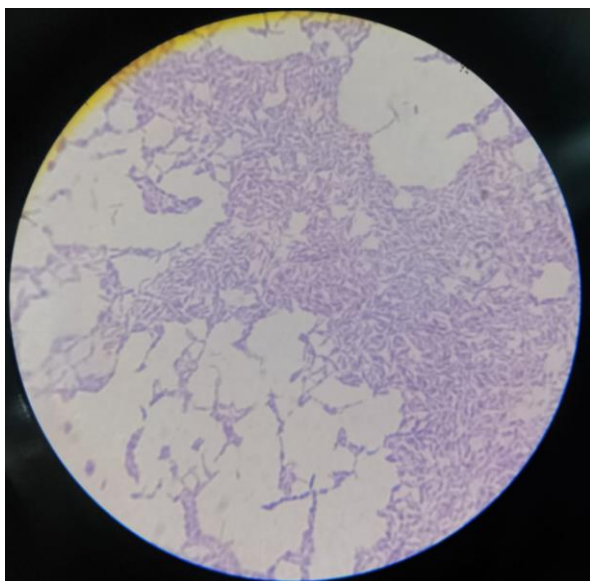
11. ANEXOS



Anexo 1. Ceba C, Gram +; Aumento 1000x.



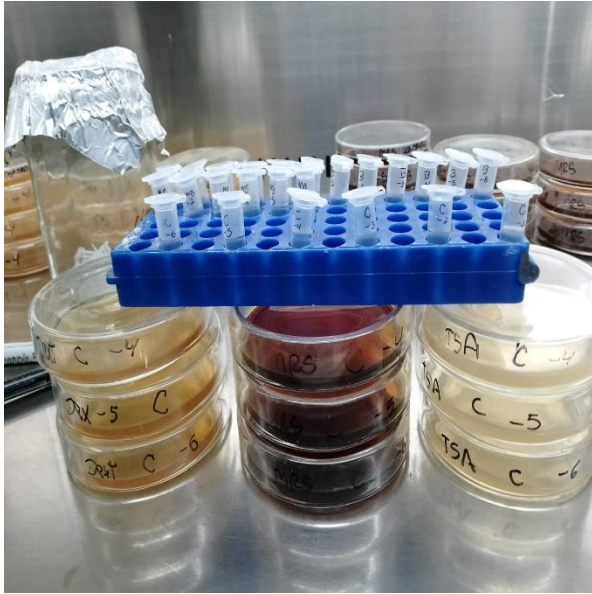
Anexo 2. Ceba A, Gram +; Aumento 1000x.



Anexo 3. Ceba B, Gram +; Aumento 1000x.



Anexo 4. Toma de datos de fotometría.



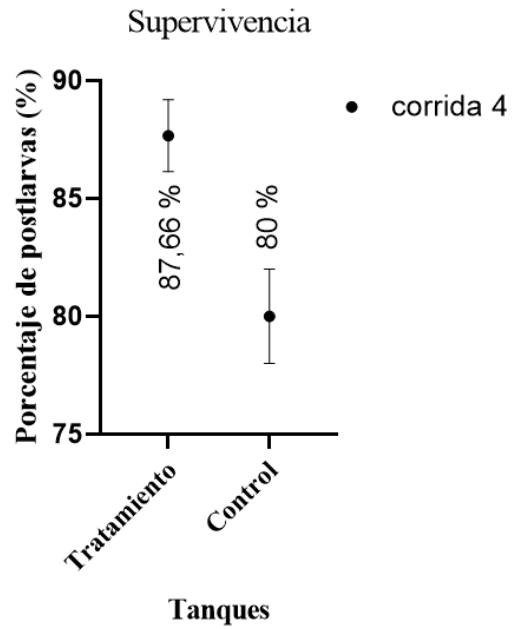
Anexo 5. Siembra de diluciones en Agares.



Anexo 6. Realización de Tinciones Gram.



Anexo 7. Revisiones de patología en fresco.



Anexo 8. Corrida adicional para la dosificación.