



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

“EVALUACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS APLICADAS AL CULTIVO DE
LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EN LABORATORIO TEXCUMAR -
SAN PABLO, PROVINCIA DE SANTA ELENA”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del título de

BIÓLOGA

AUTOR:

BAQUE YOZA CINDY TATIANA

TUTOR:

Q.F. MERY RAMÍREZ MUÑOZ, Ph. D

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS APLICADAS AL CULTIVO DE LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EN LABORATORIO TEXCUMAR - SAN PABLO, PROVINCIA DE SANTA ELENA”

TRABAJO DE INTREGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del título de

BIÓLOGA

AUTOR:

BAQUE YOZA CINDY TATIANA

TUTORA:

Q.F. MERY RAMÍREZ MUÑOZ, Ph. D

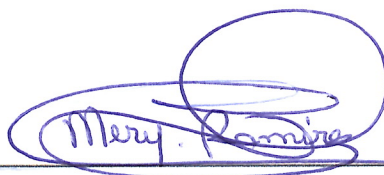
LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “EVALUACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS APLICADAS AL CULTIVO DE LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EN LABORATORIO TEXCUMAR -SAN PABLO, PROVINCIA DE SANTA ELENA”, elaborado por el/la/los/las BAQUE YOZA CINDY TATIANA, estudiantes de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente

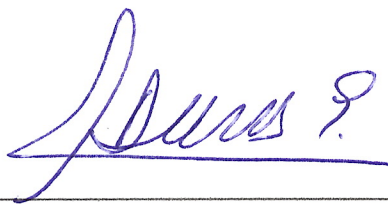


Q.F. MERY RAMÍREZ MUÑOZ, Ph. D
DOCENTE TUTOR
C.I. 0907694186

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “EVALUACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS APLICADAS AL CULTIVO DE LARVAS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EN LABORATORIO TEXCUMAR -SAN PABLO, PROVINCIA DE SANTA ELENA”, elaborado por el/la/los/las BAQUE YOZA CINDY TATIANA, estudiantes de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



BLGA. ERIKA SALAVARRÍA PALMA Ph.D
DOCENTE DE ÁREA
C.I. 0912260387

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado con mucho amor a mis padres Lucia Yoza y Dionicio Baque, grandes ejemplos de perseverancia y lucha, que con mucha gratitud y apoyo me han forjado a ser la persona que soy, para lograr concluir otra etapa más en mi vida y formarme como profesional, han sido mi fuente de inspiración en cada logro alcanzado.

A mis hermanas Jessenia, Erika y Betsy por alentarme, por celebrar conmigo cada paso y por ser incondicionales.

En este momento tan especial de mi vida, quiero dedicarme este trabajo a mí, por mi capacidad y esfuerzos constantes, enfrentando desafíos con valentía para alcanzar mis metas, y sentirme orgullosa de la gran persona que soy.

Cindy Tatiana Baque Yoza

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy gracias a Dios, por siempre guiar mis pasos y brindarme la inteligencia y capacidad para este gran logro.

Quiero dar gracias a mis padres por los grandes esfuerzos que hicieron a lo largo de estos años, han sido el motor que me impulsa a seguir adelante y en general a mi familia que están para sostenerme en los momentos difíciles.

Sin dejar de mencionar a mis amistades más cercana y a las que conocí en este paso por la universidad que se han convertido en mi familia, en especial a Pamela Castillo, por sus palabras de aliento, generosidad y lealtad.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena por abrirme sus puertas y brindarme las bases sólidas en lo académico para crecer profesionalmente.

Expreso mi eterno agradecimiento a mi tutora de tesis Q.F. Mery Ramírez, Ph. D. por su tiempo, paciencia, por compartir sus enseñanzas, conocimiento y las oportunidades brindadas, mis grandes deseos y admiración.

Mis agradecimientos se extienden hasta la prestigiosa empresa TEXCUMAR S.A. por brindarme la oportunidad de desarrollar mi trabajo en sus instalaciones y compartir sus conocimientos desinteresadamente.

Agradezco al Lcdo. Alexis Debut, Ph.D y su asistente, excelentes profesionales, por la experiencia vivida en el ámbito de la investigación científica y el invaluable apoyo.

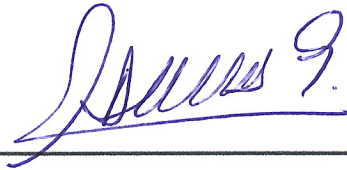
TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Baque Yoza Cindy Tatiana** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

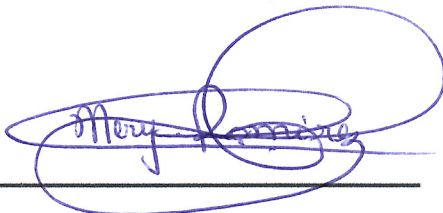
Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 15 de Julio del 2024



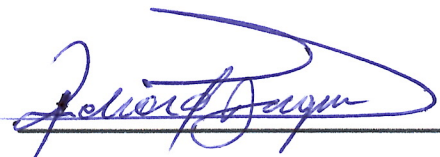
Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
**DIRECTOR/A DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



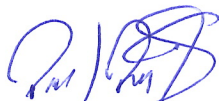
Blga. Erika Salavarría Palma Ph.D
**PROFESOR/A DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Q.F. Mery Ramírez Muñoz Ph. D.
**DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



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



Lcdo. Pascual Roca Silvestre Mgtr.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por la idea y resultados expuestos en este trabajo de investigación curricular me corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

A handwritten signature in blue ink that reads "Cindy Baque Y." is written over a solid black horizontal line.

BAQUE YOZA CINDY TATIANA
C.I: 0928166370

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVOS	12
HIPÓTESIS	12
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	13
1.1. PROBIÓTICOS.....	13
1.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.....	14
1.2.1. EXCLUSIÓN COMPETITIVA.....	15
1.2.2. MODULACIÓN INMUNE.....	16
1.2.3. PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS.....	16
1.2.4. MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD DE AGUA.....	18
1.3. BACTERIAS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS.....	18
1.3.1. CARACTERÍSTICAS QUE DEBEN PRESENTAR PARA SER UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS.....	20
1.4. IMPORTANCIA DE LOS PROBIÓTICOS EN EL AGUA DEL CULTIVO DE CAMARÓN.....	21
1.5. CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS.....	22
1.5.1. CLASIFICACIÓN DE TIPOS DE MEDIO DE CULTIVOS.....	22
1.6. TÉCNICA DE SIEMBRA EN MEDIO SÓLIDO.....	23
1.7. TÉCNICA DE SIEMBRA EN MEDIO LÍQUIDO.....	25
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO	26
2.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	26

2.2.	FASE DE CAMPO.....	26
2.2.1.	SELECCIÓN DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	27
2.3.	FASE DE LABORATORIO.....	29
2.3.1.	PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	29
2.3.2.	CULTIVO CORRESPONDIENTE EN MEDIO AGAR DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	29
2.3.3.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PREVIO A LA AOBSEVACIÓN EN ELMICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.....	30
2.3.4.	DESCRIPCIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS OBSERVADAS EN EL MICROSCOPIO.....	31
2.3.5.	MÉTODO DE EVALUCIÓN DE CARGA BACTERIANA DEL AGUA Y DE LARVA.....	32
2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	33
2.4.1.	EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE CAMARÓN.....	33
CAPÍTULO III.....		
3. ANÁLISIS EN INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....		34
3.1.	CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	34
3.2.	ANÁLISIS DE CARGA BACTERIANA.....	45
3.3.	SUPERVIVIENCIA EN LARVAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	65
CAPÍTULO IV.....		
4. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN.....		68
4.1.	DISCUSIÓN.....	68
4.2.	CONCLUSIÓN.....	71
4.3.	RECOMENDACIÓN.....	72
CAPÍTULO V.....		
5. BIBLIOGRAFÍA.....		73

6. ANEXO.....	87
----------------------	-----------

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Tipos de medios de cultivo	23
Figura 2. Siembra por agotamiento por estría.....	24
Figura 3. Siembra con asa de Drigalsky.....	25
Figura 4. Siembra en medio líquido.....	25
Figura 5. Ubicación de laboratorio TEXCUMAR	26
Figura 6. Especies de bacterias de fichas técnicas.....	28
Figura 7. Microscopio electrónico de barrido TESCAN MIRA3 FEG-SEM.....	31
Figura 8. Tinción GRAM de producto comercial 1.....	35
Figura 9. Características de bacteria observada en SEM.....	35
Figura10. Características de bacteria observada en SEM.....	36
Figura 11. Características de bacteria observada en SEM.....	36
Figura 12. Características de bacteria observada en SEM.....	37
Figura 13. Características de bacteria observada en SEM.....	38
Figura 14. Características de bacteria observada en SEM.....	39
Figura 15. Características de bacteria observada en SEM.....	39
Figura16. Características de bacteria observada en SEM.....	40

Figura 17. Características de bacteria observada en SEM.....	42
Figura 18. Características de bacteria observada en SEM.....	43
Figura 19. Características de bacteria observada en SEM.....	44
Figura 20. Características de bacteria observada en SEM.....	44
Figura 21. Unidades formadoras de colonias del agua de cultivo en Agar TSA.....	60
Figura 22. Total, unidades formadoras de colonias amarillas y verdes del agua de cultivo en Agar TCBS.....	61
Figura 23. Unidades formadoras de colonias en larva de <i>Litopenaeus vannamei</i> en cultivo de Agar TSA.....	62
Figura 24. Unidades formadoras de colonias de larva de <i>Litopenaeus vannamei</i> en cultivo de Agar TCBS.....	64
Figura 25. Supervivencia total de <i>Litopenaeus vannamei</i>	66
Figura 26. Supervivencia total de <i>Litopenaeus vannamei</i> por tanque.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias probióticas aplicadas en cultivo de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
Tabla 2. Biomasa de larva en estadio Nauplio 5.....	27
Tabla 3. Ficha técnica de productos que contienen bacterias probióticas.....	28
Tabla 4A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales en agua en Nauplio 5.....	45
Tabla 4B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en el agua en Nauplio 5.....	46
Tabla 5A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis de bacterias totales en agua de Zoea 2.....	47
Tabla 5B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en el agua en Zoea 2.....	47
Tabla 6A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales en larva Zoea 2.....	48
Tabla 6B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en larva Zoea 2...	49
Tabla 7A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis de bacterias totales en agua de mysis 2.....	49
Tabla 7B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en agua en mysis 2.....	50

Tabla 8A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales en larva en mysis 2.....	51
Tabla 8B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas de larva en mysis 2.....	51
Tabla 9A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales en agua de Postlarva 1.....	52
Tabla 9B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas del agua de Postlarva 1.....	53
Tabla 10A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales de larva en Postlarva 1.....	53
Tabla 10B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en larva en Postlarva 1.....	54
Tabla 11A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales de agua en Postlarva 6.....	55
Tabla 11B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas del agua de Postlarva 6.....	55
Tabla 12A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales de larva en Postlarva 6.....	56
Tabla 12B. Media de colonias amarillas y verde de larva en Postlarva 6.....	57

Tabla 13A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales del agua en Postlarva 9.....	57
Tabla 13B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas de agua en Postlarva 9.....	58
Tabla 14A. Prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis en bacterias totales de larva en estadio Postlarva 9.....	59
Tabla 14B. Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas de larva en Postlarva 9.....	59

GLOSARIO

- Probióticos** Consorcio de especies de bacterias vivas con beneficios para el bienestar de organismos.
- Bacterias** Microorganismos que tienen la habilidad de multiplicarse estas pueden ser benéficas o patógenas.
- Patógeno** Organismo de menor tamaño que provocan enfermedades en un individuo, pueden ser bacterias, virus, y otros.
- Flagelo** Filamentos presente en algunas bacterias, fino y largo. Parte fundamental para el movimiento.
- Agar** Sustancia gelatinosa compuesto de polímeros (polisacárido) utilizado para análisis microbiológicos en laboratorios.
- Enjambre** Movimiento y método que utilizan las bacterias que presentan estructuras como el flagelo para una rápida colonización en las superficies.

ABREVIATURA

SEM	Microscopía electrónica de barrido.
PTA	Ácido fosfotúngstico.
PL	Postlarva.
TM	Toneladas métricas.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
ML	Mililitros.
NH₄	Amonio.
N	Nitrógeno.
T	Toneladas.
TSA	Agar Tripticasa Soya.
TCBS	Tiosulfato Citrato Bolis Sacarosa.
TSB	Trypto-Casein Soy Broth.
LB	Luria-Bertani.
NaCl	Cloruro de sodio.
TE-BF	Electrones transmitidos en campo claro.
TE-DF	Electrones transmitidos en campo oscuro.

RESUMEN

Los probióticos constituidos por bacterias con propiedades benéficas favorecen a la salud de los camarones. Estas bacterias presentan características morfológicas externas que favorecen los mecanismos de acción en el hospedero. El presente estudio evaluó bacterias probióticas de 3 productos comerciales (1, 2, 3) y la influencia en la supervivencia de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, se realizó visualizando las características morfológicas externas de las bacterias de cada producto mediante el uso de microscopia electrónica de barrido (SEM) en modo transmisión, observando en su mayoría bacterias del género *Bacillus* en los productos 1, 2 y 3 con tamaños de 2-4 μm de largo y 0,5 μm de ancho, con presencia de flagelos, presentándose en productos comercial 1 y 2 con un tamaño de 6,2 μm y 6.7 μm en comparación con los otros productos comerciales las bacterias no presentaban flagelos, las fimbrias se observaron en una bacteria del producto comercial 2 donde también se observó levadura. La forma que la que se mostraron las bacterias fueron alargadas, con cápsulas presentes, membranas plasmáticas, pared celular y disposición de la bacteria agrupadas y solitarias. Se realizó un recuento de bacterias totales en medio de cultivo TSA y recuento de vibrios en medio de cultivo TCBS en tres tanques de producción (8,19 y 42) donde se aplicó los productos comerciales 1 y 2 en el agua y el producto comercial 3 en el alimento, a través de la carga bacteriana se contabilizó bacterias totales y vibrios, dando como resultado en el agua de producción en el estadio larvario de N5 un recuento promedio de $2,9 \times 10^3$ UFC/ml terminando en el estadio de PL9 con $1,8 \times 10^4$ UFC/ml para bacterias totales, de igual manera en vibrios considerando en su

mayoría colonias amarillas (*V. alginolyticus*) y la presencia de colonias verde (*V. parahemolyticus*) en N5 $1,2 \times 10^3$. En el recuento de bacterias totales en las larvas se inició en zoea 2 un promedio de $4,4 \times 10^5$ UFC/ml, finalizando en P19 $3,6 \times 10^5$ UFC/ml, a diferencia de vibrios que presentó colonias amarillas y la presencia en mysis 2 de colonias verdes (*V. parahemolyticus*) $3,0 \times 10^3$ UFC/ml. La supervivencia de producción de camarón *L. vannamei* fue mayor fue en el tanque 42 con 77%, se demostró la influencia de las bacterias probióticas en el agua. Los resultados obtenidos en la producción de larva de *L. vannamei* demostraron un resultado satisfactorio con la aplicación de la estrategia de manejo de control de patógenos mediante el uso de un consorcio de probióticos. Se requiere considerar la evaluación de un control continuo de calidad de agua y parámetros físicos químicos que conjugados ayudan a mantener la sostenibilidad de la producción.

Palabras claves: Bacterias, Probióticos, *Litopenaeus vannamei*, colonias, SEM.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción de camarones cultivados supera la mayoría de los demás animales acuáticos de cultivo (Newman, 2024). Entre las especies de camarón cultivadas, *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2018), alcanzó aproximadamente el 53% de la cantidad total de producción mundial de camarón en 2018, teniendo un ascenso desde entonces (FAO, 2020). En el año 2022, la exportación de camarón generó 7.289,3 millones de dólares correspondientes a 1068,9661 toneladas métricas (TM), según cifras de emitidas por el BCE (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, 2023). Sin embargo, se considera que el sector acuícola es sensible a las enfermedades infecciosas como resultado de la presencia de bacterias, hongos y virus.

La incidencia de patógenos en el cultivo es frecuentemente asociada con el aumento en las densidades de cultivo y métodos de manejo, calidad de aguas, valor nutricional del alimento, entre otros factores (Villamil & Martínez, 2009). Se han adoptado diferentes estrategias de manejo de las infecciones causadas por microorganismos patógenos. La aplicación de antibióticos es una de las estrategias más antiguas, sin embargo, la aplicación en los cultivos marinos ha conducido al desarrollo de microorganismos resistentes que anulan la acción terapéutica (Brunton et al., 2019; Santos & Ramos, 2018). De hecho, el uso excesivo e incorrecto de antibióticos contribuye en gran medida al desarrollo de resistencia

microbiana. Esto se produce cuando los microorganismos evolucionan y se vuelven susceptibles a los antibióticos, lo que imposibilita el tratamiento de la infección.

Los antibióticos pueden afectar el microbiota de los organismos de cultivo, alterando la composición de estos en lugares específicos del organismo arriesgando la salud del cultivo (Santos & Ramos , 2018; Yen et al., 2020). Estos cambios en la composición del microbiota pueden provocar desequilibrios que aumenten los riesgos de enfermedades.

Otra de las estrategias de manejo de cultivo de camarones es el uso de microorganismos benéficos, que ha demostrado ser eficaz en la prevención de enfermedades en la acuicultura (Chiu et al., 2021). Sin embargo, conocer la comunidad microbiana que está presente en el agua de cultivo y en el microbiota del organismo, es un estudio complejo. Se han determinado diversos estudios acerca de la comunidad microbiana intestinal comunicando que el microbiota intestinal del camarón está compuesto por vibrios y aeromonas (Liu et al., 2011). Por lo tanto, el estudio de las comunidades microbianas en la acuicultura incluida el agua de cultivo y el microbiota de los organismos es esencial para comprender la salud y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos. Comprender la composición y función del microbiota intestinal del camarón es fundamental para desarrollar estrategias efectivas de gestión de salud en la acuicultura, incluido el uso de probiótico para promover la salud, de tal manera que estos se pueden aplicar en

diferentes formas: aditivos para el agua o alimento funcional (Kewcharoen & Srisapoome, 2019)

Los beneficios de la aplicación de los probióticos consideradas como antimicrobianas es considerada de preferencia debido a su capacidad para estimular la resistencia a las enfermedades en las camaronas fortaleciendo el sistema inmunológico de forma natural (Ghosh, 2023), e implementar la aplicación de bacterias benéficas para combatir a los patógenas y las eventuales mortalidades a las que pudiera dar lugar (Villamil & Martínez, 2009), esta visión se alinea con la tendencia más amplia hacia prácticas acuícolas, más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente en la industria acuícola. Una estrategia universal es el uso de bacterias beneficiosas, como los probióticos, que compiten con las bacterias que causan enfermedades y mejoran el sistema inmunológico del camarón.

Las bacterias benéficas se han denominado probióticos (Fuller, 1989), Fuller definió a los probióticos como suplementos alimenticios microbianos vivos que afectan beneficiosamente al huésped mejorando el equilibrio intestinal, así mismo, existen muchas definiciones de los que es un probióticos, algunos estudios mencionan que son microorganismos vivos, otros como un dietario microbiano que se administra como alimento o como aditivo que va directo al tracto gastrointestinal o al agua.

Los probióticos son efectivos a través de varios modos de acción, entre los que incluyen: la exclusión competitiva de patógenos, la estimulación de una mayor capacidad de respuesta inmunitaria, la promoción de la producción de sustancias antimicrobianas y la mejora de las tasas de crecimiento y supervivencia (Pérez et al., 2020). Además, los probióticos podrían mejorar el apetito de los animales y luego conducir a una mejora del crecimiento y también a una mayor conversión alimenticia (Fagr et al., 2021).

Se han aplicado varias bacterias como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Roseobacter* y *Shewanella* para mejorar el crecimiento y la inmunidad de la acuicultura (Kuebutornye et al., 2019). Entre las especies de probióticos descubiertas, se ha demostrado que las especies de *Bacillus* poseen mejores propiedades probióticas atribuibles a su capacidad para producir sustancias antimicrobianas (Kuebutornye et al., 2019).

Las especies de bacterias son un grupo de cepas con características similares, la caracterización de bacterias ofrece información sobre las propiedades celulares y ayuda a comprender mejor sus mecanismos patogénicos (Nilsson et al., 2023) así también en bacterias probióticas se observa similares características con efectos benéficos como *Vibrio diabolicus*, *Vibrio hepatarius* se presenta de forma ovaladas

mientras que y *Vibrio cereus* de forma bacilar, de igual manera estas bacterias poseen fimbrias, flagelos y apéndices de superficie celular, que presentan las mismas características morfológicas que son necesarias para colonizar las superficies mediante biopelículas y motilidad de enjambre (Ramirez et al., 2021) esto es esencial para desarrollar estrategias para el diagnóstico, prevención y tratamientos de enfermedades bacterianas. Al realizar uno de los objetivos específicos del presente estudio sobre caracterización morfológicas de bacterias probióticas, podemos conocer la estructura externa de cada bacteria que contienen estos insumos para el uso de suplementos en la acuicultura para mejorar la supervivencia del cultivo de larvas de camarón.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para Mohamed T. et al., (2022) el creciente mercado y la intensificación de la producción acuícola han contribuido a las enfermedades y al deterioro de las condiciones ambientales

En el sector camaronero el bienestar del animal está dirigida directamente a la salud del tracto gastrointestinal del camarón, en condiciones no adecuadas *Litopenaeus vannamei* especie principal que se cultiva en la Provincia de Santa Elena y a nivel del país se encuentra expuesto a patógenos que causan enfermedades virulentas e infecciosas. A la hora de seleccionar los probióticos, se cree que aquellos que no

son adecuados afectan negativamente el metabolismo de los nutrientes y la resistencia a los patógenos (Amoah et al., 2019).

El suministro de insumos como los probióticos previene el crecimiento de patógenos que afectan al desarrollo del camarón, tanto así que la mayoría de intereses investigativos sobre probióticos se dan en estudios relacionados a otros enfoques, muchos acerca de sus beneficios, aporte que brinda al sector camaronero, la eficacia que existe entre estos productos para la supervivencia de las larvas. Estudios detallan concepto de probióticos definiéndolos como microorganismos vivos, bacterias, pero en sí, no en investigaciones científicas enfocadas a deducir las estructuras de bacterias con equipos tecnológicos de calidad que existen en la actualidad, mostrando visualización de alta resolución que a pueden contribuir a nivel científico, además, con el fin de relacionar al beneficio de actividades como la colonización de bacterias, la activación de los probióticos y la adhesión en el tracto intestinal del camarón.

Los probióticos deben ser estudiados arduamente, evaluando su comportamiento, determinando los mecanismos de acción de las bacterias y correlacionándolos con los principales efectos beneficiosos para la salud (Soares et al., 2023)

Es importante desarrollar estudios de este tipo, porque demuestran la importancia de la aplicación de bacterias probióticas debido a que intervienen directamente en

la producción enzimática que mejora la asimilación de los alimentos en el camarón, así como también fortalece el sistema inmune aumentando su actividad.

JUSTIFICACIÓN

La aplicación de probióticos ha sustituido las terapias de antibióticos con métodos menos agresivos que ha llevado a seleccionar y caracterizar a las bacterias responsables de la acción probiótica, producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas a la dieta del animal. (Rossmini et al., 2004). Los probióticos de múltiples cepas han ganado interés debido a su impacto favorable acumulativo con mayor eficacia contra una gama amplia de microorganismos patógenos (Ahmed et al., 2022). Este cambio es importante hacia las prácticas más naturales y sostenibles beneficiando a los productores al reducir la dependencia de los productos químicos, mejorando la calidad del producto final y reduciendo el impacto de afectación en el medio ambiente.

Hai (2015) menciona que estos aditivos deben experimentarse para determinar su actividad inhibitoria contra patógenos específicos o para su protección de los huéspedes cuando son desafiados. A través de la experimentación se logra la identificación fenotípica bacteriana basándose en las características observable, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Fernández et al., 2010).

Algunos caracteres morfológicos celulares externos de las bacterias probióticas son importantes para la identificación, porque permiten distinguir las diferencias entre especies y situar la aplicación adecuada de los microorganismos en agua de cultivo y alimento.

Las bacterias presentan apéndices extracelulares, como las denominadas fimbrias y flagelos que se encuentran en algunas bacterias y permiten los mecanismos de adherencia (Vila et al., 2008), para colonizar el tracto digestivo y la bacteria tener la capacidad de proliferarse (Senok et al., 2005), Con el fin de poder colonizar, las bacterias necesitan adherirse a la pared intestinal o desarrollarse más rápido (Fuller, 1989). Estas bacterias benéficas en el tracto digestivo pueden desalojar a aquellas patógenas, así como activar el sistema inmune, resultando una mayor resistencia a enfermedades y finalmente beneficiando el estado de salud del hospedero (Viseñor et al., 2016) principalmente protegiendo el tracto digestivo ocasionando una gran ventaja en la supervivencia final.

El objetivo principal de esta investigación es evaluar la actividad y conocer la eficacia de las bacterias probióticas que son utilizadas en cultivos acuícolas como aditivo para especies de camarón como lo es *Litopenaeus vannamei*, y facilitar información científica respecto a su caracterización para obtener mejoras en una óptima aplicación en el sistema de cultivo de acuerdo al conocimiento de las

bondades de estos organismos probióticos en el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de bacterias probióticas aplicadas al cultivo de larvas *Litopenaeus vannamei* mediante microscopia electrónica de barrido, comprobando la efectividad del probiótico en la supervivencia del cultivo larvario.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar estructuras celulares externas de bacterias probióticas utilizando técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM).
- Analizar el agua de cultivo de las larvas *Litopenaeus vannamei* estableciendo la carga microbiana de los tanques que contiene probióticos.
- Determinar la influencia del probiótico a través de porcentaje de supervivencia de las larvas de camarón.

HIPÓTESIS

(H1) Las bacterias probióticas influyen en la supervivencia de las larvas del camarón al término del ciclo de producción.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

En el 2020 la contribución de la acuicultura hacia la producción mundial de animales acuáticos alcanzó un récord del 49,2 % (FAO, 2020). Ecuador es uno de los principales productores y exportadores de camarón a nivel mundial, y la mayor producción es de manera industrial (López et al., 2023; Rimbaldo et al., 2024). Es crucial implementar medidas de salud en la industria acuícola debido a enfermedades, por ende, se han implementado estrategias de cultivos como crías libres de enfermedades, estrategias profilácticas, implementación de buenas prácticas acuícolas, utilización de antibióticos controlados, prebióticos y probióticos. El uso de antibióticos son herramientas para mantener la salud en los sistemas acuáticos de los camarones, es recomendable adoptar prácticas de uso responsables de los antibióticos, dado que, pueden promover resistencia bacteriana a estos compuestos debido a la presión de selección que ejercen los antibióticos, favoreciendo la supervivencia de bacterias resistentes mientras las sensibles mueren (Campa et al., 2017). Es importante considerar el uso de probiótico como otro enfoque de estrategia o método de control biológico en el cultivo de camarones, para minorar la dependencia de antibióticos.

1.1 PROBIÓTICOS.

Es un producto a base de bacterias que utiliza bacterias esenciales para promover la salud y prevenir el crecimiento de muchas enfermedades y patógenos en la acuicultura (Dawood et al., 2021) Se trata de bacterias vivas benéficas,

microorganismos, que añadidos como alimento favorecen la salud del huésped. Es una herramienta eficaz, ya que, las bacterias requieren nutrientes del agua y del tracto digestivo.

Por otra parte, los presentes Dawood et al., (2021) dan a conocer que según el modo de aplicación se los puede clasificar de la siguiente manera:

- Administración por vía oral en combinación con el alimento para mejorar la microflora beneficiosa del intestino. (Li et al., 2018).
- Aplicación como aditivos al agua logrando crecer en el medio acuático, absorbiendo todos los alimentos que se pueden ingerir, provocando la muerte de bacterias patógenas que se da por desnutrición (Nageswara & Babu, 2006).
- Administración mediante microencapsulación de probióticos microbianos (bacterias, levaduras, microalgas), logrando un impacto directo y positivo en calidad del agua, parámetros físicos y salud (Nimrat et al., 2012).
- A través de artemia o microalgas abundantes en probióticos, logrando promover el crecimiento y supervivencia durante las fases de zoea y misis (Silva et al., 2011)

1.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.

Los principales mecanismos por lo que los probióticos logran mantener un equilibrio incluyen:

1.2.1. Exclusión competitiva.

Un mecanismo de acción principal en las bacterias probióticas es competencia por los sitios de adhesión, nombrado como exclusión competitiva. Muchas bacterias patógenas deben adherirse a la capa mucosa del tracto gastrointestinal del huésped para causar enfermedades (Jalil et al., 2016). Esta adherencia les permite colonizar el huésped y evadir los mecanismos de defensa del sistema inmunológico, lo que facilita su reproducción y propagación. Los probióticos ingresan al tracto digestivo de los organismos y puede alterar la función de los patógenos, por lo que la exclusión se produce cuando especies de bacterias que conviven compiten por espacios y nutrientes.

La eficiencia y la velocidad con la que los microorganismos utilizan los nutrientes pueden proporcionar otra ventaja competitiva. La competencia por la explotación del espacio se puede lograr mediante la rápida colonización de nichos deshabitados o compitiendo con poblaciones que ya están establecidas. La producción de compuestos y receptores que se unen a características específicas de la superficie puede proporcionar una ventaja competitiva para la colonización de nichos desocupados, así como prevenir el desplazamiento de invasores. Además, el acoplamiento, aunque disminuye la movilidad, es fundamental para la formación de biopelículas (Knipe et al., 2020). Los microorganismos suministrados como probióticos podrían colonizar el tubo digestivo de animales jóvenes y adultos, previniendo la colonización por microorganismos patógenos (Molina, 2019).

1.2.2. Modulación inmune.

En los camarones el sistema inmune implica componentes plasmáticos, hemocitos, proteínas de la cascada de coagulación y sistema pro-fenoloxidasa, principal componente del sistema inmune de la familia de Penaeidae.

Los probióticos pueden fortalecer la inmunidad de tres maneras: mejorando la capacidad del patógeno para fagocitar mediante la activación de macrófagos, mayor producción de anticuerpos sistémicos y la producción de un aumento de la inversión local (Tamilselvan & Raja, 2024) también mejora la inmunidad de las mucosas.

Las bacterias probióticas que producen ácido que pueden influir y regular las respuestas inmunes que están parcialmente a la mitad del tejido linfoide asociado a la mucosa (GALT). Además, Patel et al., (2015) menciona que los probióticos tienen la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedero, tanto la respuesta innata y como la respuesta adaptativa.

1.2.3. Producción de antimicrobianos.

El metabolismo simbiótico del microbiota intestinal fabrica gran cantidad de compuestos que pueden ser de utilidad para los huéspedes, aminoácidos esenciales y vitaminas. Yao et al., (2021) en un estudio detallan los resultados de alimentar al camarón con diferentes dietas, la abundancia de bacterias beneficiosas intestinales aumentó y la abundancia de bacterias dañinas disminuyó de tal manera que la

inclusión de una combinación de probióticos compuestos por *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*, junto con prebióticos, en la dieta de los camarones obtuvo como resultado un crecimiento en la población de *Lactococcus* en el tracto gastrointestinal de los camarones por lo que se redujo un microorganismo patógeno. Los probióticos frecuentemente causan cambios en la composición del microbiota intestinal que produce resultados beneficiosos.

Al suministrar probióticos, se liberan una variedad de componentes bioactivos como ácidos grasos de la cadena corta (AGCC), exopolisacáridos, poliaminas, vitaminas debido a que los ácidos grasos de cadena corta tienen un papel primordial en varios procesos fisiológicos de los camarones, como la generación de energía, la regulación de la digestión, la modulación de la microbiota intestinal, la resistencia a enfermedades y la regulación de la respuesta inmune (Tamilselvan & Raja, 2024). Varios estudios realizados proponen que la diversidad de especies de bacterias probióticas origina moléculas bactericidas activando los sistemas inmunológicos y aumentan la resistencia infección de microorganismos patógenos.

1.2.4. Mejoramiento de la calidad del agua.

La calidad microbiana del agua es factor de riesgos para atraer enfermedades, por ello el uso de probióticos es reducir la presencia de patógenos oportunistas en el medio acuático, es decir, la circulación del agua se puede prevenir en gran medida debido a la capacidad de las bacterias para convertir el amonio (NH₄) en nitrógeno

(N) libre, evitando así la toxicidad similar a la que sucede con los biofiltros del sistema de recirculación del agua.

También desempeñan un papel importante en el mantenimiento de una comunidad microbiana equilibrada dentro del estanque, mejorando la calidad del agua (Mathan et al., 2024)

1.3. BACTERIAS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICO

De las especies que se han examinado más exhaustivamente se encuentran *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus licheniformis* (Cutting, 2011). *Bacillus spp.* disminuye la mortalidad de los camarones que se encuentran expuestos a vibrios (García et al., 2020). Los estudios encontraron que el uso de probióticos, específicamente *Bacillus subtilis*, condujo a una mayor actividad fagocítica y resistencia a las enfermedades en los camarones.

Tabla 1

Bacterias probióticas aplicadas en cultivo de camarón de Litopenaeus vannamei.

Identidad del probiótico	Aplicada	Método de aplicación	Efectos beneficiosos
<i>Vibrio hepatis</i> , <i>Vibrio P63</i> , <i>Bacillus 64</i> (<i>Bacillus cereus</i>), <i>Vibrio alginolyticus</i> (<i>Vibrio diabolicus</i>)	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición al agua de cultivo	Pesos medio elevado, efectos inmunoestimulantes. .
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo alimentario	Actividad antimicrobiana. Mejora la supervivencia en el desafío contra vibrio. Alta tasa de supervivencia y mejor respuesta inmunitaria. Mejora el crecimiento, aumento de la resistencia de AHPND.
<i>Lactobacillum plantarum</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo alimentario	Mejora la inmunidad, mayor resistencia a los vibrios.
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. subtilis subsp. Subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo alimentario	Aumento de la expresión de genes relacionados con la inmunidad en camarones infestados por WSSV Y IHHNV.
<i>V. alginolyticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Roseobacter gallaeciensis</i> , <i>Pseudomona aestumarina</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo alimentario	Reducción de la vibriosis
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Rhodopseudomonas palustri</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición al agua de cultivo	Mejora el crecimiento, respuesta inmunitaria reforzada.
<i>Shewanella haliotis</i> , <i>Bacillus cereus and Aeromonas bivalvium</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo alimentario	Aumento de peso, mejora los parámetros inmunitarios y supervivencia en el desafío con <i>Vibrio harveyi</i>
<i>Pseudoalteromonas sp</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo alimentario	Reducción de la mortalidad tras la infección por AHPND.
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	<i>Penaeus vannamei</i> (larvas y juveniles)	Aditivo alimentario	Aumenta la supervivencia en el desafío con <i>Vibrio campbellii</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Consortio de probióticos Bacillus	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición al agua de cultivo	Aumento de los parámetros inmunológicos, mejora el crecimiento.

Nota: La tabla muestra bacterias probióticas, su aplicación, el método de aplicación en el cultivo y los efectos beneficiosos que provocan. Tomado de Ramírez, et al., (2022)

Es esencial conocer que en la tabla 1 una combinación de probióticos de diferentes especies y géneros o diferentes cepas del mismo género también podría denominarse probiótico multiespecies o mixtos (Puvanasundram et al., 2021).

Los probióticos de múltiples cepas o probióticos mixtos brindan más protección ya que se combinan diferentes mecanismos de acción probiótica en un solo tratamiento (Kesarcodi et al., 2019), mientras tanto los probióticos de una sola especie muestra efectos beneficiosos en una o varias áreas, la combinación de probióticos mixtos ayuda a extender la gama de beneficios hacia el huésped (Ouwehand et al., 2018).

1.3.1. CARACTERÍSTICAS QUE DEBEN PRESENTAR PARA SER UTILIZADO COMO PROBIÓTICO.

A partir de varias características que presente un microorganismo puedes ser considerado como un probiótico. Algunas de estas características puede ser: Resistentes a la destrucción de los procedimientos tecnológicos, producir sustancias antimicrobianas, adherirse al epitelio intestinal y tener la capacidad de poder colonizar el tracto gastrointestinal, modular respuestas inmunitarias, de naturaleza no patógena, estas características son consideradas por (Teitelbaum & Walker, 2002), de la misma manera (Usca et al., 2020) también consideran, que sobrevivir a condiciones del ambiente gastrointestinal es otra de las características.

1.4. IMPORTANCIA DE LOS PROBIÓTICOS EN EL AGUA DEL CULTIVO DE CAMARÓN.

Se conoce que uno de los factores principales que influye en el brote de enfermedades en el camarón es el manejo inadecuado de la calidad del agua en el cultivo, incorporar probióticos al agua puede tener beneficios para el medio acuático y la calidad de agua, (Mohammadi et al., 2021) en estudios reciente encuentran que al añadir probióticos al agua estos pueden reducir las sustancias nocivas en el medio ambiente acuático, obteniendo la descomposición de partículas grandes de materia orgánica, como resultado se purifica así la calidad de agua del cultivo. Teniendo en cuenta que, los probióticos compiten con microorganismos patógenos por lo tanto estos pueden ayudar a disminuir la proliferación. Es importante mencionar que la eficiencia del probiótico depende de factores como: la selección de cepas bacterias adecuadas, condiciones adecuadas del medio acuático y las buenas prácticas de gestión y manejo de acuicultura.

Por otra parte, el exceso de bacterias patógenas presentes en el agua de cultivo son otro de los factores para en el desarrollo de enfermedades y afectan directamente al camarón (Chumpol et al., 2017). Los probióticos han demostrado una gran capacidad para modular el microbiota intestinal, por lo tanto, eliminan bacterias dañinas, como los del género *Vibrio* (Nimrat et al., 2012), *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* que son responsables de la enfermedad de la vibriosis que afecta a los cultivos de camarón a nivel mundial (Pumkaew et al.,

2021). La calidad microbiológica del agua es factor de riesgo para el desarrollo de patógenos y el uso de probióticos permite disminuir la prevalencia de patógenos oportunistas en el medio de cultivo (Chumpol et al., 2017).

1.5. CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS.

La aplicación de medios de cultivos adecuados es de gran importancia para el aislamiento e identificación de microorganismos patógenos. En el cultivo bacteriológico se aplican diferentes tipos de medios, los generales facilitan los nutrientes necesarios para el crecimiento y variedad de bacterias, los medios selectivos se encargan de favorecer el crecimiento de bacterias específicas, además permiten diferenciarse según las características específicas. El agente solidificante principal utilizados en los medios de cultivos es el agar (Caycedo et al., 2021). Los materiales principales que se utilizan son: tubos de ensayos, matraces para medios líquidos y placas Petri que se las utiliza para medios sólidos.

1.5.1. Clasificación de tipos de medio de cultivo:

Según su consistencia estos pueden ser: Sólidos y líquidos.

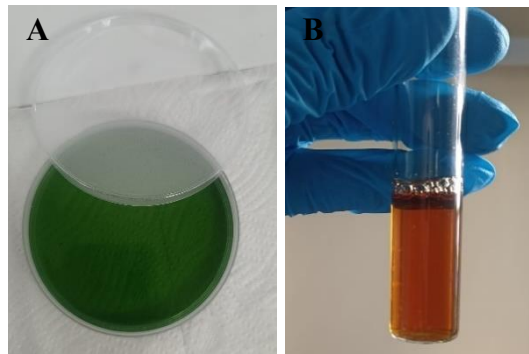
La preparación de los medios de cultivos es importante para los resultados, la técnica adecuada es la siguiente:

- Pesar los nutrientes requeridos para preparar el medio.

- Disolverlos componentes en agua destilada, agitar para mezclar el agar y obtener el volumen.
- Hervir hasta el punto de ebullición, hasta lograr la disolución completa del agar.
- Esterilización en autoclave, el tiempo óptimo es de 15-20 minutos a 120°C.
- Se distribuyen en cajas Petri.

Figura 1

Tipos de medios de cultivo



Nota: A) Medio sólido (Agar TCBS) B) Medio líquido (Agar líquido TSB)

Autor: Cindy Baque

1.6. TÉCNICA DE SIEMBRA EN MEDIO SÓLIDO.

Siembra por agotamiento en estrías:

Este método es el más utilizado en un medio sólido para aislamiento de bacterias, a través de este método se obtienen colonias aisladas separadas, y permite un cultivo puro mediante trasplante a otro medio de cultivo (Reynoso et al., 2015). Se basa en el uso de un asa de siembra para extraer menos muestras a partir de una placa de

gran cantidad de bacterias, y permitir que estos microorganismos se propaguen para formar colonias.

Figura 2.

Siembra por agotamiento por estría



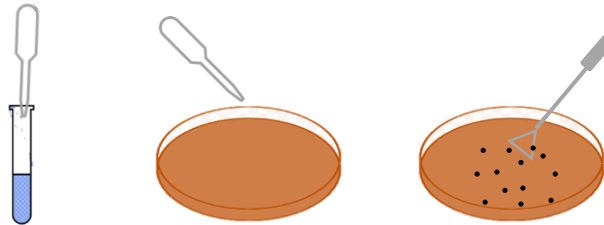
Nota: Ejemplo de la siembra por estrías con rayados en la parte superior.

Siembra con asa Drigalsky:

Esta técnica permite la siembra de inóculos sobre superficies, se utiliza una espátula Drigalsky previamente esterilizada se extiende la muestra por toda la superficie mediante movimientos giratorios hasta que la muestra este completamente absorbido. También se puede utilizar para conteo de colonias (Reynoso et al., 2015)

Figura 3.

Siembra con asa de Drigalsky



Nota: Ejemplo de siembra utilizando asa Drigalsky

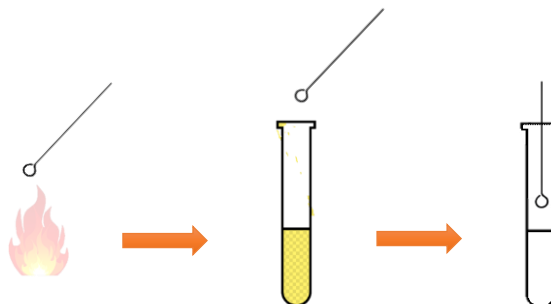
Fuente: Cindy Baque

1.7. TÉCNICA DE SIEMBRA EN MEDIO LÍQUIDO

Así mismo (Reynoso et al., 2015) mencionan llevar muestras en el asa de platino e introducir en tubos de ensayo o en frascos Erlenmeyer que contiene el medio líquido, esta técnica de siembra se emplea para el crecimiento y aumento de microorganismo.

Figura 4.

Siembra en medio líquido



Nota: Ejemplo de siembra en medio líquido paso a paso.

Fuente: Cindy Baque

CAPITULO II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. ÁREA DE ESTUDIO:

Figura 5.

Ubicación de laboratorio TEXTUMAR.



Nota: Centro de Reproducción y Mejoramiento Genético de camarón TEXTUMAR S.A.

Fuente: Google Earth

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Reproducción y Mejoramiento Genético de camarón TEXTUMAR S.A. Este laboratorio se encuentra ubicado en la comuna San Pablo, Provincia de Santa Elena. Con unas coordenadas geográficas 2°07'33"S 80° 46'19"W.

2.2. FASE DE CAMPO

Las muestras de agua y de la larva de *Litopenaeus vannamei*, fueron analizadas de tres tanques 8, 19, 42 del módulo/zamorano #6, la producción inicio con un nivel de agua de 12 toneladas (T) que se distribuían de la siguiente manera, 11 toneladas (T) de agua y 1 tonelada (T) de algas, se llenan los tanque con ORP de 600mV, con

una concentración de cloro de 1,96ppm. Se prepara el agua para recibir a los nauplios colocando el primer probiótico (Producto comercial 1) un día antes de la siembra. Se tomaron parámetros de temperatura iniciando con temperatura de 31°C, oxígeno disuelto entre 5,8 ppm, salinidad de 33 ppt y pH de 8,2. La aplicación de los tres productos comerciales se los realizó por igualdad en los tanques 8, 19 y 42, para el producto comercial 1 se aplicó 35g/tq en el agua antes de la siembra nauplio 5 hasta zoea 2. El producto comercial 2 se aplicó 1L/tq para cada tanque en el agua desde zoea 1 hasta el término de la producción. El producto comercial 3 fue administrado en cantidad de 35g/tq en el alimento desde zoea 3 hasta el final de la producción. La cantidad de biomasa de cada tanque con la que se inicia es la siguiente:

Tabla 2:

Biomasa de larva en estadio Nauplio 5.

	Cantidad recibida	Cantidad facturada
Tanque 8	3,333.300	2,500.000
Tanque 19	3,166.600	2,370.000
Tanque 42	2,933.300	2,200.000

Nota: En la tabla se muestra la cantidad recibida y facturada de larvas de *Litopenaeus vannamei* para el inicio de siembra.

2.2.1 Selección de las bacterias probióticas.

Las bacterias probióticas se tomaron de los productos comerciales que son utilizados en el agua y como aditivo. La selección de las bacterias probióticas se realizó mediante la etiqueta de composición del producto comercial (Tabla 3) que sirve para identificar el tipo de bacterias que está en estudios. Se activó la bacteria en 9ml de agua destilada en tubos de ensayos colocando 1g de producto comercial en polvo y 1ml para el producto comercial líquido dejando reposar por 15 minutos.

Tabla 3.

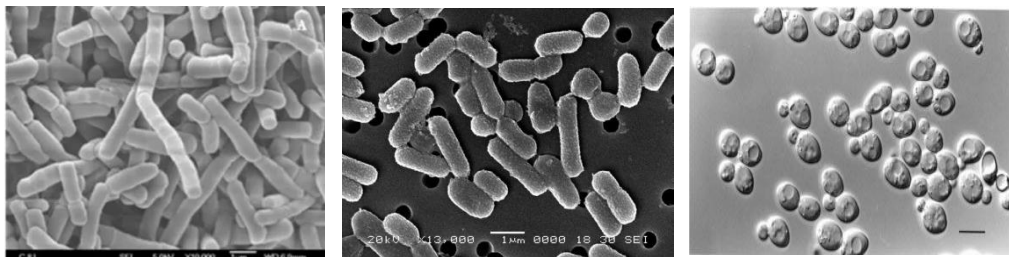
Ficha técnica de productos que contienen bacterias probióticas

	Análisis físico	Composición	Concentración UFC
Producto comercial 1	Aspecto: polvo, color blanco con partículas café. Olor: ninguno	Aerobios totales (<i>Bacillus spp.</i>)	4.0E+09 UFC/g mínimo
Producto comercial 2	Aspecto: líquido, color marrón. Olor: fuerte	<i>Bacillus subtilis</i>	1 × 10 ⁶ UFC/g
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	1 × 10 ⁶ UFC/g
		<i>Sacharomyces kudriavzevii</i>	1 × 10 ⁶ UFC/g
Producto comercial 3	Aspecto: polvo, color blanco Olor: ninguno	<i>Bacillus subtilis</i>	1.0 × 10 ⁹ UFC/g
		<i>Lactobacillus lactis</i>	1.0 × 10 ⁹ UFC/g
		<i>Nitrosomonas spp.</i>	1.0 × 10 ⁹ UFC/g
		<i>Nitrobacter spp.</i>	1.0 × 10 ⁹ UFC/g

Nota: Se presenta una descripción de la composición del contenido de los productos comerciales que se utiliza para la investigación.

Figura. 6

Especies de bacterias de fichas técnicas



Bacillus subtilis

Autor: Maggio 22 (2022)

L. plantarum

Autor: Valan et al., (2015)

S. kudriayzevii

Autor: Robert N Ian (2000)

2.3. FASE DE LABORATORIO

2.3.1. Preparación de los medios de cultivo

Agar TSA

Rehidratar 4g de TSA en 100 ml de agua destilada, se añade SS al 2%. Posteriormente calentar agitando hasta el punto de ebullición por unos minutos hasta disolver, esterilizar en autoclave 120°. Vaciar en las cajas Petri estéril y dejar reposar hasta que se solidifique.

Agar TCBS

Rehidratar 8.8g en 100 ml de agua destilada calentar hasta disolver, dejar enfriar y colocar en cajas Petri respectivamente estéril hasta que se coagule el líquido.

Agar TSB: Colocar en un tubo de ensayo 30g x 40ml de agua destilada.

Agar LB: Verter en el tubo de ensayo 25g x 40ml de agua destilada.

Para los agares líquidos TSB y LB se utiliza filtro de jeringa WATMAN con membrana de PVDF de 0.22µm para evitar residuos en el medio líquido, se esteriliza en autoclave a 120°C.

2.3.2 Cultivo correspondiente en medio agar de bacterias probióticas.

Las bacterias probióticas se cultivaron en Agar de Soja Trípica (TSA) con 2% de NaCl se incubaron durante 18h a 30 °C. Se aisló una muestra de colonia de cada caja petrí para llevar a cabo una réplica y tener la veracidad de las bacterias en buen estado, se sembraron mediante la técnica de aislamiento por agotamiento de estrías.

Posteriormente, se procedió a trasladar una colonia individual a un medio líquido Trypto-Casein Soy Broth (TSB), caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 30°C. Para la observación en el microscopio de barrido se toman en cuenta los cultivos de TSA (agar sólido) y de medio líquido TSB, LB.

2.3.3. Preparación de las muestras previo a la observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM)

Para la observación de las muestras por SEM se aplicó el protocolo de (Ramirez et al., 2021) que consiste: se extraen colonias de los cultivos de las bacterias probióticas de las cajas Petri (TSA + NaCl al 2%), y se les adiciona 1 ml de solución salina (SS) y se homogeniza cuidadosamente evitando que la bacteria tenga un daño o rompimiento celular, posteriormente las muestras se someten a dos lavados

consecutivos después de una centrifugación de 600 rpm en centrifuga (modelo EBA 20), para luego de una suspensión bacteriana formar un pellet y eliminar así gradualmente el exceso de NaCl. Para observar las bacterias probióticas mediante (SEM) en modo transmisión, se deposita 5 μ L en una malla GRID de 300, se añade la solución de contraste ácido fosfotúngstico 1% (PTA) que permite la tinción de la bacteria. El exceso de la solución de contraste se retira con papel de filtro Whatman, las mallas GRID se observan en un microscopio electrónico de barrido TESCAN MIRA3 FEG-SEM utilizado en modo de transmisión, donde se compone de una fuente que emite un haz de electrones dirigido directo hacia un punto exacto de la muestra permitiendo la liberación de electrones que se dirigen a un detector donde emitirá la construcción de la imagen con un barrido hacia la pantalla para la respectiva observación e identificación y descripción.

Figura 7.

Microscopio electrónico de barrido TESCAN MIRA3 FEG-SEM



Fuente: Cindy Baque

Para las muestras de medio líquido se coloca en la malla 10 μL de la muestra, se deja reposar por 1 min para luego colocar la solución de tinción ácido fosfotúngstico 1% se limpian los desechos rápidamente después de 1s, seguidamente se realiza un lavado de 10 μL de agua destilada a la muestra y se retira con papel de filtro Whatman.

2.3.4. Descripción de bacterias probióticas observadas en el microscopio.

Para realizar la descripción de las muestras analizadas en el microscopio electrónico de barrido (SEM), en el cual, se identifican características morfológicas externas, como parte de la bibliografía se tomaron en cuenta el protocolo de (Fernández et al., 2010) y revisiones bibliográficas. En el que considera estos aspectos externos como forma, tamaño, bordes laterales, disposición, formas irregulares, extremos, utilizados para la identificación en preparaciones teñidas.

2.3.5. Método de evaluación de carga bacteriana del agua y de larvas.

La carga bacteriana se determina con un estudio bacteriológico del agua y larva de los tanques 8, 19, 42 donde se aplican las bacterias probióticas. Las muestras se recolectaron por la mañana en recipientes transparentes para ser trasladados al laboratorio de bacteriología. Para cultivos de *Vibrios* se siembran 100 μL de agua en muestras de placas con agar TCBS, y 100 μL en Agar Tripticasa Soya (TSA) para la revelación de bacterias totales, se utilizó método de siembra directa.

Las muestras de larva se recolectaron desde zoea 2, se coloca 1g de larva en tubos Eppendorf de 2ml y son diluidas en solución de cloruro de sodio al 5% para la siembra de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Se utiliza el método de diluciones seriadas. Para realizar el cálculo de conteo en UFC/ml se toma la siguiente formula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{mL}}{\text{dilución}}$$

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

2.4.1. Evaluación de supervivencia de larvas de camarón

Para realizar la evaluación de la supervivencia de las larvas que contienen en su sistema digestivo las bacterias probióticas en estudio, se utilizará los siguientes métodos: de observación directa, y cálculos de porcentaje poblacional, se los presentará en un análisis de datos estadísticos.

Se realizará el cálculo de supervivencia poblacional en porcentajes, iniciando con total de siembra de larvas en cada tanque, se dividirá el tanque en 3 partes iguales para introducir un recipiente y obtener las larvas para proceder a contar, se realizará la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de supervivencia.

$$= \frac{\text{total de larvas contadas en los recipientes} \times \text{total de toneladas de agua del tanque}}{0.75}$$

$$= \frac{\text{total de larva en cada tanque}}{\text{total de siembra}} = \%$$

Así mismo, se tomará en cuenta el desarrollo en cada etapa de la larva de *Litopenaeus vannamei* para control de enfermedades o mal formaciones.

En las pruebas estadísticas, se determina la normalidad de los datos utilizando una prueba de Anderson-Darling. Después, se realiza una prueba de igualdad de varianzas (Homocedasticidad de Levene y Barlett). Para el análisis de TSA se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, cabe destacar, que comparado los resultados en TCBS se aplicó un ANOVA de una vía ($p < 0,05$) como valor significativo y finalmente, un Test a Posteriori de TUKEY ($p < 0,05$). Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el Software MINITAB versión 19.0.

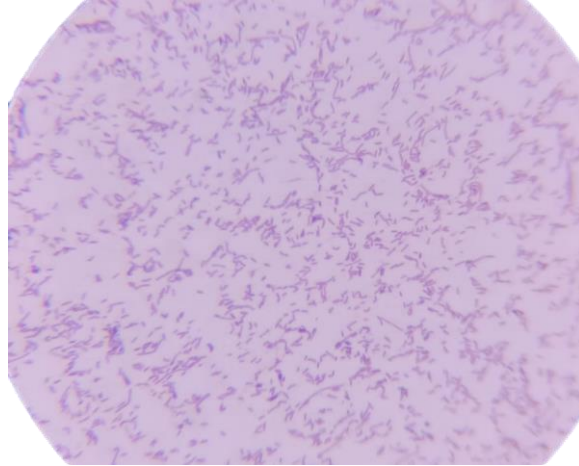
CAPITULO III. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Los resultados de caracterización externas de las bacterias probióticas de los productos comerciales mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) TESCAN MIRA3 FEG-SEM, visualizaron que el producto comercial 1, perteneciente al género *Bacillus*, tienen forma alargadas que se detalla en las características (Figura 9, 10, 11, 12). En la descripción del producto comercial establece que se encuentran compuesto por aerobios totales, se verificando la descripción mencionada mediante prueba de tinción de GRAM con un resultado de bacterias teñidas de color morado, complementando la caracterización revelan *Bacillus* de color morado clasificadas en GRAM positivos (GRAM+) (Figura 8).

Figura 8.

Tinción GRAM de producto comercial 1



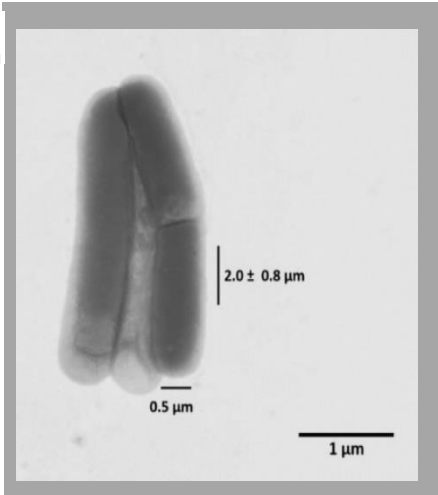
Nota: Tinción GRAM, revelando bacillus GRAM +.

Fuente: Cindy Baque

Figura 9.

Características de bacteria observada en SEM

Forma celular:	Bacillus
Agrupación celular:	Diplobacilus
Pared Celular:	Presente
Tamaño:	Largo: $2.0 \pm 0.8 \mu\text{m}$ Ancho: $0.5 \mu\text{m}$
Cápsula	Ausente
Bordes laterales:	Paralelos
Extremos:	Redondos
Disposición:	Pareja

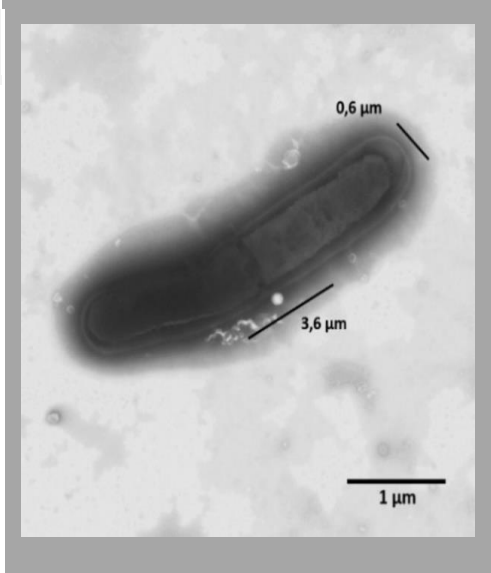
A scanning electron microscope (SEM) micrograph showing a pair of rod-shaped bacteria (diplobacillus) joined together. The bacteria are dark against a light background. A vertical scale bar to the right of the bacteria is labeled $2.0 \pm 0.8 \mu\text{m}$. A horizontal scale bar below the bacteria is labeled $0.5 \mu\text{m}$. A larger horizontal scale bar at the bottom right is labeled $1 \mu\text{m}$.

Nota: Micrografía electrónica SEM de *bacillus*, medidas de largo $2.0 \pm 0.8 \mu\text{m}$ y ancho $0.5 \mu\text{m}$.

Autor: Cindy Baque

Figura 10.

Características de bacteria observada en SEM.

Forma celular:	Bacilos	
Tamaño:	Largo: 3.6 µm Ancho: 0.6 µm	
Cápsula	Presente	
Membrana plasmática	Presente	
Bordes laterales:	Paralelos	
Extremos:	Redondo	
Disposición:	Solitaria	

Nota: Micrografía electrónica (SEM) de *bacillus* con membrana plasmática.

Autor: Cindy Baque

Figura 11.

Características de bacteria observada en SEM.

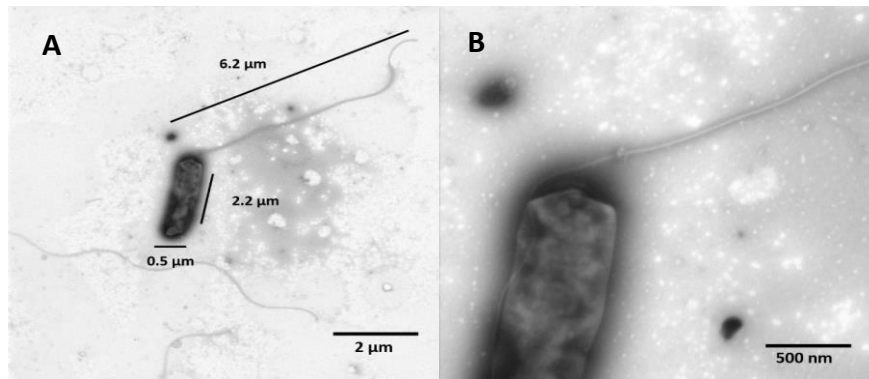
Forma celular:	Bacilos	
Agrupación celular:	Diplobacilos	
Tamaño:	Largo: 2.2 ± 0.3 µm Ancho: 0.5 µm	
Cápsula	Ausente	
Bordes laterales:	Paralelos	
Extremos:	Redondo	
Disposición:	Tétradas	

Nota: Micrografía electrónica (SEM) de *Bacillus* con medidas de largo 2.2 ± 0.3 µm y ancho 0.5 µm.

Autor: Cindy Baque

Figura 12.

Características de bacteria observada en SEM.



Nota: A. Micrografía electrónica (SEM) de *bacillus* con presencia de flagelo B. Parte del inicio del flagelo monótrico de la bacteria.

Autor: Cindy Baque

Forma:	Bacilos
Tamaño:	Largo: 2.2 μm Ancho: 0.5 μm
Cápsula	Ausente
Bordes laterales:	Paralelos
Extremos:	Redondo
Disposición:	Solitario
Forma:	Bacilos

La posición del flagelo que presenta la bacteria (Fig.12) es monótrico, es decir, solo tiene uno, que mide aproximadamente 6.2 μm

La microscopia electrónica de barrido SEM en el producto comercial 1 revelo *bacillus* con tamaños de largo de 2 μm y ancho de 0.5 μm , con presencia de flagelo largo monótrico con una medida de 6,2 μm (Figura 12) que sirve para a movilidad

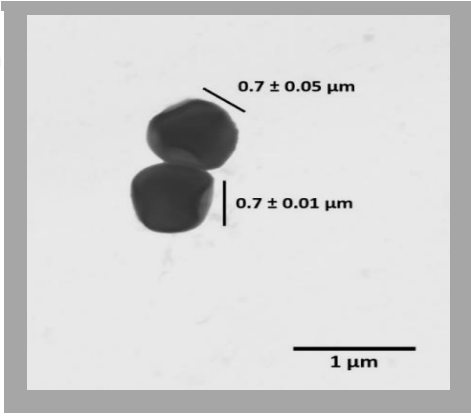
de la bacteria, en sus estructuras externas la bacteria presenta una cápsula que envuelve a la célula y sirve para la protección, además, ayuda a que se adhiera a superficie. Las bacterias presentaron en su mayoría bordes paralelos iguales, la observación de la presencia de la membrana plasmática en la bacteria de la figura 4 es de utilidad porque permiten el paso de entrada y salida de sustancias.

PRODUCTO COMERCIAL 2

En el producto comercial 2 la caracterización externa de las bacterias probióticas analizadas a través de microscopia SEM presentaron bacterias del género *Bacillus*, y levaduras como lo establece en su descripción técnica del producto comercial. (Figura 13, 14, 15, 16).

Figura 13.

Características bacteria observada en SEM.

Forma celular:	Esferas	
Agrupación celular:	Se muestran esferas en parejas	
Tamaño:	Largo: $0.7 \pm 0.01 \mu\text{m}$ Ancho: $0.7 \pm 0.05 \mu\text{m}$	
Bordes laterales:	Paralelos	
Extremos:	Redondo	
Disposición:	Pareja	

Nota: Micrografía electrónica (SEM) de bacteria en forma esférica agrupada en parejas.

Autor: Cindy Baque

Figura 14.

Características de bacteria observada en SEM.

Forma celular:	Bacilos	
Agrupación celular:	Diplobacilos	
Tamaño:	Largo: $2.6 \pm 0.07 \mu\text{m}$ Ancho: $0.4 \pm 0.08 \mu\text{m}$	
Cápsula	Ausente	
Bordes laterales:	Paralelos	
Extremos:	Redondo	
Disposición:	Agrupadas	

Nota: Micrografía electrónica (SEM) de *bacillus* agrupadas con medidas de longitud de $0.7 \pm 0.01 \mu\text{m}$

Autor: Cindy Baque

Figura 15.

Características de bacteria observada en SEM.

Forma:	Bacilos	
Tamaño:	Largo: $2.1 \mu\text{m}$ Ancho: $0.5 \mu\text{m}$	
Cápsula	Ausente	
Bordes laterales:	Paralelos	
Extremos:	Redondo parte superior, puntiagudo inferior	
Disposición:	Solitario	
Flagelo	$6.7 \mu\text{m}$	

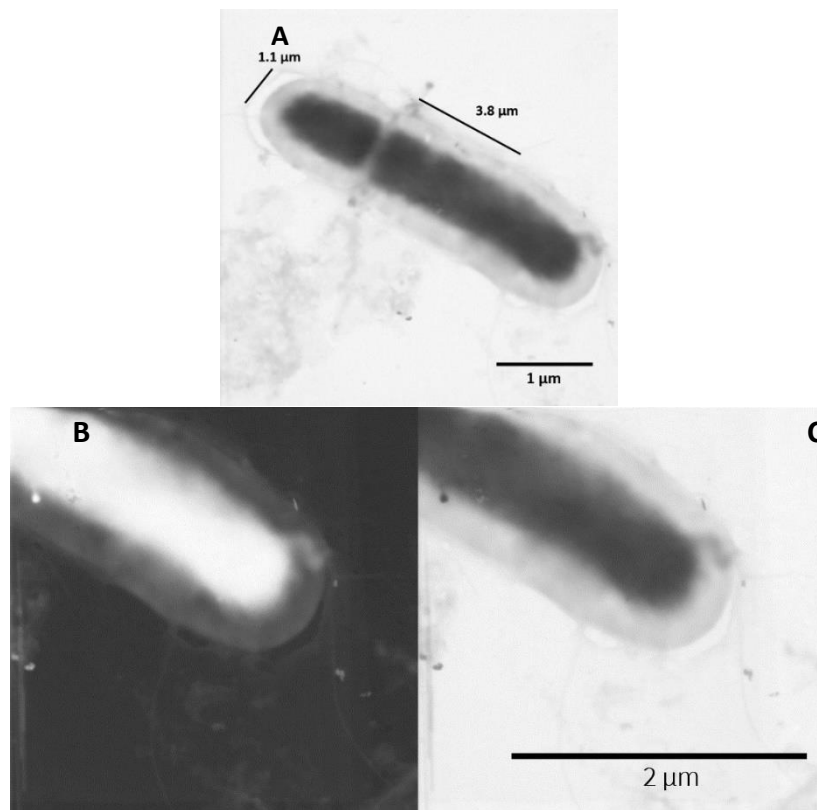
Nota: Micrografía electrónica (SEM) de *bacillus* con flagelo monotrico.

Autor: Cindy Baque

La bacteria presente se muestra con un solo flagelo con medidas de 6.7 μm , por lo tanto, es monótrico (Figura 15).

Figura 16.

Características de bacteria observada en SEM.



Nota: **A.** Se observa una bacteria con cápsula presente. **B.** Fimbrias de bacteria en TE-DF (electrones transmitidos de campo oscuro). **C.** Fimbrias de bacteria en TE-BF (electrones transmitidos de campo claro).

Autor: Cindy Baque

Forma celular:	Bacilos
Tamaño:	Largo: 3.8 μm ; Ancho: 1.1 μm
Pared celular	Presente
Cápsula	Presente
Bordes laterales:	Paralelos
Extremos:	Redondos
Disposición:	Solitario

Las bacterias presentan estructuras como fimbrias, de tamaño corto y más numerosas, rodeando la parte externa de la bacteria (figura 7. B-C).

Las bacterias presentes observadas, mostraron en su estructura celular la presencia de flagelos de gran tamaño que miden 6.7 μm y fimbrias alrededor de la pared celular que le permite a su motilidad y la adhesión de la célula para colonizar al intestino del camarón. La diversidad de las formas, también muestra una bacteria esférica con medidas 0.7 μm de largo y ancho 0.7 μm con un diámetro de partes iguales agrupadas en parejas, y bacterias de forma alargada con medidas de 3,8 μm a 2,6 μm de longitud. La usencia de la cápsula en las bacterias observadas no crea un riesgo en la multiplicación ni el crecimiento.

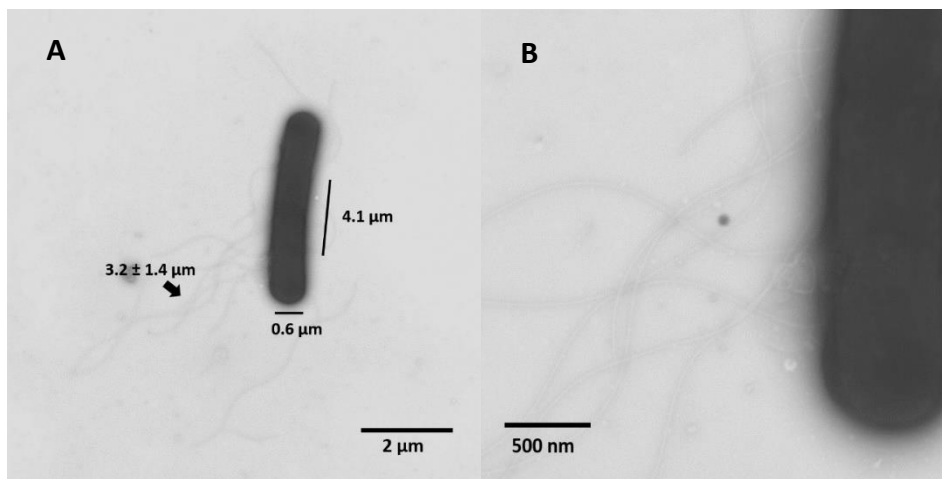
PRODUCTO COMERCIAL 3

La microscopia electrónica SEM del producto comercial 3 reveló la presencia de bacterias en forma de *Bacillus* (Figura 17, 18, 19, 20) con presencia de fimbrias y

formas de bacterias esféricas. En la ficha técnica del producto comercial 3 se detalla la presencia de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas spp*, *Nitrobacter spp*. este producto de aspecto físico polvo es aplicado en agua y en el alimento.

Figura 17.

Características de bacteria observada en SEM.



Nota: **A.** Micrografía electrónica (SEM) con presencia de flagelos en sus extremos. **B.** Flagelos.

Autor: Cindy Baque

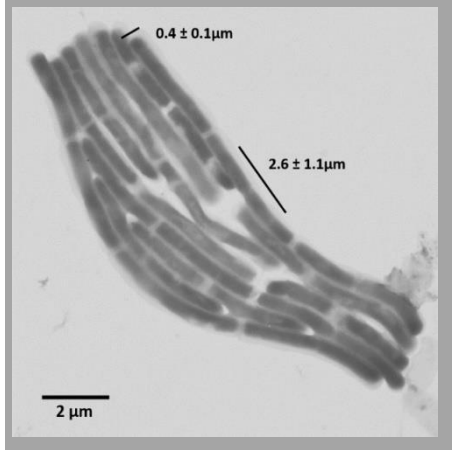
Forma celular:	Bacilos
Tamaño:	Largo: 4.1 μm; Ancho: 0.6 μm
Cápsula	Ausente
Bordes laterales:	Paralelos
Extremos:	Redondos
Disposición:	Solitario

La flagelación peritrica es la posición que presenta esta bacteria en estudio, está rodeada por varios flagelos en la parte externa de su estructura, cada flagelo llega a

medir una media $3.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (Figura 17 A-B) teniendo una longitud cortas y largas.

Figura 18.

Características de bacteria observada en SEM.

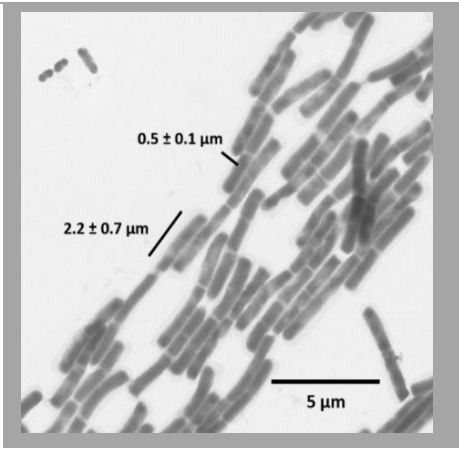
Forma celular:	Bacilos	
Agrupación celular:	Streptobacilos	
Tamaño:	Largo: $2.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$ Ancho: $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$	
Cápsula	Presente	
Bordes laterales:	Paralelos y cóncavo	
Extremos:	Redondos	
Disposición:	Agrupadas	

Nota: Micrografía electrónica (SEM) de bacterias agrupados con descripción de características del lado izquierdo.

Autor: Cindy Baque

Figura 19.

Características de bacteria observada en SEM.

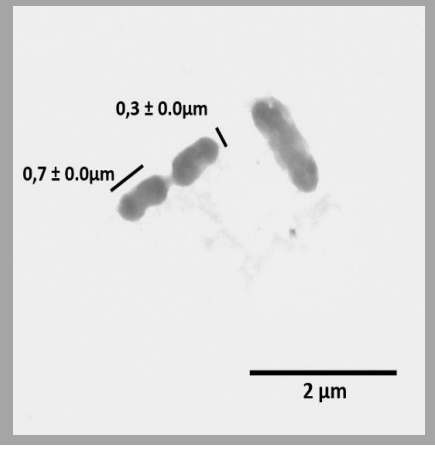
Forma celular:	Bacilos	
Agrupación celular:	Streptobacilos	
Tamaño:	Largo: $2.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ Ancho: $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$	
Cápsula	Presente	
Bordes laterales:	Paralelos	
Extremos:	Redondos	
Disposición:	Cadenas	

Nota: Micrografía electrónica (SEM) de *bacillus* formadas en cadenas. *Autor:* Cindy Baque

Figura 20.

Características de bacteria observada en SEM.

Forma celular:	Bacillus
Agrupación celular:	Diplobacillus
Tamaño:	Largo: $0.7 \pm 0.0 \mu\text{m}$ Ancho: $0.3 \pm 0.0 \mu\text{m}$
Cápsula	Ausente
Bordes laterales:	Cóncavo
Extremos:	Redondos
Disposición:	Pareja



Nota: Micrografía electrónica (SEM) de bacterias con forma esféricas.

Autor: Cindy Baque

Las micrografías estudiadas revelan la presencia predominante del género *bacillus*, en el producto comercial 3. Bacterias que se encuentran en parejas, agrupadas y en forma de cadenas, además, de presencia de flagelo peritrico es decir, varios flagelos alrededor de la bacteria con medidas aproximadas de $3,2 \pm 1.4 \mu\text{m}$. Algunas bacterias probióticas agrupadas presentan los bordes laterales cóncavos. Los *bacillus* presentes tienen medidas de longitud de $4.1 \mu\text{m}$ a $0,7 \mu\text{m}$ y ancho de $0,6 \mu\text{m}$ a $0,5 \mu\text{m}$ con extremos redondos.

3.2. ANÁLISIS DE CARGA BACTERIANA

NAUPLIO 5

El análisis de la carga bacteriana en el cultivo larvario de camarones se evaluó en el agua de producción y en las larvas en los tanques 8, 19, 42. Se realizó el primer análisis de agua en cultivo bacteriano de Agar TSA (para bacterias totales) y TCBS (para vibrios) en nauplios 5. Como resultando, el número de colonias en TSA se presentaron como promedio en los tanques evaluados: tanque 8 (380 UFC/ml), tanque 19 (258 UFC/ml), tanque 42 (236 UFC/ml)

Tabla 4A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales en agua en nauplio 5.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	380 ± 0
Tanque 19	258 ± 0
Tanque 42	236 ± 0

Nota: Los resultados obtenidos indica la mediana y DS.

En TCBS el tanque 8 (1 UFC/ml) con presencia de colonias amarillas (*Vibrio alginolyticus*), tanque 19 (12 UFC/ml) encontrando colinas verdes (*Vibrio parahemolyticus*) y tanque 42 que no presentó ningún tipo de colonia. En este análisis de agua se logró observar la presencia de colonias verdes y amarillas.

Los resultados en TCBS mediante un análisis de varianza ANOVA y la prueba de TUKEY en los tanques 8, 19 y 42 se determinó la Media y desviación estándar.

Tabla 4B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en el agua en nauplio 5

Colonias	Muestras	Media \pm DS.
<i>V. algynolyticus</i>	3	4,00 \pm 0,57
<i>V. parahemolyticus</i>	3	0,33 \pm 6,93

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. algynolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	3,67	0,91	0,413

Nota: UFC/ml en TCBS de los tanques de cultivo 8, 19, 42 en Nauplio 5 de *Litopenaeus vannamei*.

Las colonias son representadas por especie. Los resultados obtenidos se presentan en Media \pm DS.

Datos de T-Value y P-Value.

ZOEA 2

En zoea 2 la carga bacteriana en el agua analizada en cultivo de TSA, el tanque 19 con 1,90E+03 UFC/ml con una carga bacteriana elevada se diferencia de tanque 8 con valores de 1,80E+03 UFC/ml y tanque 42 con 1,07E+03 UFC/ml. Se observa que el tanque 19 tiene un mayor número de colonias totales.

Tabla 5A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de bacterias totales en agua de zoea 2.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	180 \pm 0
Tanque 19	190 \pm 0
Tanque 42	107 \pm 0

Nota: Valores obtenidos de mediana \pm D.

En TCBS el tanque 8 presentó mayor cantidad de UCF $6,40E+02$ UFC/ml, demostrando que los tanques 19 valores de $3,00E+02$ UFC/ml y tanque 42 representa valores de $5,00E+01$ UFC/ml es donde se encontraron menor cantidad de colonias amarillas, cabe mencionar que en el tanque 8 y 19 se encontraron colonias amarillas (*Vibrio alginolyticus*) pero hubo una cantidad pequeña de colonias verdes, *Vibrio parahemolyticus*.

Tabla 5B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en el agua en zoea 2.

Colonias	Muestras	Media \pm DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	30,7 \pm 28,3
<i>V. parahemolyticus</i>	3	2,33 \pm 2,08

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-28,3	-1,73	0,159

Nota: UFC/ml en TCBS de los tanques de cultivo 8, 19, 42 en zoea 2 de *Litopenaeus vannamei*.

Las colonias son representadas por especie. Los resultados obtenidos se presentan como Media \pm

DS.

Los resultados en análisis de TSA en las larvas demostraron que la carga bacteriana es severa, el tanque 8 se observó $4,97E+05$ UFC/ml y el tanque 19 con $5,29E+05$ UFC/ml son los tanques que presentan mayor cantidad de colonias totales el a diferencia de tanque 42 un total de $3.11E+05$ UFC/ml.

Tabla 6A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales en larva zoea 2.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	497 ± 0
Tanque 19	529 ± 0
Tanque 42	311 ± 0

Nota: Los resultados obtenidos se presentan como la mediana ± DS.

En TCBS se muestran colonias color amarillo (*Vibrio alginolyticus*) con mayor presencia (Figura 17B). El tanque 8 presentó un mayor número de colonias 8,90E+03 UFC/ml todas de color amarillo al igual que el tanque 42 con una cantidad de 1,7E+03 UFC/ml. En zoea 2 en las larvas el tanque 19 presentaron colonias de color verde 2,0E+02 (*Vibrio parahaemolyticus*).

Tabla 6B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en larva zoea 2

Colonias	Muestras	Media ± DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	35,3 ± 47,2
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	0,66 ± 1,15

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahaemolyticus</i>	-34,7	-1,27	0,273

Nota: UFC/ml. de TCBS en larvas, representa la media.

MYSIS 2

En el estadio de mysis 2, los análisis bacteriológicos en el agua determinaron que en TSA el tanque 42 tiene un número alto de bacterias totales $3,2E+03$ UFC/ml, similar al tanque 19 que tiene $3.1E+03$ UFC/ml de colonias.

Tabla 7A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de bacterias totales en agua de mysis 2.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	252 ± 0
Tanque 19	312 ± 0
Tanque 42	326 ± 0

Nota: UFC/ml de agua en TSA en cada tanque de mysis 2 de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados obtenidos se presentan como barra representando la Media \pm DS.

En TCBS se observaron presencia de vibrios con colonias amarillas en todos los tanques manteniéndose un grado de severidad normal. En el tanque 8 el número de colonias es de $9,6E+02$ UFC/ml, el tanque 19 se encontró $6,0E+02$ UFC/ml de colonias y el tanque 42 presentó valores aproximados al tanque 8 demostrando que no existe diferencias significativas en ningún tanque.

Tabla 7B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en agua en mysis 2

Colonias	Muestras	Media \pm DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	$79,0 \pm 18,1$
<i>V. parahemolyticus</i>	3	$27,0 \pm 46,8$

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-52,0	-1,80	0,147

Nota: Los resultados obtenidos se presentan la Media \pm DS. Con valores de p-value de 0,147

El análisis bacteriológico en larvas demuestra que en TSA el número de colonias totales son similares entre todos los tanques, 2,81E+05 UFC/ml (tanque 8), 2,83E+05 UFC/ml (tanque 19) y 2,3E+05 UFC/ml (Tanque 42).

Tabla 8A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales en larva en mysis

2.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	281 \pm 0
Tanque 19	283 \pm 0
Tanque 42	238 \pm 0

Nota: Resultados de Kruskal-Wallis de mediana \pm DS. El cero representa DS.

En los cultivos de TCBS en larva, las cargas bacterianas presentan un cargo de severidad elevado en vibrios para el tanque 8 con valores de 6,4E+03 UFC/ml de colonias amarillas (*Vibrio alginolyticus*), En el estadio de mysis 2 en el tanque 19 se observaron colonias verdes (*Vibrio parahemolyticus*) con UFC 3,00E+03 UFC/ml, mientras el tanque 42 presenta una mínima cantidad de colonias color amarilla de *Vibrio alginolyticus* que se representa en valores en 3,00E+02 UFC/ml.

Tabla 8B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas de larva en mysis 2

Colonias	Muestras	Media ± DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	22,3 ± 36,1
<i>V. parahemolyticus</i>	3	10,0 ± 17,3

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-12,3	-0,53	0,622

Nota: UFC/ml de larva de *Litopenaeus vannamei* en cada tanque de mysis 2. Los resultados obtenidos se presentan como la Media ± DS.

POSTLARVA 1

Como resultado en los análisis de agua en postlarva 1 (PL 1) los valores de TSA para bacterias totales en tanque 8 en 2,8E+03 UFC/ml con mayor cantidad de colonias a diferencia del tanque 19 con 1,9E+03 UFC/ml y tanque 42 1,6E+03UFC/ml.

Tabla 9A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales en agua de Postlarva 1.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	283 ± 0
Tanque 19	190 ± 0
Tanque 42	196 ± 0

Nota: Según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis no existe diferencias, los valores representan la mediana y desviación estándar.

Los resultados en TCBS en el tanque 8 la carga bacteriana en vibrios es menor que los demás tanques, el total de colonias amarillas es $9,6E+02$ UFC/ml. El tanque 19 el número de colonias que se contabilizó $6,0E+02$ y el tanque 42 el total de colonias fue de $6,4E+02$ en los dos tanques se observaron colonias de color verde y amarillas. El total de colonias verde para el tanque 19 fue 4 UFC/ml y en el tanque 42 se contaron 4 UFC/ml. Estadísticamente si se presentaron diferencias entre los dos tipos de colonias ($p < 0,05$) (Figura 9B)

Tabla 9B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas del agua de Postlarva 1.

Colonias	Muestras	Media \pm DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	50,3 \pm 13,43
<i>V. parahemolyticus</i>	3	2,67 \pm 2,31

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-47,67	-6,06	0,0004

Nota: UFC de agua en cada tanque de Postlarva 1 de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados obtenidos se presentan como la Media \pm DS.

En los resultados en larva de *Litopenaeus vannamei* en TSA se mantienen con un grado de severidad elevado en bacterias totales en los tres tanques en el 8 se observó un total de $2,0E+05$ UFC/ml, en tanque 19 un total de $1,3E+05$ UFC/ml y el tanque 42 $1,8E+05$ UFC/ml.

Tabla 10A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales de larva en Postlarva 1.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	207 ± 0
Tanque 19	135 ± 0
Tanque 42	181 ± 0

Nota: UFC/ml de larva en cada tanque de Postlarva 1 de *Litopenaeus vannamei*. Las letras iguales representan que no hay diferencias significativas.

A diferencia de resultados en TCBS donde el tanque 42 tiene un valor de 2,5E+04 UFC/ml alcanzando un grado de densidad elevado en *V. alginolyticus* representado en su totalidad de colonias amarillas, comparado con los tanques 19 que representan un nivel bajo de colonias 4,0E+02 UFC/ml en el cual se observó colonias verdes y colonias amarillas. Acorde con los datos estadísticos en larva, PL1 la diferencia de la media entre las dos colonias es de -91,0.

Tabla 10B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas en larva en Postlarva 1.

Colonias	Muestras	Media ± DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	91,3 ± 141,0
<i>V. parahemolyticus</i>	3	0,33 ± 0,57

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-91,0	-1,12	0,326

Nota: UFC de larva en cada tanque de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados obtenidos se presentan como la Media \pm DS. El color está representado por especies de vibrios.

POSTLARVA 6

En los resultados obtenidos en el análisis bacteriológico del agua en TSA para Postlarva 6 (PL 6) en el tanque 8 el número de colonias encontrada fue 1,6E+03 UFC/ml, en el tanque 19 fueron 1,7E+03 UFC/ml y finalmente para el tanque 42, 2,0E+03 UFC/ml que presenta mayor cantidad de colonias totales.

Tabla 11A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales de agua en Postlarva 6.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	160 \pm 0
Tanque 19	174 \pm 0
Tanque 42	201 \pm 0

Nota. Los resultados obtenidos se presentan como la Mediana \pm DS.

En TCBS el número de colonias encontradas tubo un grado de severidad similares en el estadio anterior (PL 1), el tanque 19 disminuye la carga bacteriana a 1,9E+02 UFC/ml encontrado colonias amarillas. EL tanque 8 y 42 presentaron una pequeña

cantidad de 1 UFC/ml de color verde (*V. parahemolyticus*) en cada tanque, pero las colonias amarillas se presentaron en mayor cantidad.

Tabla 11B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas del agua de Postlarva 6.

Colonias	Muestras	Media ± DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	82,0 ± 103,1
<i>V. parahemolyticus</i>	3	0,66 ± 0,57

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-83,3	-1,37	0,244

Nota: UFC de agua en cada tanque 8,19 y 42 en Postlarva 1 de *Litopenaeus vannamei*. En los resultados obtenidos se presentan la Media ± DS.

Los análisis en TSA de la larva de *Litopenaeus vannamei* presentan un nivel de carga bacteriana elevada, para el tanque 8 el número de colonias fue de 5,2E+04 FC/ml el tanque con mayor número de colonias. El tanque con menor número de colonias fue el tanque 19 con 2,8E+04.

Tabla 12A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales de larva en Postlarva 6.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	52 ± 0
Tanque 19	28 ± 0
Tanque 42	34 ± 0

Nota: Valores de mediana ± DS.

A diferencia de TCBS los tanques 8, con 2,0E+02 (2 UFC/ml) y tanque 42 con un número de colonias de 7,0E+02 UFC/ml presentaron cargas bacterianas con un grado de severidad normal en vibrios, observando un reducido número de colonias amarillas (*V. alginolyticus*), en cambio, los resultados mostraron un nivel elevado de colonias 7,4E+03 en el tanque 19, observando 4 UFC/ml de colonias verdes y 70 UFC/ml de color amarillo. Cabe destacar que en las dos colonias de TCBS no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la diferencia de la media es de -24,7 con un nivel de confianza del 95% y un p-value de 0,323 (Figura 12B).

Tabla 12B.

Media de colonias amarillas y verde de larva en Postlarva 6.

Colonias	Muestras	Media ± DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	26,3 ± 37,9
<i>V. parahemolyticus</i>	3	1,67 ± 2,08

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-24,7	-1,13	0,323

Nota: UFC de larva en cada tanque 8,19 y 42 en postlarva 6. Los resultados obtenidos se presentan como la Media ± DS. Y los valores de p-value son mayores a 0,05.

POSTLARVA 9

En el estadio postlarva 9 los resultados en el análisis de agua para TSA mostraron cargas bacterianas elevadas. El tanque 8 con un alto número de colonias de 1,7E+04

UFC/ml, al igual que el tanque 42 con 1,7E+04 UFC/ml, el tanque 19 con mayor número de colonias 2,0 E+04 UFC/ml superando al tanque 8 y 42.

Tabla 13A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales del agua en Postlarva 9.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	174 ± 0
Tanque 19	205 ± 0
Tanque 42	170 ± 0

Nota: UFC de agua en cada tanque de 8,19 y 42 de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados representan la Mediana ± DS.

De acuerdo a los análisis de TCBS el tanque 8 mostró mayor número de colonias amarillas 2,0E+03 UFC/ml de *V. alginolyticus*, similar al tanque 42 con la presencia de 1 UFC/ml de color verde (*V. parahemolyticus*) y 159 UFC/ml de colonias amarillas en total el número de colonias fue de 1,6E+03. La cantidad de colonia para el tanque 19 fue 1,3E+03 UFC/ml de color amarillo. Los análisis estadísticos en postlarva 9 (PL9) en el agua demostraron que hubo diferencia significativa en TCBS entre colonias con una diferencia de la media ± de -165,3. según ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y test de Tukey.

Tabla 13B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas de agua en Postlarva 9.

Colonias	Muestras	Media \pm DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	165,7 \pm 36,5
<i>V. parahemolyticus</i>	3	0,33 \pm 0,57

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T- value	P- value
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-165,3	-7,85	0,001

Nota: UFC de agua en cada tanque 8,19 y 42 en Postlarva 9. Los resultados obtenidos presentan la Media \pm DS.

El análisis en TSA de larva demostró también que presentan un severo número de colonias de bacterias totales en todos los tanques, el tanque 8 presento una cantidad de 5,0E+05 UFC/ml mayor que en el tanque 19 con 2,4E+05 UFC/ml tanque 42 de 3,6E+05 UFC/ml

Tabla 14A.

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en bacterias totales de larva en estadio Postlarva 9.

Tanques	UFC/ml
Tanque 8	509 \pm 0
Tanque 19	242 \pm 0
Tanque 42	365 \pm 0

Nota: no existe diferencia significativa según datos no paramétricos de Kruskal-Wallis.

Los resultados en TCBS de las larvas de *L. vannamei* el tanque 8 obtuvo un mayor número de colonias amarillas $3,3E+04$ UFC/ml, los tanques 19 presentó $2,7E+04$ UFC/ml de colonias en total, con la diferencia de que se observó 1 UFC/ml de colonia verde. El tanque 42 también presentaron colonias amarillas $2,6E+04$ UFC/ml. Por consiguiente, los resultados estadísticos en postlarva 9 si existe diferencias estadísticamente significativas (p-value de 0,000) entre colonias amarillas y verde en TCBS con un nivel de confianza de 95% (figura14B).

Tabla 14B.

Prueba de TUKEY para colonias verdes y amarillas de larva en Postlarva 9

COLONIAS	MUESTRAS	MEDIA ± DS.
<i>V. alginolyticus</i>	3	290,7 ± 38,0
<i>V. parahemolyticus</i>	3	0,33 ± 0,57

Niveles de diferencia	Diferencia de media	T-VALUE	P-VALUE
<i>V. alginolyticus</i> – <i>V. parahemolyticus</i>	-290,3	-13,23	0,000

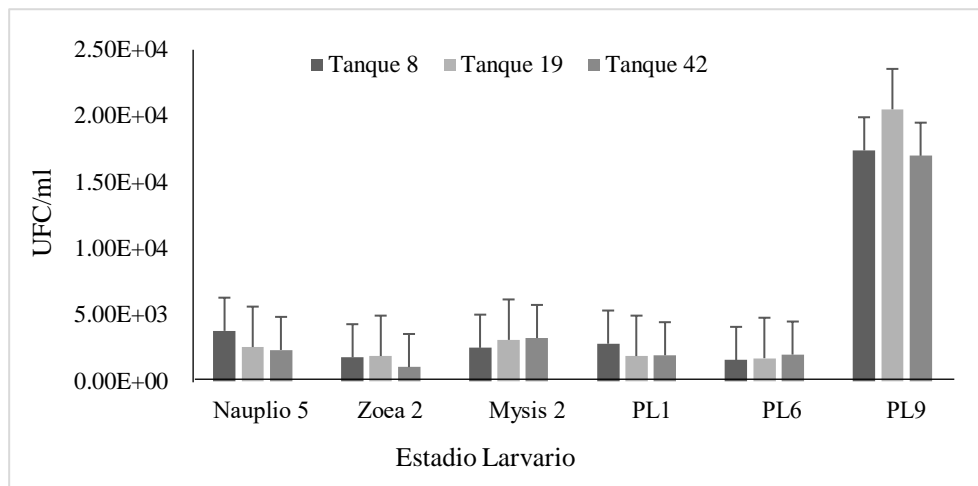
Nota: UFC/ml de larva en tanques 8,19 y 42 en postlarva 9. Los resultados obtenidos presentan la Media ± DS. La A y B representa que existe diferencia estadísticamente significativa según ANOVA de 1 vía y la Prueba de Tukey.

Los análisis en general del cultivo de agua en agar TSA se muestran en la Figura 21 donde se observa que en el los tanques 8, 19 y 42 en el estadio PL 9 es más elevado el número de carga bacteriana, al igual, que el tanque 8 en nauplio 5 también

presenta un alto número de colonias. En cambio, zoea 2 el tanque 42 resultó ser en el que menor número de colonias se formaron.

Figura 21

Unidades formadoras de colonias del agua de cultivo en Agar TSA.

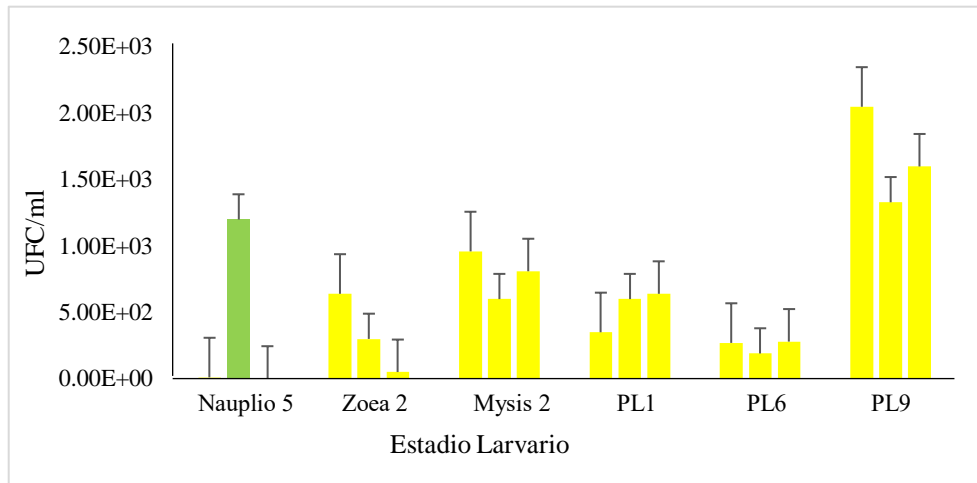


Nota: UFC/ml en TSA de cada tanque de acuerdo al estadio larvario de *Litopenaeus vannamei*.

Los resultados en TCBS para vibrios se observan de la siguiente manera, tanque 19 en el estadio de nauplio presentan un mayor número de colonias de color verde, a diferencia de los demás estadios que en su mayoría son colonias de color amarillo en todos los tanques, el estadio larvario PL9 presentó la mayor cantidad de colonias amarillas (Figura 22).

Figura 22.

Unidades formadoras de colonias amarillas y verdes del agua de cultivo en Agar TCBS.

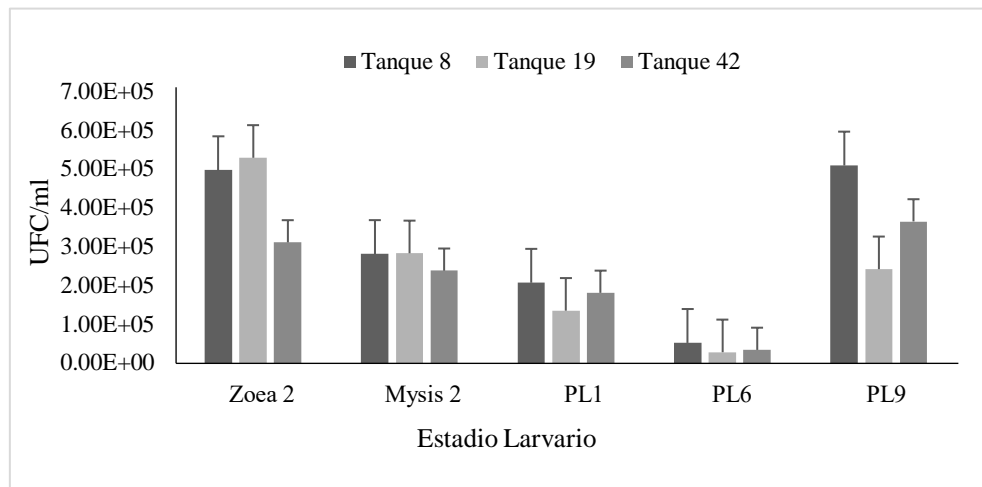


Nota: UFC/ml en TCBS en tanques de cultivo 8, 19, 42 de acuerdo al estadio larvario de Litopenaeus vannamei. El color representa las colonias.

Los estudios en larva de TSA, se observan estadios con un número alto en colonias en PL9 en el tanque 8 y zoea 2 en el tanque 8 y 19. PL 6 presenta el menor número de colonias en los tres tanques de estudio. Lo análisis bacteriológicos en agar TSA se mantiene en un nivel elevado de números de colonias (Figura 23).

Figura 23.

Unidades formadoras de colonias en larva de Litopenaeus vannamei en cultivo de Agar TSA.

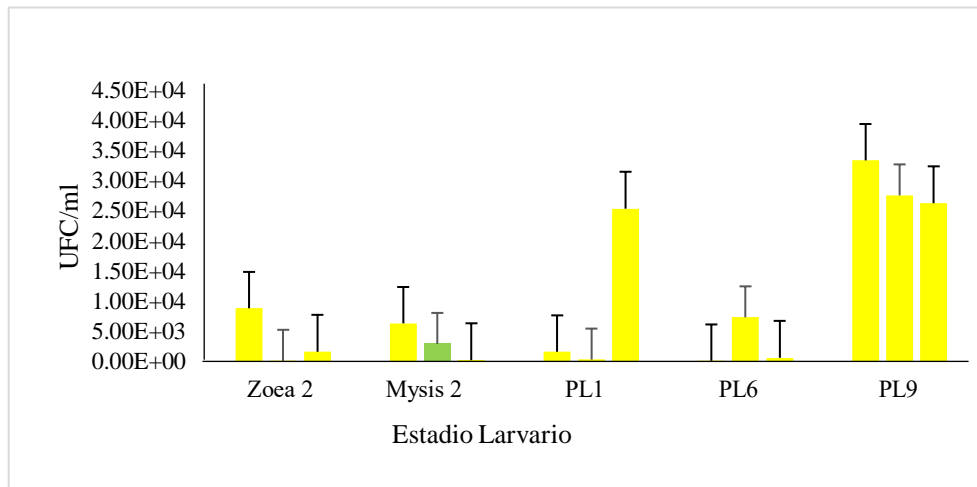


Nota: UFC/ml en TSA en tanques de cultivo 8, 19, 42 de acuerdo al estadio larvario de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados obtenidos se presentan como barras representando la Media \pm DS.

En cultivo de agar TCBS en la figura 24 se observa los números de colonias amarillas y verdes, en la mayoría de estadios larvarios las colonias que más se observaron fueron de color amarillo. En mysis 2 los resultados mostraron presencia de colonia verde (*V. parahemolyticus*) en tanque 19. El estadio PL9 presentó mayor número de colonias amarillas en los tres tanques.

Figura 24.

Unidades formadoras de colonias de larva de Litopenaeus vannamei en cultivo de Agar TCBS.



Nota: UFC/ml en TCBS de larvas de cada tanque de acuerdo al estadio larvario de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados obtenidos se presentan como barras representando la Media \pm DS.

Los análisis estadísticos determinan que la prueba de normalidad Anderson Darling, todos los valores obtenidos son normales al valor de p-value ($p > 0,05$). En la prueba de homocedasticidad (Prueba de Barlett) el p-value es mayor a 0,05 y los resultados son valores homogéneos. Para TSA (bacterias totales) los análisis fueron en prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en cada estadio para determinar la mediana. Para TCBS la prueba de ANOVA de 1 vía con un Test posterior de Tukey los datos en el análisis de agua y larva no presentan en general diferencias significativas.

3.3. SUPERVIVENCIA EN LARVAS DE CAMARONES *Litopenaeus vannamei*

En la producción de larvas de camarones *Litopenaeus vannamei* se determina la supervivencia en cada tanque, en los datos estadísticos que se emplea la Prueba de Tukey conjuntamente con ANOVA. Comprobando donde el valor de P-VALUE es superior a 0,05 en cada tanque, indicando así que no existe diferencias estadísticas.

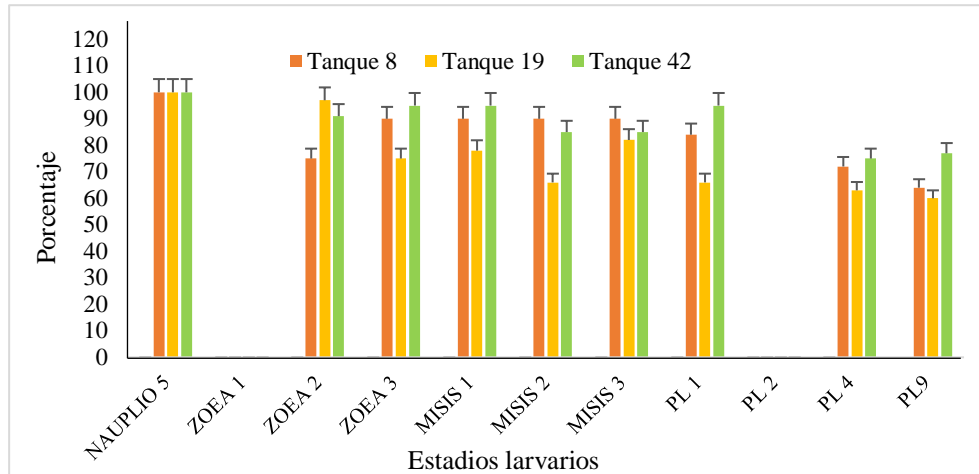
Los datos estadísticos revelaron que en el tanque 8 en los estadios zoea 3, mysis 1, mysis 2 y mysis 3 la supervivencia es de 90%, en PL4 se registra con 72%. En zoea 2 el tanque con mayor supervivencia fue el tanque 19 con 97% a diferencia de mysis 2, PL1 y PL4 que presentaron un 66% de supervivencia, de manera que es el tanque que presenta menor supervivencia, pero se encuentra en el rango de valores de supervivencia dentro del protocolo de la empresa.

En cambio, el tanque 42 se mantiene con porcentajes mayor al 75% en todos los estadios, en otras palabras, es el tanque con mayor supervivencia en larvas en los estadios larvarios de camarón *Litopenaeus vannamei*.

En la figura 25, se corrobora la información mediante Desviación Standard donde se visualiza que las líneas de cada gráfica se mantienen casi uniformes.

Figura 25.

Supervivencia total de Litopenaeus vannamei por estadio.

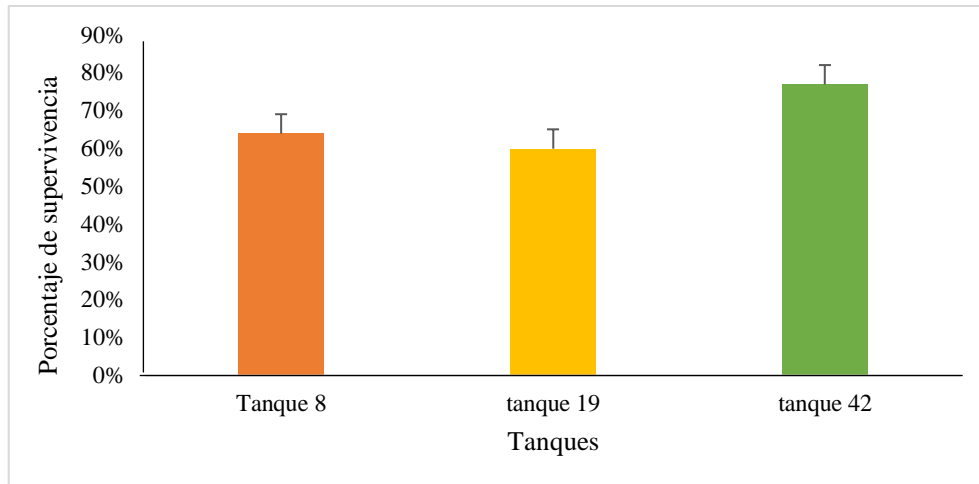


Nota: Porcentajes de supervivencia en estadios larvario de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados se presentan en barra representando la Media \pm DS

La supervivencia en general de los tres tanques analizados fue de un 66 %, basado en población total de todos los tanques hasta PL 9. El último conteo realizado en PL4 determina la biomasa del tanque 8 con 1,600.000 de larvas, representado en porcentaje de 64%. El tanque 19 representa una biomasa de 1,400.000 en porcentaje 60% y finalmente, el tanque 42 que presentó mayor supervivencia en biomasa de larvas con 1,700.000 con un porcentaje de supervivencia de 77%. (Figura 26)

Figura 26

Supervivencia total de Litopenaeus vannamei por tanque.



Nota: Porcentajes de supervivencia en cada tanque de *Litopenaeus vannamei*.

CAPITULO IV. DISCUSIONES, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1. DISCUSIÓN

En la acuicultura la salud y el crecimiento del camarón son factores claves para la rentabilidad y sostenibilidad. Una visión prometedora es el uso de las bacterias probióticas para mejorar la salud intestinal y el crecimiento del camarón. Varias cepas probióticas han demostrado tener capacidad para competir y combatir patógenos que dañan el tracto intestinal disminuyendo la colonización y la reproducción de enfermedades bacterianas.

Es primordial recalcar que las bacterias poseen características externas importantes y la variabilidad morfológica es interesante desde un enfoque científico, sin embargo, también tienen importantes intervenciones en su función y la capacidad de adaptarse en diferentes ambientes. La impresión científica y biológica de como estas estructuras externas ayudan a la supervivencia de la bacteria es mencionado en autores como (Cohen et al., 2020); (Schuech et al., 2019) exponen en un review, que la existencia o ausencia de estructuras flagelares en especies afecta directamente su morfología, fisiología y el desarrollo, en otros términos, la presencia de flagelos permiten que se muevan de manera eficiente y más rápido, estos también actúan como órganos sensoriales que detectan los estímulos o la dirección de flujo de agua.

En el presente estudio se aplicó un consorcio de probióticos identificados como producto comercial 1, 2, y 3 fueron analizados por *SEM*, donde se observó que las células del producto comercial 1 y 2 y 3 poseen apéndices en la superficie celular bacteriana representado por flagelos en células de forma alargada consideradas como bacilos como lo prescribe la ficha técnica, también en el producto comercial 2 se observó levaduras. La presencia de flagelos monótricos y flagelos perítricos, fueron observaron en las bacterias del presente estudio, siendo considerados orgánulos de motilidad únicos que no solo se utilizan para movilizarse, sino que también son esenciales para la enjambre y están constituidos por una o varias subunidades repetidas de (glico)proteínas que están unidas covalentemente o no covalentemente a estructuras lineales o ramificadas como establece Van Gerven et

al., (2011), también los flagelos no sólo facilitan la movilidad de enjambre, sino que también contribuyen a la adhesión a la superficie, facilitando así la formación de biopelículas (Merino et al., 2006).

Las características de las bacterias probióticas del estudio aplicadas en el cultivo de larvas de camarones cumplen otro mecanismo de acción de excluir las bacterias patógenas como el *Vibrio parahaemolyticus*. que se dispersa en la hepatopáncreas. Según Boyaci et al., (2016) si la densidad de vibrios pasan el límite de UFC se comunican para activar los genes responsables de la enfermedad, es cuando actúan las bacterias probióticas. Los resultados obtenidos en la presente investigación indican la presencia de colonias amarillas (*Vibrio alginolyticus*) con un recuento de densidad de 10^3 UFC/ml, y las colonias verdes (*Vibrios parahemolyticus*) en una densidad de 10^3 UFC/ml que se encuentra en menor cantidad en comparación con lo que describe Prayitno & Latchford, (1995) en lo que establece que las bacterias patógenas pueden causar daño a partir de una densidad de 10^4 UFC/ml.

La aplicación de probióticos en el cultivo de larva de camarones sigue favoreciendo el proceso de crecimiento larvario Un estudio realizado por Nimrat et al., (2012) examina la efectividad de dos probióticos (A y B) compuestos por *Bacillus*. Esta investigación demuestra que la administración de probióticos conformados por varias especies de *Bacillus* mejoró significativamente el crecimiento y la supervivencia de camarones en postlarva y aumentó las bacterias beneficiosas en

los camarones y el agua, de tal manera que la calidad de agua de cultivo mejora. En concordancia con obtenido por Nimrat et al., (2012) los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que los productos comerciales de probióticos están compuestos en su mayoría por *Bacillus* lo que permitieron obtener una estabilidad en el cultivo y una buena supervivencia.

Los productos comerciales evaluados en el presente estudio declaran en su ficha técnica la existencia de bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis*, acorde con lo establecido por Villamil Díaz & Martínez-Silva, (2009) menciona que gran parte de microorganismos probióticos planteados para el uso en la acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (LAB) este grupo de bacterias han sido considera como Generally Recognized as Safe por las siglas en inglés (GRAS), que significa Generalmente Reconocido como Seguros. Así mismo, los vibrios que al ser empleado como probióticos pueden ingresar a competir con otras bacterias impidiendo patógenos, o ayuda a incrementar resistencia de infección a los vibrios patógenos (Balcázar et al., 2007). Uno de estos vibrios que son utilizados como probiótico es el *Vibrio diabolicus* (Ili) (Ramirez et al., 2021) que se encuentra disponible comercialmente y aporta beneficios en la salud del camarón.

Los efectos beneficiosos que aportan los probióticos también depende de varios factores importantes (Toledo et al., 2019) detallan: el método de administración, la dosis, la cepa probiótica y la especie de camarones. En un análisis redactado por los

autores antes mencionados, añaden que el efecto de los probióticos en la tasa de supervivencia del camarón depende también de la fase larval de producción, dado que la mayoría de estudios realizados son en postlarvas. Sin dejar de mencionar que los probióticos son más efectivos durante los primeros estadios. Cabe destacar que este trabajo de investigación la tasa de supervivencia en las larvas de camarón fue mayor en cada estadio demostrando la eficiencia de los probióticos.

4.2. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el cultivo de larvas de camarón indican que en la aplicación del consorcio de bacterias predominando el género *Bacillus* demostraron tener estructuras externas como flagelos y fimbrias que facilitan la motilidad y adhesión a las larvas y al sistema de cultivo favoreciendo la estabilidad del cultivo larvario, teniendo un efecto protector significativo contra patógenos.

El recuento bacteriano resultante demostró la presencia de colonias verdes en cantidades menores en larvas de camarón en el estadio larvario de mysis 2 y en el agua en nauplio 5, observando ausencia en los estadios posteriores, demostrando que el consorcio probiótico aplicado en el sistema productivo impidió la proliferación de bacterias patógenas, contribuyendo de manera satisfactoria la supervivencia de las larvas de camarones.

En conclusión, los resultados obtenidos confirman que la aplicación de consorcio probiótico puede ser una estrategia efectiva para mejorar y mantener la estabilidad de un ciclo productivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

4.3 RECOMENDACIONES.

- Realizar estudios de ADN de estas bacterias probióticas que nos permitan validar el género *Bacillus* y sus diferentes tipos de especies.
- Aplicar estrategias para un buen manejo de producción, con una calidad de agua óptima para el desarrollo de la larva *L. vannamei* para evitar la presencia de enfermedades patógenas. Además, equilibrar una alimentación adecuada y balanceada aplicando alimentos comerciales específicos que contengan nutrientes necesarios para un buen crecimiento.
- Profundizar la comprensión de los mecanismos inmunitarios de camarón para seguir explorando el comportamiento de los camarones frente a patógenos.

CAPITULO V. BIBLIOGRAFÍA

- Fernández Olmos , A., García de la Fuente , C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). METODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. En E. Cercenado, & R. Cantón, *Procedimientos en Microbiología Clínica* . Seimc.
- López-López, J., Córdova-Pacheco, A., Morales-Carrasco, L., & Barona-Oñate, R. (2023). El consumo mundial de camarón: Una perspectiva de la producción. *Revista Económica*, *11*(1). doi:DOI: 10.54753/rve.v11i1.1621
- Ahmed Sumon, T., Hussain, M., Ahmed Sumon , M., Je Jang , W., Guardiola Abellan, F., Sharifuzzaman , S., . . . Hasan, M. (2022). Functionality and prophylactic role of probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture Reports*, 101-220.
- 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,. *Fish and Shellfish Immunology*, 796-808.
- Boyaci H, Shah T, Hurley A, Kokona B, Li Z, Ventocilla C, et al. (2016) Structure, Regulation, and Inhibition of the Quorum-Sensing Signal Integrator LuxO. *PLoS Biol* 14(5): e1002464. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002464>
- Brunton, L. A., Desbois, A. P., Garza, M., Wieland, B., Vishnumurthy Mohan, C., Häslér, B., . . . Guitian, J. (2019). Identifying hotspots for antibiotic

resistance emergence and selection,. *Science of the Total Environment*, 1344-1356.

Campa-Córdova, Á. I., Valenzuela-Chávez, J. A., García-Armenta, J., Medina, D., Licona-Jain, A. B., Angulo-Valadez, C. E., . . . Mejía-Ruíz, C. H. (2017). Uso profiláctico de aditivos inmunoestimulantes en el cultivo del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)*, 541-559.

Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *NOVA*, 19(36).

Chiu, S.-T., Chu, T.-W., Simangunsong, T., Ballantyne, R., Chiu, C.-S., & Liu, C.-H. (2021). Probiotic, *Lactobacillus pentosus* BD6 boost the growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via oral administration. *Fish & Shellfish Immunology*, 124-135.

Chumpol, S., Kantachote, D., Nitodab, T., & Kanzakib, H. (2017). The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation. *Aquaculture*, 473, 327-336.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.033>

Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista Elementos*, 134-141.

- Cohen, E., Nakane, D., Kabata, Y., Hendrixson, D., Nishizaka, T., & Beeby, M. (2020). *Campylobacter jejuni* motility integrates specialized cell shape, flagellar filament, and motor, to coordinate action of its opposed flagella. *PLoS Pathog*, *16*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008620>
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, *28*, 214e220.
- Dawood, U., Lin, n., Akhterc , N., Siddiqui, T., Li , S., & Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, *114*, 263-281. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.003>
- Fagr Kh., A.-G., Samah M., B., & Hesham, E. (2021). Probiotics in Aquaculture Applications. En *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms* (pág. 23). Prensa CRC.
- FAO. (2009). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*.
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). *Food and Agricultural Organization*.
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. . *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.

- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. *Organizacion de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura*. doi:<https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66., 365-378.
- García-Medeyo, D. I., Angulo, C., Escamilla-montes, R., Fierro-Coronado, J. A., Díarte-Plata, G., Gamez-jiménez, C., & luna-gonzález, a. (2020). Bacilo licheniforme antes de CristoR 4-3 aumenta inmunerespuesta y surenacimiento de *Litopenaeus vannamei* desafiado wivibrio para haemolítico IPNGS16. *Aguacultoura Internacional*(28), 2303-2318.
- Ghosh, A. K. (2023). Functionality of probiotics on the resistance capacity of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*.
- Gobernado , M., & Lopez-Hontangas, J. (2003). Identificación bacteriana. *elseiver*, 54-60.
- Gullian, M. K. (2001). *Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de Penaeus vannamei*. Guayaquil, Ecuador: Tesis de Magister en Ciencias, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.
- Hai, N. (2015). El uso de probióticos en la acuicultura. *Revista de microbiología aplicada*.

Ipohorski, M., & B. Bozzano, P. (2013). MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LA CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES. *CIENCIA E INVESTIGACIÓN - TOMO 63 N° 3* , 44-52.

Jalil Zorriehzakra, M., Torabi Delshad, S., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *VETERINARY QUARTERLY*(36:4), 228-241.
doi:<https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

Kesarcodi-Watson , A., Kaspar , H., Lategan, M., & Gibson, L. (2012). Rendimiento de probióticos de una y varias cepas durante la producción en criadero de larvas de mejillón Greenshell™, *Perna canaliculus*. *Acuicultura*, 354-355, 56-63.

Kewcharoen, W., & Srisapoome, P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish Shellfish Immunol*, 94:175-189.

Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bas, D., & Tyler, C. R. (12 de 10 de 2020). *Global Seafood ALLIANCE*. Obtenido de Global Seafood ALLIANCE: <https://www.globalseafood.org/advocate/acuacultura-de-camaron-y-exclusion-competitiva-de-patogenos/>

Kuan-Fu, L., Chiu-Hsia, C., Ya-Li, S., Winton, C., & Chun-Hung, L. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress

tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 837-844.

Kuebutornye, F., Delwin Abarike, E., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 820–828.

Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao , Q., Zhang, M., . . . Chen, L. (2018). Microbiota intestinal y su modulación para el cultivo saludable del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. *Reseñas en Fisheries Science & Aquaculture*, 26(3), 381-399.
doi:<https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1440530>

Liu , H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., & Li, Q. (2011). The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture* 317 (1), 32-36.

Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Gomez-Gil, B., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. I., Audelo-Naranjo, J. M., & Zamudio-Armenta, O. O. (2015). Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 766-775.

Luo, K., Liu, Y., Qin, G., Wang, S., Wei, C., Pan, M., . . . Tian, X. (2023). A comparative study on effects of dietary three strains of lactic acid bacteria on the growth performance, immune responses, disease resistance and

intestinal microbiota of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* .

Madhana, S., Kanimozhi, G., & Panneerselvam, A. (2021). Chapter 20 - Probiotics in Shrimp Aquaculture. *Advances in Probiotics - Microorganisms in Food and Health*, 309-325.

Maldonado Bassantes, M., & Retamales Gonzalez, R. (2012). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE AMBIENTES NATIVOS Y SU APLICACIÓN BIORREMIADORA EN EL CULTIVO DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus Vannamei*. *Revista Científica de Ciencias Naturales y Ambientales*, 1-12.

Mathan Muthu, C., Vickram, A., Bhavani Sowndharya, B., Saravanan, A., Kamalesh, R., & Dinakarkumar, Y. (2024). A comprehensive review on the utilization of probiotics in aquaculture towards sustainable shrimp farming. *Fish & Shellfish Immunology*, 147. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109459>

Merino, S., Shaw, J. G., & Tomás, J. M. (2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS microbiology letters*, 263(2), 12

Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. (2023). *Boletín de cifras. Comercio Exterior Mayo 2023*. Quito: Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca.

Mohamed T. , E.-S., Ayman A., S., Mahmoud M., A., Mustafa, S., Amira A., O., Ayman E., T., . . . Mohamed E., A.-H. (2022). Shrimp production, the most

important diseases that threaten it, and the role of probiotics in confronting these diseases: A review. *Research in Veterinary Science*, 126-140.

Mohammadi, G., Rafiee, G., Tavabe, K., Abdel-Latif, H., & Dawood, M. (2021). The enrichment of diet with beneficial bacteria (single-or multi-strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 539, 736640.

Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana* , Volumen 30(2):601-611.

Mora, X. (2012). *DIFERENCIANDO BACTERIAS GRAM+ y GRAM-*. España: Selecciones avícolas .

Mosquera Rentería, L., Cardona Bermúdez, L., Passaro Carvalho, C., & Rivera Narváez, C. (s.f.). *Probióticos y prebióticos en acuicultura*. SENNOVA (Sistema de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación).

Mukherjee, A., Chandra, ., & Ghosh, K. (2019). Single or conjoint application of autochthonous *Bacillus* strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture*, 512.

Nageswara, P., & Babu, D. (2006). Los probióticos como terapia alternativa para minimizar o evitar el uso de antibióticos en la acuicultura. *Campanas de pesca*, 26(1), 112-114.

- Newman, S. G. (2024). Shrimp farming yesterday to tomorrow. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 12-28.
- Nilsson, D. P., Jonsmoen, U., Malyshev, D., Oberg, R., Wiklund, K., & Andersson, M. (2023). Physico-chemical characterization of single bacteria and spores using optical tweezers. *Research in Microbiology*, 174(104060).
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3-4), 443-450.
- Ouwehand, A. C., Invernici, M. M., Furlaneto, F. A., & Messori, M. R. (2018). Efectividad de los probióticos de cepas Múltiple versus los de una sola cepa: Estado actual y recomendaciones para el futuro. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 52, 35-40.
- Patel, S., Shukla, R., & Goyal, A. (2015). Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of Functional Foods*, 14, 549-561. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.022>
- Pérez-Chabela, M., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 93-105.
- Pumkaew, M., Taweephitakthai, T., Satanwat, P., Yocawibun, P., Chumtong, P., Pungrasmi, W., & Powtongsook, S. (2021). Use of ozone for *Vibrio parahaemolyticus* inactivation alongside nitrification biofilter treatment in

shrimp-rearing recirculating aquaculture system. *Journal of Water Process Engineering*, 44, 102396. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102396>

Puvanasundram, P., Chong, C. M., Sabri, S., Sabri Yusoff, M., & Karim, M. (2021).

Multi-strain probiotics: Functions, effectiveness and formulations for aquaculture applications. *Aquaculture Reports* , 21(100905).

Ramírez, M., Debut, A., Alexis, F., & Rodríguez , J. (2022). Control de vibriosis en camarones mediante el manejo de la microbiota y el sistema inmunológico.

Revisión Bionatura(1), 7(2).
doi:<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.1>

Ramirez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizueté , K.,

Sonnenholzner, S., . . . Rodríguez, J. (2021). Los probióticos *Vibrio diabolicus* (Hi), *Vibrio hepatarius* (P62) y *Bacillus cereus* serisu stricto (P64) colonizan las superficies internas y externas de las larvas de camarón *Penaeus vannamei* y las protegen contra *Vibrio parahaemolyticus*. *Elsevier B.V.*

Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2015). MÉTODOS DE

SIEMBRA Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS. . En M. M. Reynoso, *Manual de microbiología general* (1a ed ed., págs. 39-43). Argentina: UniRío Editora.

Rimbaldo Luzon, C., Prado Carpio, E. C., Valarezo Macías, C. A., & Carvajal

Romero, H. R. (2024). Análisis de la Producción y Exportación del Sector

Camaronero en Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(1).

Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología*, 33-47.

Rossmi, M. R., Sequeira, G. J., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L. E., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., & Bonazza, J. C. (2004). PRODUCCION DE PROBIOTICOS PARA ANIMALES DE ABASTO: IMPORTANCIA DEL USO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL INDIGENA . *REVISTA MEXICANA DE INGENIERIA QUIMICA Vol. 3*, 181-191.

Santos , L., & Ramos , F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Schuech, R., Hoehfurtner, T., Smith, D., & Humphries, S. (2019). Motile curved bacteria are Pareto-optimal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 14440-14447. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1818997116>

Senok, A., Ismaeel, A., & Botta, G. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection. VOLUMEN 11, NÚMERO 12*, 958-966.

Silva, E. F., Soares, M. A., Ferreira Calazans, N., Lyra Vogeley, J., Cáritas de Valle, B., Soares, R., & Peixoto, S. (2011). Efecto de la adición de probióticos (*Bacillus* spp.) durante el cultivo de larvas y postlarvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Investigación en Acuicultura*, 44(1), 13-21.

Soares, M., Almada, C., Pereira, E. P., Ferreira, B., Baltasar, C. F., Khorshidian, N., . . . Sant'Ana, A. S. (2023). Review - Sporeforming probiotic bacteria: Characteristics, health benefits, and technological aspects for their applications in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 453-469.

Tamilselvan, M., & Raja, S. (2024). Exploring the role and mechanism of potential probiotics in mitigating the shrimp pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2-8.

Teitelbaum, J. E., & Walker, W. A. (2002). Nutritional impact of Pre- and Probiotics as protective gastrointestinal organisms. *ANNUAL REVIEW OF NUTRITION*, 22, 107-138.

Toral, L. C. (12 de Diciembre de 2021). *Balnova*. Obtenido de Balnova: <https://www.balnova.com/efecto-de-probioticos-en-el-sistema-inmune-del-camaron-blanco-litopenaeus-vannamei/>

UnADM. (2017). *UNIDAD 3: Caracterización Microbiana*. Mexico: Universidad Abierta ya Distancia de México/División de Ciencias de la Salud, Biológicas y Ambientales.

Usca Méndez, J. E., Peñafiel Acosta, S. E., Brito Zúñiga, G. G., & Arévalo Azanza, G. F. (2020). Características probióticas de los lactobacillus: Una revisión. *Polo del Conocimiento*, 5(08), 413-425.

- Van Gerven, N., Waksman, G., & Remaut, H. (2011). Pili and flagella: biology, structure, and biotechnological applications. *Progress in molecular biology and translational science*, 103, 21-72.
- Valan Arasu, Mariadhas & Al-Dhabi, Naif & Soundharrajan, Ilavenil & Choi, Ki & Srigopalram, Srisesharam. (2015). In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23. 10.1016/j.sjbs.2015.09.022.
- Vila, J., Soriano, A., & Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 48-55.
- Villamil Díaz, L., & Martínez-Silva, M. A. (2009). PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*.
- William, E. P. (2014). *Repositorio ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL*. Obtenido de Repositorio ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25809/3/D-76423%20Espinoza%20Pico.pdf>
- Yao, W., Li, X., Zhang, C., Wang, J., & Cai, Y. (2021). Effects of dietary synbiotics supplementation methods on growth, intestinal health, non-specific

immunity and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 112, 46-55. doi:
<https://doi.org/10.1016/J.FSI.2021.02.011>

Yen, N. T., Nhunga, N. T., Van, N. T., Cuonga, N. V., Chau, L. T., Trinh, H. N., . . . Carrique-Mas, J. (2020). Antimicrobial residues, non-typhoidal *Salmonella*, *Vibrio* spp. and associated microbiological hazards in retail shrimps purchased in Ho Chi Minh city (Vietnam). *Food Control*(106756). doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106756>

Yen-Ling , S., & Ching-Yu , L. (2014). SHRIMP IMMUNE SYSTEM -SPECIAL FOCUS ON PENAEIDIN . *Journal of Marine Science and Technology*, 22 (1), 1-8.

Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X.-H. (2016). Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture* 451, 163-169.

ANEXOS



Ilustración 1. Probióticos de estudio.



Ilustración 2. Preparación de las muestras.

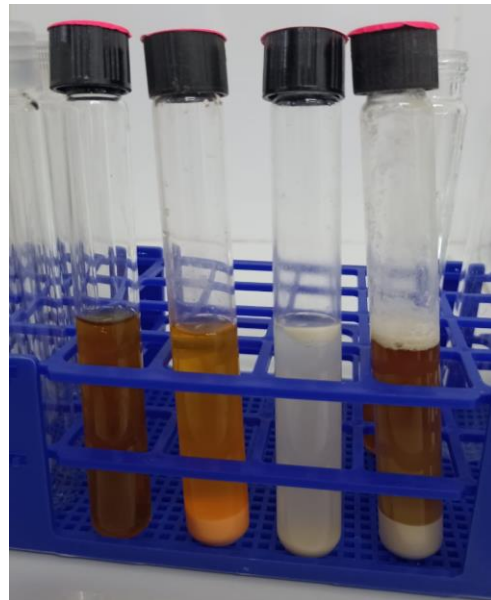


Ilustración 3. Activación de bacterias probióticas

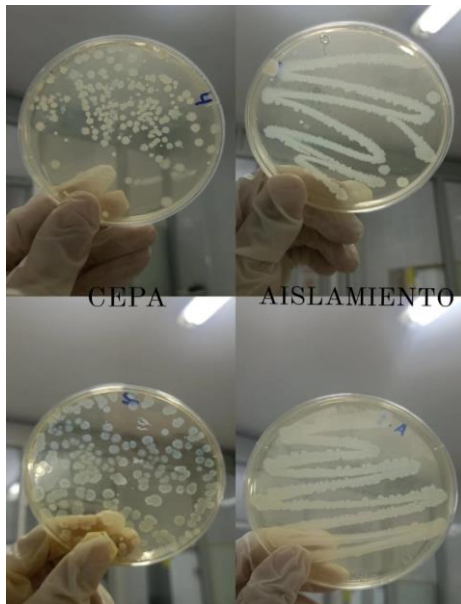


Ilustración 4. Cultivo de bacterias probióticas en Agar TSA+NaCl y aislamiento de cepas bacterianas.



Ilustración 5. Cultivo de cepas bacterianas en agar líquido TSB (izq.) y LB (der.).

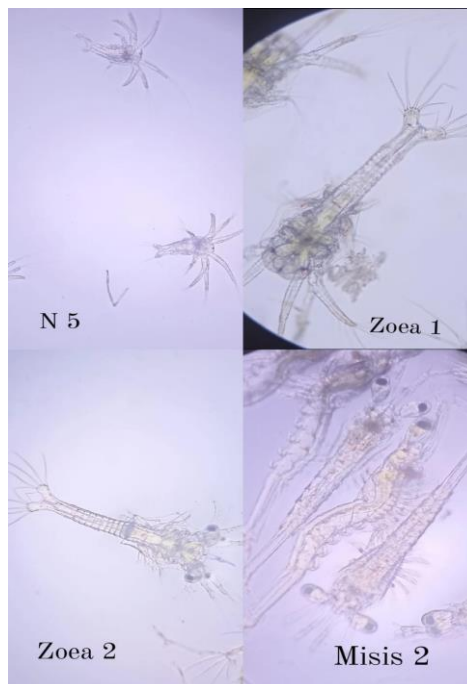


Ilustración 6. Larvas *L. vannamei* en estadios larvarios observados en microscopio.

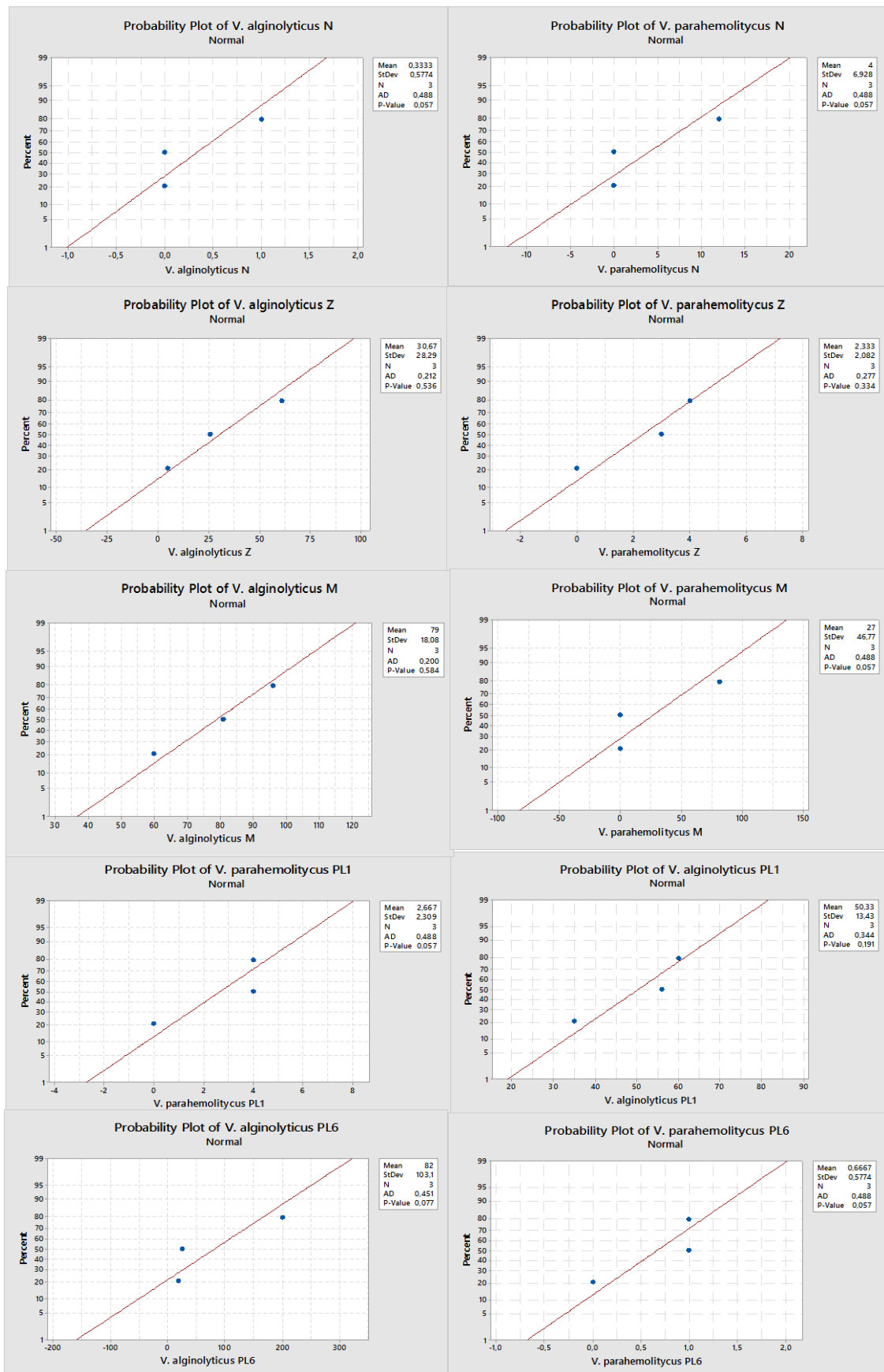


Ilustración 7. Prueba de normalidad Anderson Darling de colonias verdes y amarillas en estadios larvarios en agua

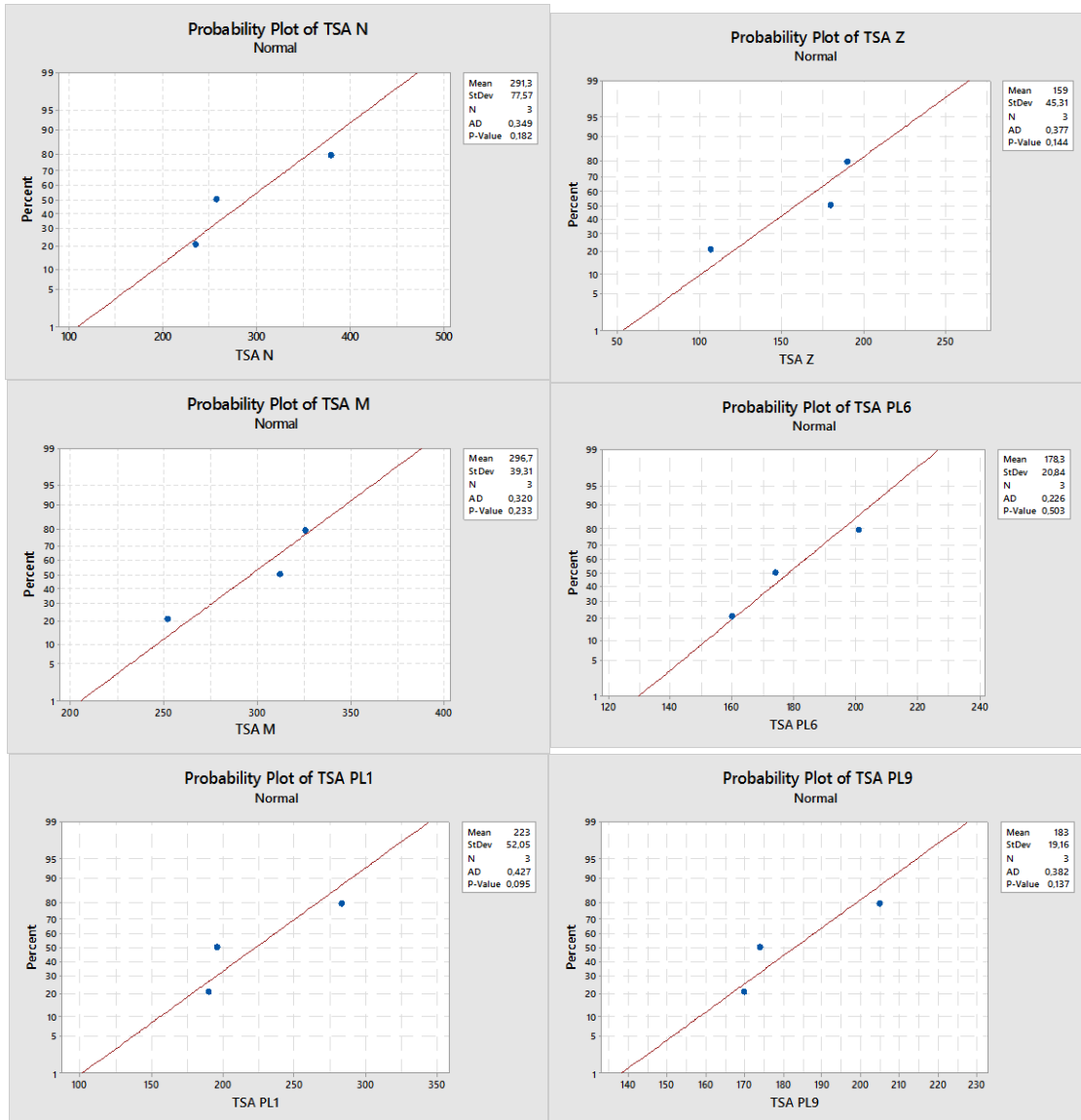


Ilustración 8. Prueba de normalidad Anderson Darling de bacterias totales en TSA de estadios larvarios en agua