

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

CARACTERIZACIÓN METAGENOMICA DE CEPAS PROBIÓTICAS CONTRA
VIBRIOS PARAHAEMOLYTICUS Y EVALUACIÓN DE MODULACIÓN DE LA
MICROBIOTA EN *PENAEUS VANNAMEI*.

Autores:

Blga. Angela María Reyes Láinez
Qf. María Belén Castillo Narea

Director:

MSc. Karen Rodas Pazmiño

Milagro, febrero 2023

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Angela María Reyes Láinez** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Acuicultura de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.



Reyes Láinez Angela María

C.I: 0913401014

Milagro, 9 febrero de 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **María Belén Castillo Narea** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Acuicultura de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 9 febrero de 2024



Castillo Narea María Belén
C.I: 010573734-0

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **MSc. Karen Alexandra Rodas Pazmiño** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por, Angela Reyes Laínez y María Belén Castillo Narea cuyo tema es **CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DE CEPAS PROBIÓTICAS CONTRA *VIBRIOS PARAHAEMOLYTICUS* Y EVALUACIÓN DE MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA EN *PENAEUS VANNAMEI***, que aporta a la Línea de Acuicultura, previo a la obtención del Grado Magister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 9 febrero de 2024



MSc. Karen Alexandra Rodas Pazmiño

C.I. 092348648-4

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **BIOL. REYES LAINEZ ANGELA MARIA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "CARACTERIZACIÓN METAGENOMICA DE CEPAS PROBIÓTICAS CONTRA VIBRIOS PARAHAEMOLYTICUS Y EVALUACIÓN DE MODULACION DE LA MICROBIOTA EN PENAEUS VANNAMEI.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	37.77
PROMEDIO	95.77
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firma electrónicamente por:
**YESSENIA BEATRIZ
SARANGO ORTEGA**

Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firma electrónicamente por:
**CESAR ANIBAL
BARZOLA GAIBOR**

Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
VOCAL



Firma electrónicamente por:
**CESAR STALIN GAVIN
MOYANO**

Mgs GAVIN MOYANO CESAR STALIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **Q.F CASTILLO NAREA MARÍA BELÉN**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "CARACTERIZACIÓN METAGENOMICA DE CEPAS PROBIÓTICAS CONTRA VIBRIOS PARAHAEMOLYTICUS Y EVALUACIÓN DE MODULACION DE LA MICROBIOTA EN PENAEUS VANNAMEI.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	34.93
PROMEDIO	92.93
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firma electrónicamente por:
**YESSENIA BEATRIZ
SARANGO ORTEGA**

**Msc SARANGO ORTEGA YESSENIA BEATRIZ
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



Firma electrónicamente por:
**CESAR ANIBAL
BARZOLA GAIBOR**

**Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
VOCAL**



Firma electrónicamente por:
**CESAR STALIN GAVIN
MOYANO**

**Mgs GAVIN MOYANO CESAR STALIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

DEDICATORIA

A mis seres amados que por la pandemia ya no están entre nosotros porque quizás
Dios se los llevo para tenerlos más cerca y abrazarlos.
A mis hijos y esposo por ser parte de este sacrificio.
A mis hermanas siempre juntas como siempre.

Angela Reyes Laínez.

El presente trabajo de titulación se lo dedico primeramente a Dios por darme el razonamiento necesario para seguir aprendiendo, por el tiempo y paciencia, a mis hijos Valentina y Lukas que son el pilar fundamental de mi vida, a mi padres y esposo por apoyarme de una u otra manera y estar al pendiente en este proceso de estudio para obtener un título más en mi vida profesional y así cumplir con una meta que me propuse y la cumplí.

María Belén Castillo Narea

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo: A la MSc. Karen Rodas por su confianza y apoyo profesional e incondicional durante las noches de desvelo su consejo me acordaré no duerman trabajen.

Al Ing. Julián Calderón y esposa por haberme dado carta abierta para realizar esta investigación el laboratorio de producción de larvas de camarón Tiballosa S. A.

A todas las personas que a lo largo de este año contribuyeron a que mi interés por el mundo de la ciencia nunca decayera, especialmente a los operarios a quienes molestaba para que me tengan las muestras muy por la mañana. Les quiero decir estas palabras del Dr. Sanger (Doble Premio Nobel).

“El mejor antídoto consiste en seguir mirando hacia adelante. Cuando un experimento es un fracaso total, lo mejor es no pasarse demasiado tiempo preocupándose por ello, si no seguir con la planificación y pasar al experimento siguiente. Resulta siempre muy excitante y muy pronto se olvida uno de sus problemas.”

Por ultimo y no menos importante, dar las gracias a mi familia por su apoyo y ánimo y sobre todo a mi esposo Washington por atender a mi Feli y prepararle lo que quería cuando me veía cansada y ocupada por el desarrollo de mi tesis.

Angela Reyes Laínez

Agradezco a Dios, por brindarme salud y vida y permitirme cumplir una meta más en mi vida, además me siento muy agradecida con quienes forman parte de mi familia y están muy alegres de que continúe estudiando para surgir y salir adelante. Gracias por creer en mí.

También agradezco a cada docente que formó parte del aprendizaje de esta maestría en Biotecnología, y de manera muy cordial a la MSc. Karen Rodas por ser nuestra guía y por brindarnos su dedicación en este proceso de titulación.

María Belén Castillo Narea

RESUMEN

Vibrios sp. es un patógeno que causa pérdidas económicas en el cultivo de camarón, el uso de fármacos para combatirlo ha generado resistencia y enfermedades. Este estudio tiene como objetivo caracterizar a nivel de metagenómica las cepas probióticas en el agua de cultivo de *Penaeus vannamei* para comprobar la sensibilidad contra *Vibrios parahaemolyticus*. Se aislaron y seleccionaron bacterias con potencial probiótico mediante pruebas *in vitro* contra *Vibrio sp.* y se identificaron consorcios bacterianos RS3 y CINV. Se encontró una cepa oportunista que crece con altos niveles de vibrios. El análisis de comunidades microbianas mostró una microbiota rica y compleja. En RS3, solo el 8.7% se identificó a nivel de especie, pero se encontró *Bacillus* con una abundancia del 100%. En CINV, hubo una abundancia del 99% de *vibrios* no presentes en la base de datos de secuenciación, y un pequeño porcentaje de *Vibrio corallilyticus*.

Los consorcios CN5, RS3 por separado y mezclas de ambas cepas probióticas fueron sometidas a pruebas de inhibición *in vitro* para demostrar su efecto antagónico por métodos de difusión en agar y por cúmulos con células vivas donde se determinó mediante una prueba de normalidad de Anderson – Darling dando valores superiores a 0.05 es decir todos los valores fueron normales y la data homogénea. Mediante Anova de una vía se comparó las medias por tratamiento y luego un test posterior de Tukey se determinó que no existió diferencia significativa entre los tratamientos con un 99% de porcentaje de inhibición es decir las cepas probióticas identificadas en el agua de cultivo de *Penaeus vannamei* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*. Dando como resultado que la combinación de ambos consorcios tuvo un efecto significativo del 99% sobre bacterias patógenas es decir existió sinergia entre consorcios.

Esta investigación servirá como línea base de estudio de bacterias salvajes con capacidad antimicrobiana, siendo una ventaja a diferencia de varios estudios en los que se realizan investigaciones a partir de esponjas marinas, de corales donde se presentan limitaciones en cuanto a la disponibilidad de estos organismos.

Palabras Clave: Probióticos, pruebas de competencia, Metagenómica. Microbiota, sinergia

ABSTRACT

Vibrios sp. It is a pathogen that causes economic losses in shrimp farming; the use of drugs to combat it has generated resistance and diseases. This study aims to characterize at the metagenomics level the probiotic strains in the culture water of *Penaeus vannamei* to verify the sensitivity against *Vibrios parahaemolyticus*. Bacteria with probiotic potential were isolated and selected through in vitro tests against *Vibrio sp.* and bacterial consortia RS3 and CINV were identified. An opportunistic strain was found that grows with high levels of vibrios. The analysis of microbial communities showed a rich and complex microbiota. In RS3, only 8.7% were identified to the species level, but *Bacillus* was found at 100% abundance. In CINV, there was a 99% abundance of vibrios not present in the sequencing database, and a small percentage of *Vibrio corallilyticus*.

The CN5, RS3 consortia separately and mixtures of both probiotic strains were subjected to in vitro inhibition tests to demonstrate their antagonistic effect by diffusion methods in agar and by clusters with live cells where it was determined by an Anderson–Darling normality test. giving values greater than 0.05, that is, all the values were normal, and the data was homogeneous. Using one-way Anova, the means were compared per treatment and then a subsequent Tukey test determined that there was no significant difference between the treatments with a 99% inhibition percentage, that is, the probiotic strains identified in the culture water of *Penaeus vannamei*. They have the ability to inhibit the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. Resulting in the combination of both consortia having a significant effect of 99% on pathogenic bacteria, that is, there was synergy between consortia.

This research will serve as a baseline for the study of wild bacteria with antimicrobial capacity, being an advantage unlike several studies in which research is carried out using marine sponges and corals where there are limitations regarding the availability of these organisms.

Keywords: probiotics, competition tests, Metagenomics. Microbiota, synergy.

Lista de Figuras

Figura 1	Estadios o etapas de crecimiento larvario de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Pág. 30
Figura 2	Primera etapa de crecimiento larvario, Nauplio	Pág. 31
Figura 3	Segunda etapa de crecimiento larvario, Zoea	Pág. 31
Figura 4	Tercera etapa de crecimiento larvario, Mysis	Pág. 32
Figura 5	Etapas postlarva de camarón	Pág. 33
Figura 6	Anatomía de camarones peneidos	Pág. 34
Figura 7	Mecanismo de transferencia del ADN entre bacterias.	Pág. 37
Figura 8	Mecanismo de acción de bacterias probióticas.	Pág. 45
Figura 9	Características de las cepas	Pág. 49
Figura 10	Selección de colonias según sus características morfológicas	Pág. 59
Figura 11	Crecimiento bacteriano en Agar TSA	Pág. 60
Figura 12	Ausencia de crecimiento en agar Cetrimide	Pág. 61
Figura 13	Crecimiento bacteriano en Chromagar bacillus	Pág. 62
Figura 14	Técnica de recuento microbiano con diluciones seriadas en base 10.	Pág. 64

Figura 15	Prueba de antagonismo, técnica de Kirby Bauer.	Pág. 64
Figura 16	Técnica de difusión con bacterias vivas (cúmulos)	Pág. 65
Figura 17	Técnica de difusión en agar	Pág. 66
Figura 18	Método de estría cruzada	Pág. 66
Figura 19	Crecimiento bacteriano en Chromagar Bacillus y en TSA	Pág. 69
Figura 20	Resultados de las principales categorías taxonómicas a nivel de género identificadas	Pág. 71
Figura 21	Taxonomía de las especies pertenecientes al género bacillus encontradas en la muestra 1	Pág. 72
Figura 22	Resultados de las principales categorías taxonómicas a nivel de género identificadas	Pág. 73
Figura 23	Taxonomía de las especies encontradas en la muestra 2	Pág. 74
Figura 24	Comparación de filtrados de las muestras	Pág. 74
Figura 25	Composicion de la comunidad bacteriana	Pág. 75
Figura 26	Diagrama de bigotes	Pág. 76
Figura 27	Curvas de Rarefacción	Pág. 76
Figura 28	Resultado del crecimiento en Agar TSA	Pág. 78
Figura 29	Resultado crecimiento en Chromagar bacillus	Pág. 78
Figura 30	Resultado de crecimiento en Agar MRS	Pág. 79

Figura 31	Ausencia de crecimiento bacteriano en Agar Cetrimide y TCBS	Pág. 80
Figura 32	Resultado crecimiento bacteriano en TSA-C. BACILUS-MRS	Pág. 80
Figura 33	Técnica de difusión con bacterias vivas o Inhibición simultánea	Pág. 81

Lista de Tablas

Tabla 1	VARIABLES dependientes	Pág. 24
Tabla 2	VARIABLES independientes	Pág. 25
Tabla 3	Taxonomía del camarón	Pág. 29
Tabla 4	Influencia de la etapa de desarrollo en la microbiota del tracto digestivo	Pág. 36
Tabla 5	Composición de Agar TSA	Pág. 53
Tabla 6	Composición de Agar TCBS.	Pág. 54
Tabla 7	Composición de Agar MRS	Pág. 55
Tabla 8	Composición de Agar Cromogénicos Bacillus	Pág. 56
Tabla 9	Composición de Chromagar Vibrio	Pág. 56
Tabla 10	Composición Agar Trypticase soya broth	Pág. 57
Tabla 11	Composición del agar Cetrimide	Pág. 58
Tabla 12	Estadística de clasificación a nivel taxonómico muestra 1	Pág. 70
Tabla 13	Estadística de clasificación a nivel taxonómico muestra 2	Pág. 72

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Definición
AHPND	Necrosis hepatopancreática aguda
16S Rrna	Región ribosómica 16S
TSA	Trypticasa soya agar
UFC	Unidades formadoras de colonias
TCBS	Tiosulfato Citrato de Sales Biliares
TSB	Trypticasa soya broth
MRS	Man Rugosa Shamr
Sp	Especie
QPS	Presunción cualificada de seguridad
MinION	Plataforma de secuenciación de tercera generación
BALs	Bacterias ácido-lácticas
V.p	Vibrio parahaemolyticus
NaCl	Cloruro de sodio
CN5	Consortio 5
RS3	Consortio reservorio 3
CINV	Colonia invasiva
ADN	Ácido Desoxirribonucleoico
WSSV	VIRUS WHITE SPOT
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
NHP- S	Hepatopancreatitis necrotizante séptica
NHP – B	Hepatopancreatitis necrotizante bacteriana
BALs	Bacterias ácido-lácticas
SOD	Superóxido dismutasa
TGI	Tracto gastrointestinal
SSE	Solución salina estéril

ÍNDICE

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	24
Capítulo I: El problema de la investigación	26
1.1. Delimitación del Problema	27
1.1.1. Formulación del problema “espacio”	27
1.1.2. Formulación del problema “tiempo”	27
1.2. Formulación de problema.....	27
1.3 Preguntas de investigación.....	27
1.4. Determinación del tema	27
1.5. Objetivo general.....	28
1.6. Objetivos específicos	28
1.7. Hipótesis	28
1.8. Operacionalización de la Variable dependientes	28
1.9. Operacionalización de la Variable independientes	29
1.10. Justificación	30
1.11. Alcance y limitaciones.....	31
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial	32
2.1. Contenido teórico que fundamenta la investigación.....	32
2.1.1. Acuicultura	32
2.1.2. Generalidades sobre el camarón	32
2.1.2.1. Características de los camarones.....	32
2.1.2.2. Ecología.....	33
2.1.2.3. Reproducción	33
2.1.2.4. Estadios o etapas del crecimiento larvario	34
2.1.2.5. Etapa de Nauplio	34
2.1.2.6. Etapa de Zoea	35

2.1.2.7.	Etapa de Mysis	36
2.1.2.8.	Etapa de Postlarva	36
2.1.3.	Sistema Inmunológico del camarón	37
2.1.4.	Tracto Digestivo de los camarones	38
2.1.5.	Microbiota intestinal de los Camarones.....	38
2.1.6.	Enfermedades en sistemas de cultivos de camarón	40
2.1.6.1.	Mecanismos de transferencia de ADN	40
2.1.7.	Enfermedades bacterianas en camarones.....	42
2.1.7.1.	Características del género Vibrio.....	42
2.1.7.2.	AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda)	44
2.1.7.3.	Cepas causantes de AHPND	44
2.1.8.	Probióticos	45
2.1.8.1.	Uso de probióticos en acuicultura.....	45
2.1.9.	Mecanismos de acción de las bacterias probióticas.....	47
2.1.9.1.	Producción de sustancias antibacterianas.....	47
2.1.9.2.	Exclusión competitiva	47
2.1.9.3.	Estimulación del sistema inmunológico	48
2.1.10.	Los probióticos y la calidad del agua en la acuicultura	51
2.1.11.	Pruebas in vitro para la selección de cepas con carácter probiótico	51
CAPÍTULO III	Diseño Metodológico.....	54
3.1.	Tipo y diseño de investigación.....	55
3.2.	La población y la muestra	55
3.2.1.	Características de la población.....	55
3.2.2.	Delimitación de la población	55
3.2.3.	Tipo de muestra.....	55
3.2.4.	Tamaño de la muestra.....	56
3.2.5.	Proceso de selección de la muestra	56
3.3.	Los métodos y las técnicas.....	56

3.3.1. Identificación de cepas de bacterias nativas de reservorios que contienen agua de mar preparada para el ciclo de siembra.	56
3.4. Técnicas microbiológicas.....	62
3.4.1. Evaluación de la potencialidad de cepas probióticas identificadas mediante metagenómica capaces de inhibir el crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante la técnica de Kirby bauer.....	68
3.4.2. Caracterización por metagenómica de las cepas bacterianas aisladas en caldo TSB	71
CAPÍTULO IV Análisis e interpretación de resultados.....	73
4.1. Procesamiento estadístico de la información.....	73
4.2. Identificar cepas nativas de agua de mar captada en reservorios mediante cultivos in vitro para la selección de probióticos entre las bacterias cultivables.....	73
4.3. Caracterizar cepas probióticas de agua de mar mediante metagenómica.	74
4.3.1. Análisis metagenómico de cepas aisladas	74
4.3.2. Análisis metagenómico de cepas aisladas muestra N° 2	77
4.3.3. Comparación de filtrados por muestras	79
4.3.4. Composicion de la comunidad bacteriana	80
4.3.5. Diagrama de bigotes.....	81
4.3.6. Curvas de Rarefacción	81
4.3.7. Evaluar la potencialidad de cepas probióticas identificadas mediante metagenómica capaces de inhibir el crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante la técnica de Kirby bauer.	82
4.3.8. Cuantificación del crecimiento bacteriano de los consorcios CN5, RS3 y mezcla de ambos cultivados en medio líquido TSB	85
4.3.9. Evaluación de la actividad antagónica in vitro	86
CAPÍTULO V Conclusiones y Recomendaciones	90
Bibliografía	92
Anexos	98

INTRODUCCIÓN

La actividad acuícola a nivel global ha adquirido una relevancia significativa al convertirse en una actividad productiva en constante crecimiento, su importancia radica en su contribución tanto a la producción pesquera mundial como al aumento en la demanda de productos acuícolas, este crecimiento se atribuye en parte al aumento de la población mundial y al cambio de hábitos alimenticios, donde las carnes blancas son consideradas más saludables y nutritivas (Beltrán Meza, 2017).

Ecuador, gracias a su posición geográfica favorable y a sus extensos kilómetros de costa, posee una plataforma marina rica en recursos pesqueros (Aquahoy, 2017). El sector acuícola ecuatoriano se centra en la producción de camarones, especialmente del tipo *Penaeus vannamei*. Hasta el año 2021 Ecuador se destacó como el segundo mayor productor acuícola en América con una extensa área de producción de camarón que abarcó alrededor de 250.000 hectáreas y una producción total de 940.000 toneladas (Zhao, 2022).

Si bien es cierto este acelerado incremento de producción de carídeos ha llevado a incrementar las tasas de supervivencia y salud de las mismas reduciendo la desnutrición enfermedad que permitía la pérdida total de un cultivo larvario, Sin embargo cada año se levantan alertas por posibles problemas abióticos que afectan a los camarones como el fenómeno de El Niño capaz de perjudicar el sector acuícola debido a la baja de precios en el mercado internacional, afectando directamente al primer eslabón de la cadena productiva por el alto costo de los insumos acuícolas uno de ellos los probióticos comerciales (Ponce, 2021).

En la mayoría de las investigaciones donde se incluye información sobre el análisis de microorganismos en la acuicultura, se utilizan metodologías basadas en la microscopía óptica, bioquímica o electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Bourne et al., 2004). Sin embargo, hoy en día existen técnicas de mayor resolución; por ejemplo, técnica de secuenciación masiva o secuenciación de última generación del gen 16S ARNr (Valenzuela et al., 2015).

En general, los estudios microbianos que se han realizado en la acuicultura se centran en la comprensión de las interrelaciones simbióticas y antagonistas entre microbios y sus hospederos, tales como: peces, crustáceos y moluscos. En este sentido, la metagenómica puede proporcionar una visión más profunda de estas relaciones mediante la interpretación de la información revelada por el ADN extraído directamente del consorcio de microorganismos presentes en los ambientes de cultivos acuícolas (Suttle, 2007).

En la actualidad la implementación de técnicas ómicas como es la metagenómica para el estudio en conjunto de genomas presentes en muestras ambientales, resulta un campo emergente para estudiar las estructuras y funciones de las comunidades microbianas y las posibles interacciones con el hábitat que ocupan (Cruz et al., 2015). El avance en tecnologías de clonado y secuenciación en la actualidad ha permitido reducir la cantidad de material de partida para realizar una biblioteca genómica y los costos de secuenciación (Grasso, 2006).

Los probióticos, prebióticos y simbióticos son aditivos empleados para controlar enfermedades bacterianas en camarón entre ellos destacan los probióticos, por ser una alternativa eficiente a los antibióticos. La administración se realiza directa por vía oral a través del alimento, administrado de manera indirecta al agua de cultivo, utilizando un medio fermentado (Pandey et al., 2015).

Los probióticos tienen varios mecanismos de acción, como antagonismo directo contra patógenos debido a la producción de sustancias inhibitorias, exclusión competitiva de bacterias patógenas por los sitios de adhesión en el tracto gastrointestinal del huésped, competencia con las bacterias patógenas por nutrientes y estimulación del sistema inmune del huésped (Wang et al., 2019). Se estudiará la caracterización metagenómica de cepas probióticas en el agua de cultivo de *Penaeus vannaei* para evaluar su sensibilidad contra *Vibrios parahaemolyticus*. Morfológicamente, las colonias bacterianas aisladas son probióticas. Se determinaron las características macroscópicas de los microbiomas y la actividad antivibrio de las cepas metagenómicamente caracterizadas (Suárez, 2013).

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1. Planteamiento del problema

En Ecuador el cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* es la principal actividad acuícola, siendo el camarón el primer producto no petrolero más exportado. Durante 2018 se exportaron 1018071,91 libras, equivalentes a 2`933.877,352 de USD (Alvarez, 2013). La producción camaronera mundial no ha estado exenta de dificultades y problemas patológicos. Actualmente las enfermedades provocadas por bacterias del género *Vibrio* han tomado impulso en los sistemas de cultivo de camarón (Goal, 2019).

Una estrategia para combatir vibriosis es mediante cepas probióticas de origen marino (Guevara et al., 2022). *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) es una bacteria ubicua de importancia acuícola, la cual ha sido aislada en muestras de agua de mar, sedimento; inclusive organismos marinos de interés comercial como peces, crustáceos y moluscos (Flores et al., 2015). *V. parahaemolyticus* es una bacteria autóctona del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*, por lo que éste tiende a estar vulnerable ante las colonizaciones masivas de esta bacteria (Pandey et al., 2015).

La biodiversidad de cepas probióticas que existen en el mercado para acuicultura pertenece al género *Bacillus*, las mismas que pueden ser aisladas de suelo agua y en muchas ocasiones de ambientes terrestres (Kuebutornye et al., 2019). En ocasiones su éxito en los cultivos marinos es cuestionable, debido en parte a los factores ambientales (bacterias terrestres en medio marino) y al poco éxito de estos probióticos compitiendo contra *Vibrios sp.* en los cultivos (Martínez et al., 2017).

Estudios recientes utilizando metagenómica muestran que *V. parahaemolyticus* (perteneciente al clado de *V. harveyi*) modifica la microbiota de los cultivos disminuyendo la diversidad bacteriana en favor de los vibrios (Chen et al., 2017).

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la modulación de la microbiota en *penaeus vannamei* de formar *in vitro* y comprobar la presencia de cepas

probióticas en el agua de mar mediante estudios metagenómicos y conocer específicamente los grupos bacterianos dominantes que se encuentran en los reservorios de agua de mar, los cuales han sido sometidos a tratamientos químicos; pero a pesar de ser sometidos a desinfección generalmente se está evidenciando un crecimiento de bacterias heterótrofas “que crecen en un medio de cultivo para usos generales como es agar TRIPTICASA SOYA (TSA)” (Suárez, 2013).

1.1. Delimitación del Problema

En la actualidad existe poca literatura acerca de la identificación metagenómica de consorcios microbianos salvajes que entran al sistema de producción de larvas de camarón, por tal motivo resulta relevante la identificación y su potencial uso como probiótico en la industria del camarón.

1.2. Formulación del problema “espacio”

El presente trabajo de investigación se realizó en la República del Ecuador, Región Costa, Provincia de Santa Elena, Cantón Salinas.

1.3. Formulación del problema “tiempo”

El estudio bibliográfico se basará en investigaciones de los últimos 5 años y la información experimental se establecerá de acuerdo con los resultados obtenidos de los diferentes análisis fisicoquímicos, microbiológicos y ómicos realizados en los últimos 3 meses.

1.4. Preguntas de investigación

¿Serán los consorcios microbianos identificados a nivel de metagenómica potenciales cepas probióticas para ser empleadas contra patógenos *V. parahaemolyticus*?

1.5. Determinación del tema

Se requiere estudiar mediante técnicas metagenómicas para caracterizar cepas probióticas específicas y entender cómo estas afectan la microbiota de *Penaeus vannamei*, especialmente en relación con la inhibición de *Vibrios parahaemolyticus*. Este enfoque integra tanto la genómica como la ecología microbiana, y el resultado final podría contribuir al desarrollo de estrategias probióticas para la acuicultura y la salud de los camarones.

1.6. Objetivo general

Estudiar la caracterización metagenómica de cepas probióticas en el agua de cultivo de *Penaeus vannaei* para comprobar la sensibilidad contra *Vibrios parahaemolyticus*.

1.7. Objetivos específicos

- Identificar cepas nativas de agua de mar captada en reservorios mediante cultivos *in vitro* para la selección de probióticos entre las bacterias cultivables.
- Caracterizar cepas probióticas de agua de mar mediante metagenómica.
- Evaluar la potencialidad de cepas probióticas identificadas mediante metagenómica capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la técnica de Kirby bauer.

1.8. Hipótesis

Ha: Las cepas probióticas identificadas en el agua de cultivo de *Penaeus vannaei* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*.

Ho: Las cepas probióticas identificadas en el agua de cultivo de *Penaeus vannaei* no tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*.

1.9. Operacionalización de la Variable dependientes

Tabla 1*Variables dependientes*

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Interrogantes	Técnicas	Instrumentos
Capacidad de inhibir in vitro cepa patógena de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	Aislados bacterianos	Producción de halos de inhibición	¿Cuál es el nivel de identificación de cepas bacterianas?	Pruebas de exclusión competitiva	Cámara de flujo laminar Agares: TSA y TSB. Micropipetas. Plato agitador calentador. Cámara para conteo de colonias. Balanza.

Nota. Esta tabla indica la operacionalización de las variables dependientes (Elaboración propia).

1.10. Operacionalización de la Variable independientes

Tabla 2*Variables independientes*

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Interrogantes	Técnicas	Instrumentos
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> provoca enfermedades como vibriosis generalizada produciendo altas mortalidades.	Mezcla de consorcios microbianos	Frecuencia de muestreo Prueba 1= medios de cultivo sin crecimiento. Prueba 2= Reto de consorcios bacterianos frente a cepas de <i>Vibrio</i> patógenos con réplicas.	¿Se evidenciará la capacidad de los consorcios bacterianos de inhibir al patógeno?	Observación directa Muestreo	Placas de agar Trypticasa Soya Agar.

Nota. Esta tabla indica la operacionalización de las variables independientes (Elaboración propia).

1.11. Justificación

Actualmente proveer el recurso de camarones en el mercado, se ha vuelto una tarea imposible únicamente a través de la pesca, por esta razón han surgido alternativas para prevenir la escasez de productos alimentarios, siendo una de ellas la acuicultura esta práctica implica la producción y reproducción de organismos acuáticos ya sean en ambientes de agua dulce o salada tanto dentro como fuera de los cuerpos naturales de agua, los productores adquirieron conocimientos, aprendieron y perfeccionaron la técnica de criar camarones alcanzando una fase en que realizaron ajustes al sistema llevándolo a los límites de capacidad de cada instalación de producción (Alvarez, 2017).

La producción de larvas de camarón con sus altas densidades de siembra ha ocasionado que frecuentemente se lidien con enfermedades microbianas como vibriosis, que es causada por bacterias patógenas del género *Vibrio* afectando etapas críticas del desarrollo ontogénico, a esta problemática se une el empleo de antibióticos los mismos que deben ser excluidos por los múltiples problemas que causan en la acuicultura como son la resistencia antibacteriana y la contaminación por el desecho inseguro de aguas con estas sustancias (Ovando 2021).

En la actualidad existen disponibles en el mercado varias marcas de Probióticos, en presentación líquida y sólida, que contienen una variedad de *bacilos*, *lactobacilos* y enzimas con diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC), la gran mayoría son activados en agua, fuente de carbono, fuente de nitrógeno mientras que otros solo necesitan ser hidratados y aplicados directamente (Rojas et al.,2020).

Con el fin de abordar esta problemática, resulta imperativo identificar y analizar a nivel molecular con técnicas de última generación, como son la genómica desde la extracción del ADN, el estudio de cepas probióticas nativas como agentes antimicrobianos mediante su evaluación in vitro contra *vibriosis* sp, este enfoque permitirá la implementación inmediata de un protocolo de control, con la finalidad de aplicar medidas preventivas y mitigar posibles pérdidas en el desarrollo del ciclo de cultivo de camarón (Durán, 2016).

La metagenómica dirigida a genes específicos como biomarcadores taxonómicos (también conocida como genómica de comunidades o genómica ambiental), surge como una tecnología que estudia la estructura de las comunidades microbianas, gracias a esta herramienta, es posible analizar genes específicos dentro de los nichos microbianos. Estos genes, pueden ser utilizados para identificar bacterias u otros procariontes (Bragg et al., 2014).

Resulta relevante en esta investigación una vez identificados las comunidades bacterianas a nivel de metagenómica probar su eficacia antagónica contra *vibrios sp* mediante pruebas in vitro, para ser empleados como probióticos a partir de cepas nativas (Cuéllar et al., 2014) y además estos resultados servirán como investigación de línea base para posteriores estudios de consorcios bacterianos que entran al sistema de producción de larvas de camarón.

1.12. Alcance y limitaciones

1.12.1. Alcances

- Caracterización metagenómica de cepas probióticas: Se identificó y caracterizó las especies bacterianas presentes en cepas probióticas seleccionadas, incluyendo el análisis de la composición genética, la función y la actividad de las bacterias.
- Evaluación de la eficacia de cepas probióticas contra *Vibrio parahaemolyticus*: Se evaluará la capacidad de las cepas probióticas para inhibir el crecimiento de dicho *Vibrio*.

1.12.2. Limitaciones

Limitación de recursos: las pruebas genómicas limitan el estudio de estas cepas ya que no se contó con un laboratorio cercano y a su vez se envió a realizar esta prueba en un laboratorio externo que presta servicios de secuenciación.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

2.1.1. Acuicultura

Hace cuatro décadas Ecuador dio inicio a la práctica comercial del cultivo de camarones en estanques, su progreso y evolución en la economía local con mayor incidencia en la provincia del Guayas ha sido de suma importancia, destacándose en los mercados mundiales y logrando que el camarón ecuatoriano sea bien recibido a nivel mundial esto implica que el peso de las exportaciones no petroleras se incrementó con la participación de las exportaciones de dos productos camarón y banano (Saltos, 2020).

Sin duda, los avances tecnológicos han contribuido significativamente a estos resultados y las exportaciones de camarón lo reflejan, así pues, una serie de eventos, en su mayoría patológicas, tuvieron diversos grados de impacto en la dinámica productiva, el impacto de white spot syndrome virus (WSSV) en la acuicultura de Ecuador fue devastador, causando pérdidas económicas de millones de dólares y la muerte de millones de peces (López et al., 2023). Las investigaciones sobre enfermedades infecciosas permiten desarrollar terapias antimicrobianas eficaces, que podrán implementarse para mitigar los eventos futuros de enfermedades infecciosas (OIE, 2018).

2.1.2. Generalidades sobre el camarón

Los camarones son crustáceos decápodos que se encuentran en ambientes marinos y estuarinos. Son una fuente importante de alimento en todo el mundo y representan un sector importante de la acuicultura (Rivera, 2021).

2.1.2.1. Características de los camarones

Los camarones tienen un cuerpo alargado y cilíndrico, con una cabeza, un tórax y un abdomen, la cabeza tiene dos ojos compuestos, dos antenas y un par de mandíbulas, el tórax tiene ocho patas, de las cuales las seis primeras se utilizan para caminar y las dos últimas para nadar, el abdomen tiene seis segmentos, cada uno con un par de pleópodos, que son apéndices que se utilizan para nadar y respirar (Ribera et al., 2015).

2.1.2.2. Clasificación taxonómica del camarón

Los camarones se clasifican en la clase Malacostraca, orden Decapoda, familia Penaeidae, este género *Penaeus* es el más importante en la acuicultura, y sus especies más cultivadas son *Penaeus vannamei*, *Penaeus chinensis* y *Penaeus monodon* (Ramírez, 2021).

Tabla 3

Taxonomía del camarón

Phylum:	Arthropoda
Clase:	Malacostraca
Orden:	Decapoda
Suborden:	Dendobranchiata
Superfamilia:	Penaeoidea
Familia:	Penaeidae
Género:	Litopenaeus
Especie:	Vannamei

Nota. Descripción de clasificación taxonómica (Ramírez, 2021).

2.1.2.3. Ecología

Los camarones son animales bentónicos, lo que significa que viven en el fondo del mar o de los estuarios, se alimentan de una variedad de organismos, incluyendo algas, plantas, animales pequeños y detritos (Santur Rivera, 2022).

2.1.2.4. Reproducción

Los camarones se reproducen sexualmente, los machos liberan esperma en el agua y las hembras recogen el esperma con sus branquias, las hembras incuban los

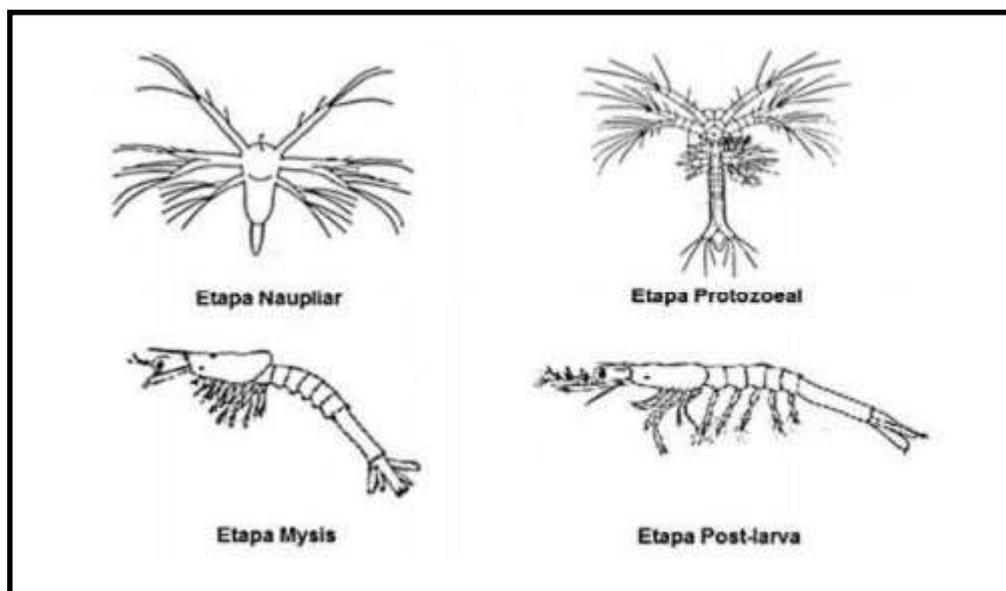
huevos en su cuerpo durante aproximadamente dos semanas, y luego liberan las larvas al agua (Lombal, 2021).

2.1.2.5. Estadios o etapas del crecimiento larvario

Las larvas de camarón pasan por tres etapas de desarrollo: nauplio, protozoa y mysis. En la etapa mysis, las larvas desarrollan los órganos y características necesarias para convertirse en postlarvas. Sin embargo, la mayoría de las larvas de nauplio mueren antes de llegar a esta etapa (Garnica, 2023).

Figura 1

Estadios o etapas de crecimiento larvario de Litopenaeus vannamei



Nota. Este gráfico representa las etapas de crecimiento larvario del *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2016).

2.1.2.6. Etapa de Nauplio

Las larvas de camarón eclosionan de los huevos dentro de 10 a 14 horas. La primera etapa larval se llama nauplio y tiene cinco subestadios. Esta etapa dura aproximadamente 40 a 50 horas. Las larvas de nauplio son muy pequeñas, con una longitud de 0,5 mm y un ancho de 0,2 mm, tienen un ojo simple y se alimentan de las reservas de vitelo que traen del huevo (Brusca et al., 2003).

Figura 2

Primera etapa de crecimiento larvario, Nauplio



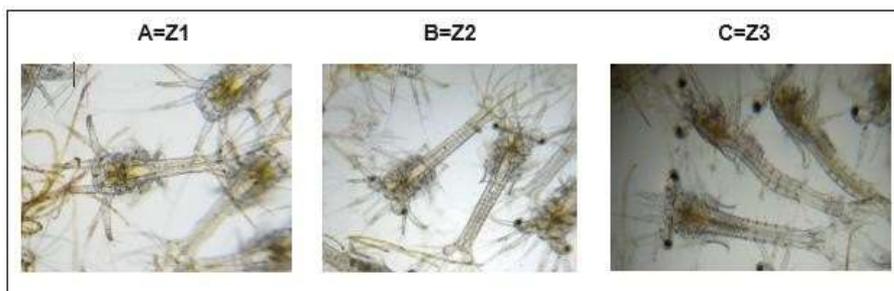
Nota. Este gráfico muestra la primera etapa de crecimiento larvario (Nauplio) en el microscopio (Elaboración propia).

2.1.2.7. Etapa de Zoea.

Después de la etapa de nauplio 5, que es la etapa en la que se siembran las larvas de camarón en los tanques de producción de los laboratorios, viene la etapa de zoea. Esta etapa tiene tres subestadios: zoea 1, zoea 2 y zoea 3. Se diferencia de la etapa anterior porque presenta cefalotórax, que es la región del cuerpo que comprende la cabeza y el tórax. La etapa de zoea dura aproximadamente 3 a 4 días, es decir aproximadamente un día por subestadio. Las larvas de zoea se alimentan de microalgas presentes en el agua porque no tienen una cavidad bucal desarrollada (Ramirez, 2011).

Figura 3

Segunda etapa de crecimiento larvario, Zoea



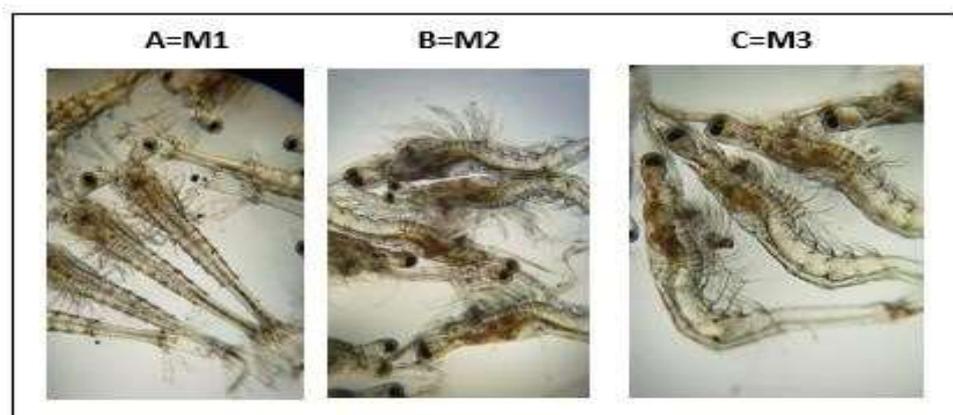
Nota. Estas imágenes muestran la segunda etapa de crecimiento de la larva del camarón con sus respectivos subestadios (Zoea 1, zoea 2, zoea 3), (Elaboración propia)

2.1.2.8. Etapa de Mysis

Después del tercer subestadio de zoea, las larvas de camarón mudan a la etapa de mysis. En esta etapa, el cuerpo de las larvas se curva en la zona abdominal y nadan mediante contracciones abdominales. La etapa de mysis tiene tres subestadios, cada uno con una duración de aproximadamente un día. Las larvas de mysis se alimentan de alimento vivo, pero, también pueden comenzar a consumir alimentos sólidos (Valarezo, 2016).

Figura 4

Tercera etapa de crecimiento larvario, Mysis



Nota. Estos gráficos muestran la tercera etapa de crecimiento de la larva del camarón con sus respectivos subestadios (Mysis 1, mysis 2 y mysis 3), (Elaboración propia).

2.1.2.9. Etapa de Postlarva

Después del tercer y último subestadio de mysis, las larvas de camarón pasan a la etapa de postlarva. Esta etapa dura aproximadamente 20 días, y se divide en 20 subestadios. Las postlarvas son animales totalmente funcionales, similares a camarones en miniatura. Poseen periópodos para agarrarse y arrastrarse. Se alimentan de alimento sólido y artemia (Carvajal et al., 2015).

Figura 5

Etapa postlarva de camarón



Nota. Este gráfico indica la etapa del camarón donde ya son animales funcionales: Postlarva (Elaboración propia).

La nutrición postlarval es un factor clave para el éxito de la producción de camarón. Un estudio de (Curbelo et al., 2016), encontró que las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* necesitan una dieta rica en micronutrientes y fresca. Otro estudio, realizado por (Cobo et al., 2018), determinó que las proteínas son el nutriente esencial para el crecimiento de estas especies. Estos estudios demuestran que la nutrición postlarval es fundamental para garantizar la salud y el crecimiento de los camarones, cuando las postlarvas reciben una dieta adecuada, crecen más rápido, son menos propensas a la desnutrición y tienen un sistema inmunológico fuerte (Cornejo et al., 2018).

2.1.3. Sistema Inmunológico del camarón

Las enfermedades son una amenaza importante para la industria del camarón. En particular, la pandemia viral de WSSV ha causado grandes pérdidas económicas. Es necesario investigar más sobre el sistema inmune del camarón para desarrollar estrategias para fortalecer su respuesta a los patógenos. (Flegel, 2019).

Se ha documentado que la composición bacteriana intestinal de *Peneidos* como el camarón tigre, *Penaeus monodon* y el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, puede ser muy dinámica durante su cultivo (Zheng et al., 2017).

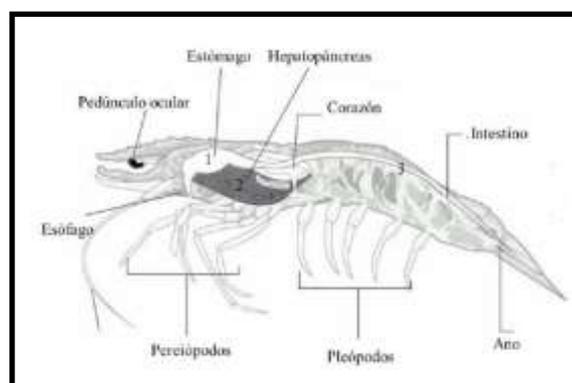
2.1.4. Tracto Digestivo de los camarones

En el tracto digestivo de los camarones peneidos tenemos al intestino que es la parte más larga del mismo, mide entre 10 y 20 centímetros de largo y se clasifica en tres partes principales:

- El intestino proximal es la parte delantera del tracto digestivo, incluye el estómago, donde el carideo mastica la comida e inicia la digestión.
- El intestino medio, también conocido como hepatopáncreas, es la parte más larga del tracto digestivo. Produce enzimas digestivas y absorbe nutrientes, así como metaboliza lípidos y carbohidratos.
- El intestino distal es la parte trasera del tracto digestivo. Es una estructura tubular que termina en el ano.

Figura 6

Anatomía de camarones peneidos



Nota. Esta imagen muestra la anatomía de camarones peneidos, resaltando el tracto digestivo: estómago (1), hepatopáncreas (2) e intestino (3) (Bondad et al., 2001).

2.1.5. Microbiota intestinal de los Camarones

Los camarones tienen una comunidad de microorganismos que viven en su tracto digestivo. Esta comunidad, conocida como microbiota intestinal, desempeña un papel fundamental en la salud de los camarones. Los microorganismos de la microbiota intestinal ayudan a los camarones a digerir los alimentos, absorber los nutrientes y protegerse de las enfermedades (Garibay et al., 2020).

La microbiota intestinal de los camarones comienza a desarrollarse desde el momento de su nacimiento o eclosión. En los animales terrestres, la microbiota intestinal se origina en la madre, el método de parto y el alimento inicial; en los animales acuáticos, como los camarones peneidos, la microbiota intestinal se adquiere a través del contacto directo con el ambiente acuático (Tzuc et al., 2014).

La microbiota intestinal también desempeña un papel importante en la protección del organismo, algunas bacterias producen compuestos antimicrobianos que ayudan a combatir las infecciones, las bacterias beneficiosas pueden desplazar a las bacterias patógenas y activar el sistema inmunitario, aumentando así la resistencia a las enfermedades y mejora la salud general del organismo (Villaseñor et al., 2015).

El intestino de los camarones es un órgano importante que alberga una gran variedad de bacterias que ayudan al camarón a crecer y desarrollarse, y también lo protegen de las enfermedades, los camarones larvarios consumen microalgas, que son el primer alimento que ingieren, las mismas junto con la formación de la columna de agua, proporcionan los primeros microbios que colonizan el tracto digestivo del camarón; posteriormente, la microbiota intestinal del camarón se ve influenciada por una mezcla de factores genéticos del camarón y el entorno en el que se desarrolla (Cornejo et al., 2018).

La composición de las bacterias en el intestino de los camarones es diferente según se determine directamente o después de cultivarlas. Esto se ha demostrado gracias a la metagenómica dirigida al ADN ribosómico bacteriano, una tecnología que secuencia las muestras de ADN para identificar todas las bacterias presentes, incluidas las que no se pueden cultivar en el laboratorio (Motte et al., 2018).

Se han realizado numerosos estudios sobre la microbiota del camarón, donde utilizaron la metagenómica dirigida para investigar los efectos de la suplementación dietética con *Lactobacillus pentosus* HC-2 (HC-2), *Enterococcus faecium* NRW-2, o el sobrenadante libre de bacterias de un cultivo de HC-2 sobre la composición bacteriana de *Litopenaeus vannamei*, otros estudios han abordado temas como la influencia de la dieta, el entorno y las enfermedades en la microbiota intestinal del camarón (Sha et al., 2016).

Tabla 4

Influencia de la etapa de desarrollo en la microbiota del tracto digestivo.

Factor	Etapa de desarrollo	Efecto
Estilo de vida	Cultivo	Mayor diversidad bacteriana (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria)
Órganos	-Intestino	-Mayor diversidad bacteriana (Bacterias del filo Firmicutes y Gamma-proteobacteria) Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes).
	-Estómago, hepatopáncreas	- <i>Pseudoalteromonas</i> y <i>Vibrio</i> .
	-Células hepatopáncreas del	- <i>Proteobacteria</i> (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Archaea).
	-Sangre	- <i>Proteobacteria</i> (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria)
Etapa de desarrollo	Postlarval	-Aeromonas, Plesiomonas, Photobacterium, <i>Pseudomonas</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> y <i>Vibrio</i> .

Nota. Esta tabla indica la influencia de la etapa de desarrollo en la microbiota del tracto digestivo y órganos de camarones peneidos (Valdez et al., 2014).

2.1.6. Enfermedades en sistemas de cultivos de camarón

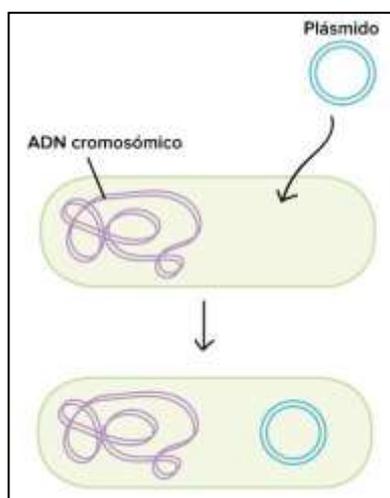
2.1.6.1. Mecanismos de transferencia de ADN

Las bacterias pueden transferir genes entre sí mediante mecanismos que permiten el movimiento de ADN de una célula a otra. Estos mecanismos se denominan elementos genéticos móviles, y pueden transferirse de tres maneras: conjugación, transducción y transformación (O'Malley y Struhl, 2014).

La transferencia de ADN de una bacteria a otra requiere que las dos bacterias entren en contacto directo. Este proceso, llamado conjugación, es mediado por un plásmido, un pequeño fragmento de ADN que se replica de forma independiente al cromosoma de la bacteria. La conjugación requiere que las células se encuentren en contacto directo y que las células donantes tengan el plásmido que se va a transferir, mientras que las células receptoras no lo tengan (Bhatty et al., 2013).

Figura 7

Mecanismo de transferencia del ADN entre bacterias.



Nota. Esta imagen indica cómo se lleva a cabo el mecanismo de transferencia del ADN bacteriano (Bhatty et al., 2013).

Los virus que infectan a las bacterias, también conocidos como fagos, pueden transferir ADN de una bacteria a otra, este proceso se llama transducción. En la transducción general, un fago infeccioso accidentalmente incorpora ADN bacteriano en su cabeza. Cuando el fago infecta a otra bacteria, puede transferir el ADN bacteriano a la nueva célula; en la transducción especializada, un fago lisogénico, que se integra en el cromosoma bacteriano, puede transferir ADN bacteriano cuando se replica (Gyles et al., 2014).

Cuando un fago se integra en el cromosoma bacteriano, puede ocurrir que la inserción no sea perfecta, lo que significa que una parte del ADN del fago no se corta por completo, esto puede provocar que una región del cromosoma bacteriano adyacente al sitio de inserción del fago se transfiera a otra bacteria cuando el fago se replica.

Algunos fagos contienen genes de virulencia, que son genes que permiten al fago infectar y matar a la bacteria. Estos genes de virulencia pueden expresarse en niveles elevados cuando el fago se replica y abandona su fase latente (Berg et al., 2015).

La transformación es un proceso de transferencia de ADN en el que las bacterias captan ADN libre que se encuentra en el medio ambiente y lo incorporan a su genoma. El ADN monocatenario atraviesa la pared y membrana celular de la bacteria receptora y se integra al cromosoma bacteriano por recombinación homóloga o no homóloga. La recombinación homóloga es un proceso de recombinación genética que requiere que las secuencias de ADN que se van a recombinar sean complementarias. La recombinación no homóloga es un proceso de recombinación genética que no requiere que las secuencias de ADN que se van a recombinar sean complementarias (Kidane et al., 2012).

La presión selectiva determina qué genes adquiridos se mantienen en una población bacteriana. El ADN adquirido por transferencia de genes horizontal puede cambiar con el tiempo debido a mutaciones, cambios físicos e interacciones con el medio ambiente, la pérdida de ADN también puede producirse por las mismas fuerzas que modifican el ADN adquirido. En algunos casos, la pérdida de ADN o su silenciamiento se asocia con una mayor virulencia (Berg et al., 2015). El ADN extraño a menudo se presenta en forma de bacteriófagos virulentos, y las bacterias tienen varios mecanismos para prevenir la expresión del ADN que ingresa (Gyles et al., 2014).

2.1.7. Enfermedades bacterianas en camarones

2.1.7.1. Características del género *Vibrio*.

Las bacterias, especialmente las del género *Vibrio*, han sido identificadas como la causa de varias enfermedades en el cultivo de camarones, lo que ha resultado en pérdidas económicas significativas en varios países productores de camarones a lo largo de la historia de la industria del cultivo de camarones (FAO, 2021). *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria patógena que puede causar enfermedades en los humanos y los animales. En los camarones, *Vibrio parahaemolyticus* puede causar infecciones intestinales, septicemia y muerte (Varela et al., 2016).

Las enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio* se conocen como vibriosis. Inicialmente, se pensaba que estas bacterias eran patógenos secundarios en los cultivos de camarón, es decir, que causaban enfermedades solo en camarones que ya estaban debilitados por otros factores. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que estas bacterias pueden ser patógenos primarios, es decir, que pueden causar enfermedades graves en camarones sanos. Un ejemplo de esto son las cepas de *Vibrio* que causan la AHPND, una enfermedad que produce una toxina altamente letal para los camarones (Dong et al., 2019).

Las mayores epidemias de vibriosis en camarones se han registrado en la región Indo-Pacífica, Japón y América Central (Orellana, 2017). Las especies de *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus* están asociadas con estas infecciones y se consideran patógenos oportunistas, es decir, que causan enfermedades sólo en camarones que ya están debilitados por otros factores (Espinoza, 2014).

2.1.7.2. Hepatopancreatitis

Para diagnosticar la hepatopancreatitis, es necesario diferenciar entre dos procesos causantes de esta enfermedad, el primero es una infección bacteriana extracelular, que causa la acumulación de bacterias en el hepatopáncreas, esta infección se conoce como hepatopancreatitis necrotizante séptica (NHP-S) y es causada principalmente por cepas patogénicas del género *Vibrio*; el segundo proceso es una infección bacteriana intracelular, que es causada por bacterias obligadas del tipo de las rickettsias, en este caso, la respuesta del sistema inmune no es inmediata y se forman cápsulas multifocales para inhibir al patógeno. Esta infección se conoce como hepatopancreatitis necrotizante bacteriana (NHP-B) (Mejía et al 2015).

2.1.7.3. Síndrome de Zoea II

El síndrome de Zoea II es una enfermedad infecciosa que ataca a las larvas de camarones blancos y azules en el estadio de Zoea II. La enfermedad causa altas mortalidad y se caracteriza por una acumulación de células descamadas en el hepatopáncreas, el intestino medio y el posterior. La enfermedad se reportó por primera vez en la década de 1980 en México, y desde entonces se ha reportado en varios países de América Latina, Asia y África. Los factores que contribuyen a la

aparición de la enfermedad incluyen la calidad del agua, la temperatura y la densidad de cultivo (Chumpol et al., 2017). Se presentan altas mortalidades después de 36-48 horas de haber pasado de Zoea I a Zoea II, las sintomatologías más importantes son la anorexia, rápida evacuación del contenido intestinal, letargo con nado errático y la permanencia en el fondo del tanque de los organismos infectados (Morales et al., 2008).

2.1.7.4. Enfermedad de luminiscencia

Durante los episodios de alta mortalidad se han aislado las especies *Vibrio harveyi* y *V. Splendidus* principalmente (Gómez et al, 2001). Los organismos infectados con esta bacteria se observan con luminiscencia, letargo (disminución de la actividad normal), nado errático, permanencia en el fondo del tanque y mortalidades masivas (Cuéllar-Anjel et al., 2008).

2.1.7.5. AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda)

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una enfermedad bacteriana que afecta a los camarones y puede causar grandes pérdidas económicas a la industria acuícola. La enfermedad se caracteriza por una mortalidad masiva de los camarones afectados, que ocurre dentro de los 35 días posteriores a la siembra. La AHPND es particularmente grave en las post larvas, pero también puede afectar a los juveniles y adultos. La AHPND se originó en China y Vietnam en 2010 (Varela et al., 2017).

2.1.7.6. Cepas causantes de AHPND

En un principio, la única especie de *Vibrio* conocida por causar la AHPND era *V. parahaemolyticus*, que albergaba un plásmido pVA1 que transportaba genes *pirABvp*. Sin embargo, los científicos descubrieron que el plásmido pVA1 puede transferirse a otras bacterias. Esto significa que la AHPND podría propagarse a nuevas especies bacterianas, lo que podría aumentar el riesgo de brotes de la enfermedad (García et al., 2023). En particular, se ha informado que *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. punensis* y *V. owensii*, todas bacterias que pueden causar AHPND, también llevan el plásmido pVA1.

Esto sugiere que estas bacterias pueden transmitir la AHPND a los camarones, lo que podría aumentar la propagación de la enfermedad (Beltrán et al., 2020).

2.1.8. Probióticos

A principios del siglo XX, el premio Nobel Elie Metchnikoff descubrió que algunas bacterias de la flora intestinal tienen efectos beneficiosos para la salud. Desde entonces, científicos de todo el mundo han estudiado la microbiota intestinal para comprender mejor sus funciones (Fernandez et al 2014). Parker acuñó el término "probiótico" en 1974 para referirse a organismos y sustancias que ayudan a mantener el equilibrio de las bacterias en el intestino (Perez et al., 2020). La definición de la FAO/OMS (2001) es una de las más aceptadas para los probióticos, esta definición establece que los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, tienen un efecto beneficioso para la salud del organismo.

Los probióticos se pueden encontrar en una variedad de fuentes, pero las más comunes son el tracto digestivo de los animales acuáticos y el mucus de los peces, los mismos también pueden encontrarse en sedimentos de ambientes acuáticos o en consorcios microbianos (Ferreira et al., 2015). Las bacterias probióticas utilizadas en acuicultura deben ser capaces de inhibir o matar a las bacterias patógenas que pueden causar enfermedades a las especies acuáticas (Watts et al., 2017).

Las características que debe tener un microorganismo para ser considerado como probiótico son las siguientes: no dañar al huésped; ser aceptado por el huésped a través de la ingestión, colonización y posterior reproducción dentro del mismo; capacidad de llegar a los órganos meta donde deben ejercer su beneficio; y no ofrecer resistencia a los virus o genes de resistencia antibacteriana. Los probióticos deben seleccionarse con base en su actividad inhibidora contra los patógenos *in vitro*, de igual manera, deben evaluarse para determinar su seguridad o la patogenicidad en los huéspedes (Hill et al., 2014).

2.1.8.1. Uso de probióticos en acuicultura

La acuicultura ha utilizado bacterias beneficiosas conocidas como probióticos para tratar enfermedades acuáticas, inicialmente la acuicultura marina utilizaba bacterias terrestres pero estas cepas no tuvieron mucho éxito debido a que el crecimiento de las bacterias depende del entorno que las rodea (Beltrán et al., 2020).

Cepas bacterianas de origen marino aisladas de agua de cultivo e intestinos de camarones peneidos han sido utilizadas con éxito en cultivos acuícolas. Entre los géneros más utilizados se encuentran *Vibrio* y *Bacillus*. (Kanjana et al., 2017). Las bacterias probióticas y los inmunoestimulantes pueden ayudar a prevenir enfermedades, estas colonizan el tracto digestivo y compiten con los patógenos por los alimentos y el espacio, los mismos estimulan el sistema inmunitario lo que ayuda al cuerpo a combatir infecciones, mejoran la salud, rendimiento de los animales, aumentan la supervivencia y mejoran el crecimiento (Hai, 2015).

Así pues, reformuló el concepto de probióticos para acuicultura como células microbianas vivas que son administradas con el fin de colonizar el tracto digestivo del hospedador mejorando la salud de este, luego los conceptualizan como “organismos vivos que tienen un efecto benéfico en el huésped mediante la modificación de la comunidad microbiana asociada a éste, a través de una mejora en el uso del alimento o su valor nutricional, mediante el incremento de la respuesta del huésped a las enfermedades, o a través del mejoramiento de la calidad de su ambiente” (Kuebutornye et al., 2019).

El uso de bacterias probióticas, basado en el principio de exclusión competitiva, y el uso de inmunoestimulantes son dos de los métodos preventivos más prometedores desarrollados en la lucha contra las enfermedades durante los últimos años, además, las bacterias probióticas podrían producir algunas enzimas digestivas, que podrían mejorar la digestión de los camarones, mejorando así la capacidad de resistencia al estrés y la salud de los camarones (Tomala et al., 2020). Los endosimbiontes bacterianos marinos están surgiendo como una fuente potencial para el desarrollo de nuevos probióticos (Rolania et al., 2017).

La investigación está en progreso para establecer bacterias marinas asociadas a esponjas como fuente potencial de nuevos probióticos para camarones (Domínguez et al., 2019). Se encontró que la Actinobacteria marina endosimbiótica *Nocardiopsis alba* MSA10 aislada de la esponja marina *Fasciospongia cavernosa* mostró una actividad antagonista potencial contra vibrios patógenos de *Penaeus monodon* in vitro e in vivo (Slaby et al., 2017).

La herramienta de acción de un probiótico (Figura 1) incluye la competencia, al sacar bacterias patógenas o producir sustancias bacterianas o bacteriostáticas que van a ocasionar o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, esta acción antibacterial en el hospedero se logra proporcionando bacterias específicas con una maniobra individual o mezcla de bacterias que presentan una acción sinérgica (Rondon et al., 2015). Con ambos mecanismos de acción ocurre la producción de antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, proteasas, peróxido de hidrógeno, alteración del pH del tracto gastrointestinal por la producción de ácidos orgánicos (Abasolo, 2015).

2.1.9. Mecanismos de acción de las bacterias probióticas.

2.1.9.1. Producción de sustancias antibacterianas

Las bacterias ácido-lácticas (BALs), ampliamente utilizadas como probióticos (Vélez et al., 2015), producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Estas bacterias son importantes porque se les ha otorgado el estatus de QPS (presumed safety), es decir, se considera que son seguras para la salud (Rodríguez et al., 2022).

En la acuicultura, los probióticos se utilizan como una alternativa a los antibióticos para controlar las enfermedades, las cepas bacterianas de origen terrestre se han utilizado en la acuicultura marina durante mucho tiempo, pero han tenido un éxito limitado esto se debe a que estas cepas no están adaptadas al entorno marino. Las cepas bacterianas de origen marino, aisladas del agua de cultivo o del intestino de camarones, han tenido más éxito en los cultivos acuícolas (Beltrán, 2020).

2.1.9.2. Exclusión competitiva

Las bacterias probióticas de los géneros *Vibrio* y *Bacillus* han sido utilizadas con éxito en la acuicultura para prevenir enfermedades, estas bacterias actúan mediante mecanismos de exclusión competitiva, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas, además, las bacterias probióticas producen enzimas digestivas que mejoran la digestión de los camarones, lo que mejora su salud y su resistencia al estrés (García, 2018).

Diversos patógenos colonizan al hospedero compitiendo por sitios de adhesión en los epitelios del tracto gastrointestinal. Esta competencia puede ser no específica, basada en factores fisicoquímicos, o específica, involucrando moléculas de adhesión en la bacteria y moléculas receptoras en las células del epitelio (Rodríguez et al. 2022). En un estudio realizado por Pérez et al. (2014), se demostró que cinco cepas probióticas ejercieron exclusión competitiva contra dos patógenos en la mucosa intestinal de peces. Una de estas cepas impidió la adhesión del patógeno a la mucosa intestinal.

La competencia por nutrientes es un mecanismo importante de interacción entre microorganismos. El hierro es un nutriente esencial para todos los microorganismos, pero suele estar limitado en el entorno marino. Las bacterias patógenas secretan sideróforos, compuestos que se unen al hierro y lo hacen disponible para su crecimiento. Las bacterias probióticas productoras de sideróforos también pueden competir con las bacterias patógenas por el hierro, lo que puede ayudar a prevenir enfermedades (Narrillos, 2014).

Las bacterias marinas y las levaduras pueden ser una fuente importante de proteínas para mejorar la nutrición de algunas especies acuáticas cultivadas (Achupallas et al., 2015; Melo et al., 2015; Gamboa et al., 2016 Qiu et al., 2017). Los lípidos producidos por microorganismos marinos también son importantes para la nutrición de las especies acuáticas (Hoseinifar et al., 2016).

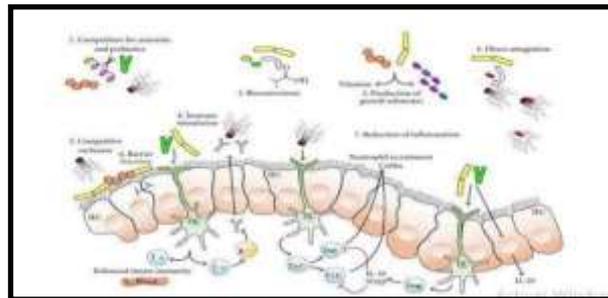
2.1.9.3. Estimulación del sistema inmunológico

La producción de enzimas por microorganismos seleccionados, como lipasas, quitinasas y proteasas, puede mejorar la digestión de los organismos cultivados, lo que puede tener un impacto positivo en su rendimiento productivo (Chai et al., 2016; Seenivasan et al., 2016; Xue et al., 2016). Otra característica importante de los probióticos es su capacidad para fortalecer el sistema inmunológico del huésped, ya que contienen compuestos químicos que activan el sistema inmunológico y estimulan una respuesta de defensa contra virus, bacterias y parásitos que causan enfermedades (Meek, 2019).

Se ha identificado también su acción inmunomoduladora, al mejorar la actividad fagocítica, el estallido respiratorio y la actividad superóxido dismutasa y peroxidasa, así como aumentar el número de leucocitos, linfocitos y eritrocitos en vertebrados (Newaj et al., 2014). En camarones se ha demostrado que cepas probióticas actúan provocando cambios en la actividad superóxido dismutasa (SOD) y la fenoloxidasa (Karthik et al., 2014).

Figura 8

Mecanismos de acción de las bacterias probióticas



Nota. Esta imagen indica cómo reaccionan las bacterias a los probióticos (Karthik et al., 2014).

Seleccionar cepas probióticas deberá basarse en métodos de colonización, la capacidad de competencia contra los patógenos y el efecto sobre el sistema inmune (Van Doan et al., 2019). Al realizar tratamientos con cepas probióticas en laboratorios de producción de larvas de camarón se alcanzaría un equilibrio entre microorganismos beneficiosos y nocivos competitivos (García et al., 2023).

Las bacterias probióticas pueden excluir a los patógenos compitiendo así por los sitios de adhesión en la microbiota intestinal, esta es una propiedad importante de los probióticos, que permite prevenir las infecciones (Cifuentes et al., 2018). La selección de cepas bacterianas con potencial probiótico para el sector camaronero es un desafío, se conoce poco sobre cómo estas bacterias interactúan con la microbiota nativa del camarón, tanto residente como transitoria (Van Doan et al., 2019).

Seleccionar un grupo de microorganismos con efectos probióticos es de suma importancia en la acuicultura, se deben tener en cuenta factores como la fuente de donde se aislaron y la potencialidad de competencia con patógenos.

Durante las primeras experimentaciones de incorporación de consorcios probióticos en alimentos para la acuicultura, se emplearon preparaciones comerciales diseñadas para organismos de crianza terrestre (Pacheco, 2015).

Las cepas más utilizadas como probióticos pertenecen al grupo de bacterias de ácido láctico y bifidobacteria debido a que forman parte importantes en la microbiota gastrointestinal (Sebastián-Domingo et al., 2017). El uso de bacterias ácido-lácticas fue eficiente para mejorar la producción de rotíferos y la tasa de crecimiento de larvas de lenguado (Cornejo, 2017). La supervivencia de estas cepas comerciales en el TGI de peces es incierta, llevando sólo a recuperar algunas colonias de bacillus sp de larvas de rodabayo (León et al., 2016).

Por lo tanto, los probióticos aislados de ambientes marinos resultan ser más eficientes que aquellos productos comerciales (García et al., 2015). En la búsqueda de bacterias con potencial probiótico se las ha llegado a realizar a partir de diversas fuentes tales como agua, sedimentos, plancton, invertebrados, mucosa de la piel de peces, ceparios, productos comerciales y particularmente del tracto digestivo de animales acuáticos (Newaj et al., 2014). Otra fuente de cepas se puede obtener de colecciones de cultivos de bacterias y productos comerciales. Se ha sugerido que los agentes probióticos deben ser aislados preferiblemente del TGI debido a que estas bacterias están adaptadas a tolerar condiciones extremas en el tracto digestivo, y a la vez poseen la habilidad de adherirse a la superficie intestinal (Caipang et al., 2010). Los mecanismos de acción de *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* tienen la capacidad de ser bacterias probióticas, comúnmente se extraen los géneros que tiene características inmunitarias por la facilidad de adherirse a la mucosa intestinal para colonizar y no permitir el paso de patógenos hacia el lumen (Laranja et al., 2017).

En larvas de *L. vannamei* también se reporta un incremento en la supervivencia con una cepa aislada del ostión *C. corteziensis* (cepaYO 12-1) a dos concentraciones (1×10^4 UFC mL⁻¹ y 1×10^6 UFC mL⁻¹), recientemente aislaron y seleccionaron cepas de *Bacillus subtilis* del TGI de la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa*, reportando que esta bacteria tuvo un efecto benéfico sobre el crecimiento y respuesta inmune del camarón *L. vannamei* en concentraciones de 1×10^6 UFC mL⁻¹ (Sanchez et al., 2015).

Para seleccionar microorganismos probióticos es necesario utilizar una serie de bioensayos *in vitro* e *in vivo*. Primeramente, se aíslan cepas con característica anti microbianas eficientes para luego ejercer un antagonismo frente a cepas patógenas del hospedero de forma *in vitro*, esta competencia requiere de medios de cultivo sólidos o líquidos selectivos los mismos que tienen la ventaja de evaluar la capacidad de las cepas mediante productos extracelulares de estas, como es la potencialidad secretada por la interacción de metabolitos secundarios para inhibir a las bacterias patógenas (Verschuere et al., 2000).

Aunque esta primera etapa de selección es efectiva se debe tener en cuenta ya que la ausencia de inhibición no es criterio suficiente para descartar otras cepas como candidatas a probióticos (Verschuere et al., 2000). Los modelos *in vitro* para determinar la adhesión bacteriana son indispensables y nos ayudan a seleccionar cepas con potencial probiótico (Ouweland y Salminen et al., 2003).

2.1.10. Los probióticos y la calidad del agua en la acuicultura

El empleo de probióticos provoca un efecto beneficioso en la descomposición de la materia orgánica lo cual ayuda a mejorar la calidad del agua en los cultivos (Bernal et al., 2020). Otros autores afirman que entre las bacterias Gram negativas y Gram positivas estas últimas están transformando mejor la materia orgánica en CO², y es así como durante un ciclo de producción los niveles altos de bacterias Gram positivas pueden minimizar la acumulación de oxígeno disuelto y carbono orgánico durante el ciclo de cultivo y las floraciones de fitoplancton se mantiene estables con el aumento de la producción de CO² (Braida et al., 2015).

2.1.11. Pruebas *in vitro* para la selección de cepas con carácter probiótico

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se suministran en cantidades favorables, pueden beneficiar la salud del hospedero, para que un organismo vivo se considere probiótico debe cumplir una serie de exigencias, incluido el origen de

la cepa, este requisito es importante porque algunas acciones de los probióticos son específicas para el huésped del que fueron aislados (Martinez, 2020). La eficacia de los probióticos como productos bioactivo o bioestimulantes en la dieta también depende de la cepa utilizada, no todas las cepas tienen la misma capacidad de modular la microbiota intestinal, por ello, las bacterias que se pueden utilizar como probióticos en la alimentación se seleccionan con base en una serie de requisitos que deben cumplir, estos requisitos se evalúan de forma individual para cada cepa (Sanchez et al., 2015)

2.1.11.1. Resistencia a medios ácidos

Las bacterias probióticas deben superar la acidez gástrica para llegar al intestino y ejercer sus beneficios, la acidez gástrica es producida por los jugos gástricos, que son una defensa natural del cuerpo contra los microorganismos patógenos (Lasserrot, 2016).

2.1.11.2. Crecimiento en concentración de sales biliares

Para evaluar la capacidad de resistencia como es el 3% a los efectos de los ácidos biliares, estos son sintetizados en el hígado a partir del colesterol y secretados por la vesícula biliar hacia el duodeno (Velez, 2015).

2.1.11.3. Actividad hemolítica

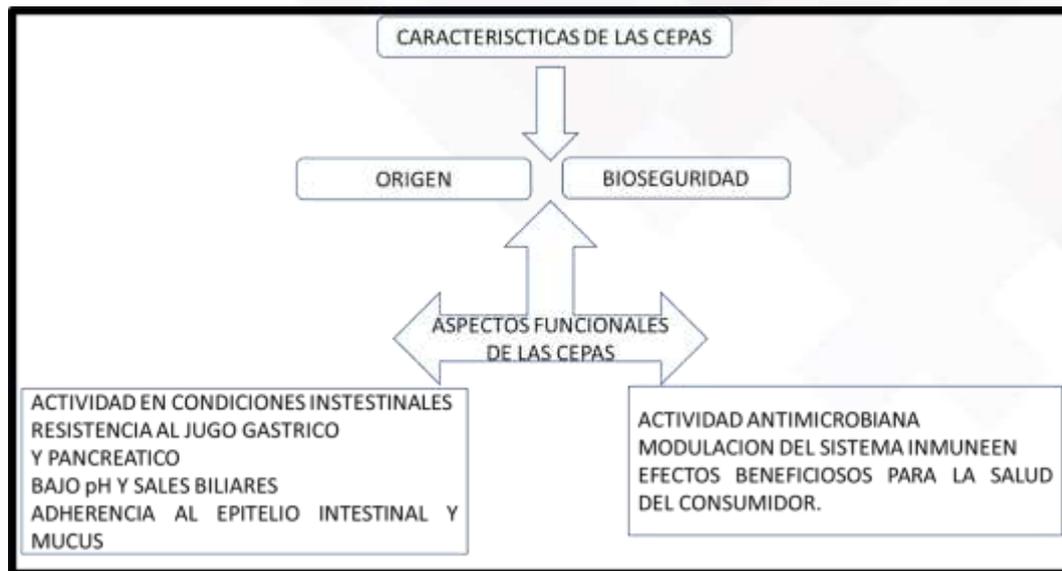
Es la capacidad de una bacteria de destruir los glóbulos rojos. Esta propiedad es indeseable en las bacterias probióticas, ya que puede causar anemia y otros problemas de salud en el huésped. Por lo tanto, es importante evaluar la actividad hemolítica de las bacterias probióticas antes de su uso (Soto et al., 2023).

2.1.11.4. Susceptibilidad a los antibióticos

La mayoría de las bacterias probióticas son seguras para los humanos y se utilizan de forma habitual en la fermentación de alimentos, sin embargo, es importante evaluar su resistencia a los antibióticos y la ausencia de genes de resistencia transferibles, estas pruebas se realizan para garantizar que las bacterias probióticas puedan colonizar eficazmente el intestino e inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Melgarejo et al., 2017).

Figura 9

Características de las cepas



Nota. Este cuadro describe los aspectos funcionales de las cepas (Elaboración propia).

2.1.11.5. Metagenómica

La metagenómica es una técnica que permite analizar el conjunto de genes de una comunidad microbiana, sin necesidad de aislar y cultivar las bacterias individuales, esto se puede hacer mediante dos enfoques principales: la meta taxonómica, que se centra en secuenciar genes marcadores para identificar los diferentes grupos de bacterias presentes; y la metagenómica completa, que se centra en secuenciar todo el material genético de la comunidad, lo que permite identificar las funciones y características de las bacterias individuales (Blanot, 2020).

Las plataformas de tercera generación de secuenciación, como MinION, tienen un alto error intrínseco. Sin embargo, este inconveniente se puede compensar con lecturas más largas, que proporcionan más información para corregir los errores. MinION es una plataforma muy conveniente para aplicaciones metagenómicas, ya que es de fácil acceso, es portátil y proporciona información en tiempo real. Sin embargo, no hay consenso sobre las herramientas de ensamblaje que se deben usar para obtener los mejores resultados con MinION (Blanot, 2020).

Después de realizar el análisis metagenómico de una comunidad, se obtienen millones de lecturas clasificadas en distintos niveles taxonómicos, un punto crucial en la investigación es la manera de interpretar los datos obtenidos en dicha secuenciación, para estudiar la biodiversidad es importante plantearse tres preguntas estratégicas: ¿Qué elementos la componen?, ¿Cómo están organizados? y ¿Cómo interactúan entre sí? De esta forma, se logrará organizar la información de una manera más adecuada e ir más allá de un simple listado de clasificaciones taxonómicas (Rabago, 2017).

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de investigación

Este trabajo de investigación es descriptivo y experimental ya que se manipula una variable (las cepas probióticas) para evaluar su efecto antagónico *in vitro* contra *Vibrio parahaemolyticus*. La metodología incluirá análisis de metagenomas para caracterizar la diversidad microbiana.

3.2. La población y la muestra

3.2.1. Características de la población

El trabajo de investigación está dirigido al primer eslabón de la cadena productiva en el sector acuícola, es decir los laboratorios de producción de larvas de camarón.

3.2.2. Delimitación de la población

Actualmente son pocos los estudios que la ciencia ha realizado en nuestro país sobre las distintas especies bacterianas que son capaces de tolerar procesos químicos de desinfección, la investigación podría ser de gran utilidad biotecnológica, por ello, se plantea el estudio metagenómico de dichas comunidades bacterianas y su posible comunicación directa con la microbiota de los camarones.

3.2.3. Tipo de muestra

Los modelos de regresión logística se utilizarán para predecir la probabilidad de que ocurra un evento, en función de una o más variables, en este caso la variable dependiente sería la probabilidad de que *Vibrio parahaemolyticus* se inhiba en presencia de la bacteria probiótica. Las variables independientes podrían incluir la concentración de la bacteria probiótica, el tipo de bacteria probiótica y otras características tales como las del medio de cultivo.

3.2.4. Tamaño de la muestra

No existe un tamaño de muestra adecuado, pero se realizó análisis según NORMA INEN 1205 donde se determina el número total de bacterias en placa. Esta norma establece el número de recuento en placa para determinar la densidad de las bacterias heterótrofas y anaerobias facultativas presentes en el agua.

3.2.5. Proceso de selección de la muestra

La población de estudio estará compuesta por las muestras de agua de mar del reservorio del laboratorio de producción de larvas de camarón TIBALLOSA la cual fue recolectada para la siembra, los mismos que fueron sometidos a tratamiento químico con ozono durante los ciclos de siembra que serán cada 10 días en un mes, esta será

representativa de la diversidad bacteriana del agua de mar que entra al sistema de cultivo de forma natural.

3.2.6. Los métodos y las técnicas

3.2.6.1. Identificación de cepas de bacterias nativas de reservorios que contienen agua de mar preparada para el ciclo de siembra.

3.2.6.2. Toma de muestra

Para el aislamiento e identificación se tomaron muestras de agua al azar de 4 puntos diferentes, se desinfectaron con ozono y fueron pasadas por bolsos filtrantes de 0,5 μm , luego se mezclaron entre sí y se obtuvo una muestra patrón, posterior se colocó en un tubo falcón de 50 ml y se conservó la muestra 4°C con hasta su respectivo análisis (Borbor et al., 2023).

3.2.6.3. Medios de cultivo utilizados

3.2.6.3.1. Agar Trypticosa soya (TSA)

Es un medio nutritivo para usos generales empleado para el crecimiento y aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias favoreciendo el desarrollo de la mayoría de los microorganismos exigentes de interés investigativo.

El medio de cultivo sólido de rehidrato de la siguiente forma, suspendiendo 32 g de agar en 800 ml de agua destilada, 4 g de agar agar y 16 g de cloruro de sodio para ajustar la salinidad del agua de mar. Se llevó hasta ebullición de 1 a 2 minutos. La esterilización del medio se realizó en autoclave (XFS – 280A vertical type) a 120° C, 15 lb de presión durante 15 minutos. Posterior se distribuyó en placas de Petri estériles 20 ml del medio en cada una y se almacena a 2 – 8 °C hasta su uso; el pH final fue de 8,6 ± 0,2 a 25 °C. Las muestras se sembraron por la técnica de extensión en placa 100 µl, en el medio Agar TSA (DIFCO) (Mory et al., 2016)

Tabla 5

Composición de Agar TSA

Formula aproximada	g/l
Triptona	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

Nota. *Esta tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (Elaboración propia).*

3.2.6.3.2. Agar TCBS (Tiosulfato Citrato de Sales Biliares)

Medio de cultivo selectivo utilizado para el cultivo y aislamiento de especies de *Vibrios* presentes en muestras de aguas salinas y estuarinas entre otras. El medio de cultivo sólido se preparó de la siguiente manera: se agregaron 70,4 g de medio Tiosulfato Citrato de Sales Biliares (TCBS) en 800 ml de agua destilada, 16 g de cloruro de sodio ajustando la salinidad al 2 % de cloruro de sodio pues es la correspondiente a la salinidad del agua de mar, se calentó hasta ebullición y hervir de 1 a 2 minutos este medio no debe ser esterilizado. Distribuir en placas de Petri estériles 20 ml del medio en cada una y se almacena a 2 – 8 °C hasta su uso; el pH final fue de 8,4 ± 0,2 a 25 °C (Guzman et al., 2020). Las muestras de agua se sembraron por técnica de extensión en placa 100 µl de muestra en el medio Agar TCBS (ACUMEDIA).

Tabla 6

Composición de Agar TCBS.

Formula aproximada	g/l
Extracto de levadura	5.0
Peptona de carne	5.0
Tripteina	5.0
Citrato de sodio	10.0
Tiosulfato de sodio	10.0
Bilis de buey	8.0
Sacarosa	20.0
Cloruro de sodio	10.0
Citrato férrico	1.0
Azul de bromotimol	0.04
Azul de timol	0.04
Agar	15.0

Nota. Está tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (**Elaboración propia**).

Agar MRS (Man Rugosa Shamr)

Medio de cultivo selectivo para el crecimiento de bacterias de géneros tales como *Bacillus* y *Lactobacillus*. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 120 °C, 15 lb de presión durante 20 min. Las muestras se sembraron por extensión en placa 100 µl en el medio Agar MRS (Man Rugosa Shamr) ajustando la salinidad al 2 % para la correspondiente a salinidad (Rocha et al., 2022).

El medio de cultivo sólido se preparó de la siguiente manera: Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada, se agregan 17,06 g de medio Man Rugosa Shamr (MRS) en 250 ml de agua destilada, 5 g de cloruro de sodio (salinidad anteriormente descrita), se deja reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave (XFS – 280A vertical type) durante 15 minutos a 121 °C, el pH final fue de 6,4 ± 0,2 a 25 °C finalmente distribuir en cajas Petri desechables 20 ml del medio en cada una y se almacenó a 2 – 8 °C hasta su uso (Escañuela, 2018).

Tabla 7

Composición de Agar MRS

Formula aproximada	g/l
Proteosa peptona N° 3	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitan	1ml
Fosfato dipotasico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganesio	0.05
Agar	13.0

Nota. Está tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (**Elaboración propia**).

3.2.6.3.3. Agar Chromagar *Bacillus*

Medio de cultivo utilizado para aislamiento y diferenciación entre varias especies de *Bacillus* empleando sustratos cromogénicos (Murray et al., 2017). El medio de cultivo sólido se preparó de la siguiente manera: se suspendió 12,3 g del medio en un litro de agua destilada, se agregó (Chromagar Bacillus Agar) en 250 ml de agua se dejó reposar durante 5 minutos, luego se mezcló calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave (XFS – 280A vertical type) a 120 °C, 15 lb de presión durante 15 min, el pH final fue de 7,1 ± 0,2 a 25 °C luego enfriar a 45- 50° C y añadir asépticamente el contenido rehidratado de 1 vial de polimixina B selectiva (Suplemento TS- 058) si se desea luego verter en cajas Petri desechables 20 ml del medio en cada una y se almacenó a 2 – 8 °C hasta su uso Las muestras se sembraron por extensión en placa 100 µl en el medio Chromagar Bacillus Agar (Vega et al., 2020).

Tabla 8

Composición de Agar Cromogénicos *Bacillus*

Formula aproximada	g/l
D- Mannitol	10.0
Digerido peptidico de tejido animal	5
Cloruro de sodio	10.0
Agar	15.0
Mezcla cromogenica	3.2
Extracto de carne	1.0
Rojo fenol	0.025

Nota. Está tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (**Elaboración propia**).

3.2.6.3.4. Chromagar Vibrio

Medio cromogénico para el aislamiento y la detección de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*. Presente de forma natural en plantas y animales marinos, el género *Vibrio* cuenta con más de 20 especies de las que cuatro (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae*) representan un riesgo grave para la salud pública (Murray, 20217).

El medio de cultivo sólido se preparó de la siguiente manera: Suspender 18,6 g del medio en 250 ml de agua destilada estéril, en 250 ml de agua se deja reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. No esterilizar. En caso de muestras con alta presencia de *Aeromonas*, pueden añadirse 50 mg de cefsulodina a la mezcla una vez enfriado a 45-50 °C (50 mg/L). Verter el medio en placas de Petri estériles. Almacenar en la oscuridad antes de usar. Las placas preparadas con medio pueden conservarse durante un día a temperatura ambiente. Las placas pueden almacenarse hasta 1 mes refrigeradas (2/8 °C) si se han preparado correctamente y se protegen de la luz y la deshidratación, pH final del medio almacenamiento 15/30 °C 9,0 +/- 0,2 (Galaviz et al., 2021). Las muestras se sembraron por extensión en placa 100 µl en el medio (Chromagar Vibrio).

Tabla 9

Composición de Chromagar Vibrio

Formula aproximada	g/l
Extracto de peptona y levaduras	8
Sales	51.4
Mezcla cromogenica	0.3

Nota. Está tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (**Elaboración propia**).

3.2.6.3.5. Agar Trypticasa Soya Broth (TSB).

Medio digerido de soja y caseína es un medio líquido para enriquecimiento de uso general utilizado en procedimientos cualitativos para la prueba de esterilidad y para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes (Moreno et al., 2012). El medio de cultivo líquido fue rehidratado de la siguiente forma, suspendiendo 7,5 g de agar en 250 ml de agua destilada, y 0,5 g de cloruro de sodio para ajustar la salinidad del agua de mar. Se calentó hasta ebullición y hervir de 1 a 2 minutos mantener entre 2 – 8 °C hasta su uso. Agar TSB (DIFCO) pH 7,3 ± 0,2 (TSB., 2002) la esterilización del medio se realizó en autoclave (XFS – 280A vertical type) a 120° C, 15 lb de presión durante 15 minutos. Almacenamiento de 2-30°C (Marshall, 1992).

Tabla 10

Composición Agar Trypticasa soya broth

Formula aproximada	g/l
Digestion pancreatica de caseina	17.0
Digestion de papaina de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.5
Fosfato dibasico de hidrogeno	2.5

Nota. *Está tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (Elaboración propia).*

3.2.6.3.6. Agar Cetrimide

Es un medio selectivo muy utilizado para el aislamiento y la identificación de especies de *Pseudomonas aeruginosa*, estas producen por la adición de glicerina al 1% pirocianina, una pigmentación verde azulada que imparten las colonias a través del medio. La cetilmetrilamonio es un amonio cuaternario (detergente catiónico) que permite la inhibición de floras de acompañamiento en la muestra, inhibiendo las cepas de *Proteus*, *E. coli* y *Stafilococcus aureus* (Quintanilla et al., 2022).

El medio de cultivo líquido fue rehidratado de la siguiente forma, suspendiendo 36,2 g de agar en 800 ml de agua destilada, 16 g de cloruro de sodio para ajustar la salinidad del agua de mar y 8 ml de glicerol. Se calienta hasta ebullición y hervir de 1 a 2 minutos. La esterilización del medio se realizó en autoclave (XFS – 280A vertical type) a 120° C, 15 lb de presión durante 15 minutos. Mantener entre 2 – 8 °C hasta su uso. Agar TSB (DIFCO) pH 7,2 ± 0,2 (Villafañe, 2018). 38

Tabla 11

Composición del agar Cetrimide

Formula aproximada	g/l
Peptona	20
Corouro de Magnesio	1.4
Sulfato de potasio	10
Cetrimide (Bromuro de Cetiltrimetilamonio)	0.3
Agar	13.6

Nota. Está tabla indica de que sustancias está formado el Agar proporcionada por el fabricante (**Elaboración propia**).

3.2.6.4. Técnicas microbiológicas

3.2.6.4.1. Material Biológico

3.2.6.4.2. Denominación de cepas bacterianas

- 1- Colonia invasiva (C.INV)
- 2- *Vibrio parahaemolyticus* (V.p)
- 3- Consorcio bacteriano 5 (CN5)
- 4- Consorcio bacteriano (RS3)

3.2.6.5. Aislamiento bacteriano de *Vibrio parahaemolyticus*

Para la obtención de las cepas bacterianas de *Vibrio Parahaemolyticus* se utilizaron las muestras recolectadas provenientes de 0,1 gr de nauplios de camarón macerado dentro de tubos eppendorf esterilizados, con solución salina al 2% de cloruro de sodio. Luego de la maceración, se realizaron 2 diluciones seriadas en base 1/10 en tubos eppendoff de 1.5 ml estériles, las muestras provenientes de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} se sembraron 100 μ l en placas de petri conteniendo TCBS y chromagar *Vibrio*. Luego se incubó por 24 hrs a 32° C (Paredes et al., 2018).

3.2.6.6. Aislamiento bacteriano de muestras de agua de mar del reservorio en medios específicos para gram positivos y gram negativos.

Para las muestras provenientes del Reservorio #3 se sembró 100 ul de agua de mar en medios específicos agar TCBS; agar Cetrimide; MRS, Chromagar *Vibrio*, Chromagar bacillus y TSA) con el propósito de iniciar el proceso de selección., luego se incubo por 24 hrs a 32° C.

3.2.6.7. Lectura de las siembras.

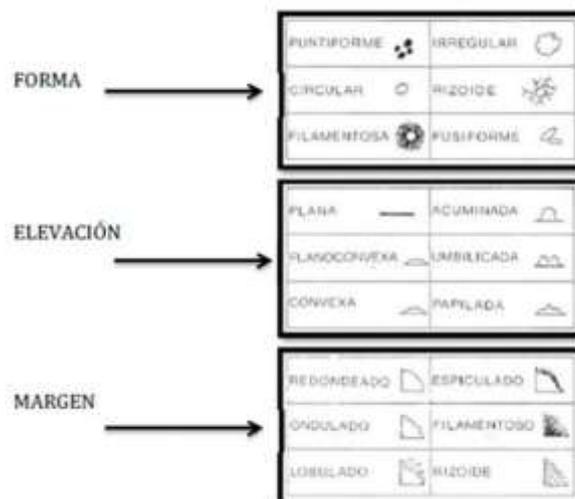
Después de transcurrir 24 horas de incubación, se llevó a cabo la primera lectura en las placas de Petri con evidencia de crecimiento bacteriano tras completar este paso, se procedió a volver a incubar las mismas placas de Petri para otorgar un periodo adicional destinado a la posible proliferación de nuevas colonias, ya que el tiempo podría ser un factor crítico en el desarrollo bacteriano. Después de 48 horas, se efectuó una segunda observación, se realizaron conteos y se eligieron las cepas bacterianas más relevantes.

3.2.6.8. Selección de colonias de los diferentes medios y características morfológicas.

Se consideraron diversas características morfológicas (típicas) para la clasificación de las bacterias en los grupos deseados para el aislamiento (Bacillus, Pseudomonas, Lactobacillus), a continuación se describen las características que se tuvieron en cuenta: la forma de la colonia, la presencia de colonias con tonalidades cremosas, blancas y amarillas, bordes completos, forma convexa, disposición redonda o irregular, seleccionando cinco colonias de cada tipo en cada una de las muestras sembradas (Vargas et al., 2014).

Figura 10

Selección de colonias de acuerdo con características morfológicas.



Nota. Clasificación de las bacterias según su forma superficie y borde (Vargas et al., 2014).

3.2.6.8.1. Agar MRS (*Bacillus* y *Lactobacillus*).

De las muestras sembradas e incubadas durante un periodo de 48 hrs se seleccionaron las colonias que exhibieron tamaños pequeños o medianos, es decir, en un rango de 1 mm a 2 mm, con una coloración blanca ligeramente grisácea y bordes que variaba entre lisos y ligeramente rugosos. La presencia predominante de estas bacterias en el medio fue evidente, ya que no se registró el crecimiento de ningún otro tipo de bacterias. No se llevaron a cabo conteos en esta siembra, ya que el objetivo principal era identificar el desarrollo de cepas con las características deseadas.

3.2.6.8.2. Agar TCBS (*Vibrios*)

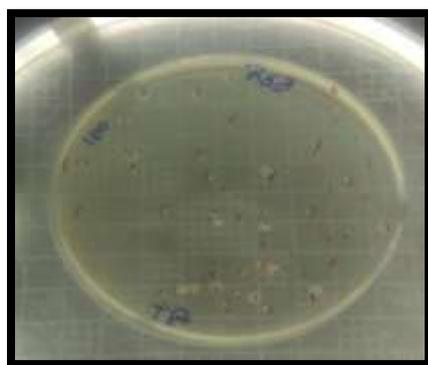
Se observó la ausencia de desarrollo de las cepas en este medio de agar. Como resultado, se dedujo que la presencia de bacterias, como las especies de *Vibrios*, no estaba presente entre las colonias que fueron seleccionadas.

3.2.6.8.3. Agar TSA (Crecimiento en general)

En el medio de cultivo general, se llevó a cabo el recuento de colonias utilizando un contador específico, seguido por la selección de colonias mediante un marcador permanente. Se identificaron y marcaron colonias con características como color cremoso, blanco y amarillo, bordes completos, forma convexa, redonda e irregular en cada una de las muestras sembradas.

Figura 11

Crecimiento bacteriano en Agar TSA



Nota. *Crecimiento bacteriano en Agar TSA (Elaboración propia).*

3.2.6.8.4. Agar Cetrimide (*Pseudomonas* y *Aeromonas*).

Se observó la ausencia de desarrollo de las cepas en este medio de agar. Como resultado, se dedujo que la presencia de bacterias, como las especies de *Pseudomonas*, no estaba presente entre las colonias que fueron seleccionadas.

Figura 12

Ausencia de crecimiento en agar Cetrimide



Nota. Esta imagen muestra que no existió crecimiento bacteriano en el agar Cetrimide (Elaboración propia).

3.2.6.8.5. Chromagar Vibrio

En este medio también se evidenció la ausencia de cepas bacterianas reduciéndose la presencia de bacterias como las especies de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* no estaban presentes entre las colonias que fueron seleccionadas.

3.2.6.8.6. Chromagar bacillus

Las muestras sembradas en este medio se reporta crecimiento de colonias bacterianas características por la mezcla de cromogénica presente en el medio es escindida por la enzima B- glucosidasa que se encuentra en *B. cereus*, lo que da como resultado la formación de colonias azules *B. thuringiensis* también se evidenció ya que las colonias azules/ verde en este medio como *B. cereus* y *B. thuringiensis* son químicamente idénticas.

Figura 13

Crecimiento bacteriano en Chromagar bacillus



Nota. Esta imagen indicar presencia de crecimiento bacteriano de *bacillus Sp.* (Elaboración propia).

3.2.6.8.7. Siembra de las bacterias en agar TSB

Para la siembra de estas cepas bacterianas en donde hubo crecimiento se utilizó Agar TSB (Trypticasa Soja Broth), y se realizó el aislamiento con el asa de platino previamente flameada se tomó una parte de las colonias de bacteria seleccionada y se sembró en tubos de ensayo previamente esterilizados que contenía 30 ml del medio líquido TSB, se incubó a 32 °C por 24 horas.

3.2.6.9. Mantenimiento de cepas seleccionadas (crio preservación)

Debido a la significativa reducción en la actividad metabólica de las células a temperaturas muy bajas, la congelación emerge como una técnica preferida para períodos cortos o prolongados (Raymond et al., 2014). Esta técnica implica cultivar hasta alcanzar la fase estacionaria, dado que generalmente, en esta etapa, las células son más resistentes a los posibles daños causados por el proceso de congelación y descongelación en comparación con las células en fase exponencial (Zhang et al., 2016).

Se recomienda emplear una alta densidad celular durante la congelación ya que, en caso de lisis de algunas células, se liberan compuestos crioprotectores que mejorarían la supervivencia celular (Bischof et al. (2005).

Las células destinadas a la congelación pueden ser suspendidas directamente en un agente crioprotector o este último puede añadirse al medio de cultivo como aditivo, siendo el glicerol al 20% el crioprotector más comúnmente utilizado. Respecto a la temperatura de almacenamiento, se sugiere una temperatura mínima de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que temperaturas más elevadas podrían dar lugar a recristalizaciones, siendo estas letales para las células si ocurren intracelularmente (Hubel et al., 2014).

Para mantener las cepas bacterianas en periodos prolongados se procedió a realizar mediante caldo glycerol preparando primeramente el caldo TSB con glycerol al 20% y ajustado a la salinidad del agua de mar al 2% con cloruro de sodio, se distribuyó en microtubos llenándose lo 2/3 de su capacidad, luego se esterilizaron en autoclave a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Finalmente se hizo una suspensión bacteriana directamente en caldo glycerol.

3.2.6.10. Activación de aislados bacterianos.

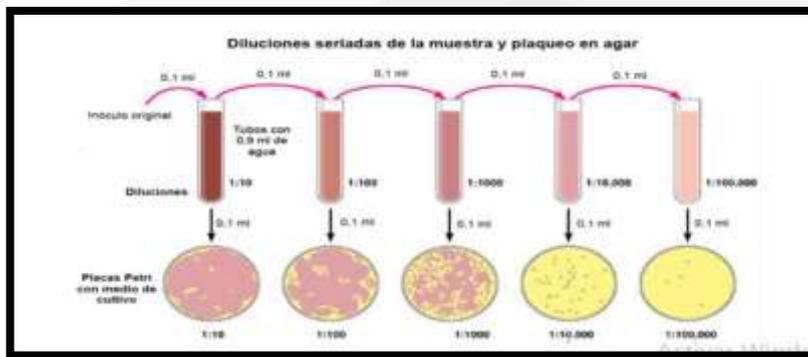
Después de ser congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, los aislados fueron reactivados en placas de TSA (2% NaCl) y se incubaron durante 24 horas a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se transfirió todas las colonias de cada placa a tubos de vidrio conteniendo caldo TSB (Soya Trypticaseína) (2% NaCl), y se cultivaron durante 24 horas a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una incubadora modelo B 110F230/115 Marca Breed ELDS.

3.2.6.11. Crecimiento bacteriano

La medición del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante el método convencional de cultivo en placas de Petri, este procedimiento implica la siembra de la bacteria de prueba en un medio de cultivo sólido, específicamente se empleó Agar Trypticase Soja (TSA), cuya concentración de sales se ajustó al 2% para igualar la salinidad del medio del cual se obtuvieron las bacterias. Se realizó diluciones seriadas en base 10 con solución salina estéril (SSE). Las muestras que se sembraron fueron solo las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y se incubaron a una temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, tras lo cual se efectuó un recuento de las colonias en las placas de Petri que mostraron crecimiento (Ramirez et al., 2017).

Figura 14

Técnica de recuento microbiano con diluciones seriadas en base 10.



Nota. Esta imagen indica la técnica de recuento microbiano con diluciones seriadas en base 10 (Ramirez et al., 2017).

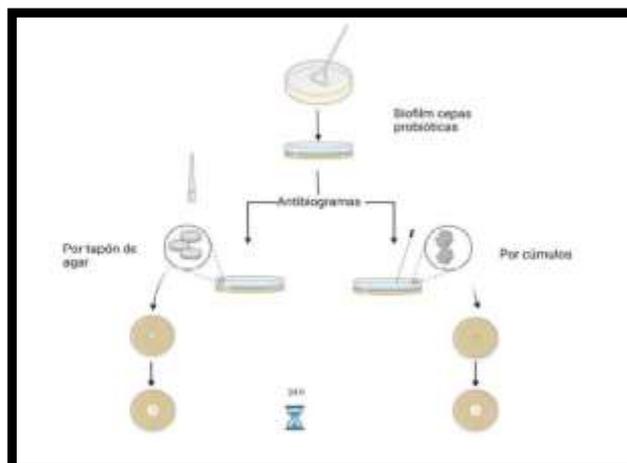
3.3.3. Evaluación de la potencialidad de cepas probióticas identificadas mediante metagenómica capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la técnica de Kirby bauer

3.3.3.1. Pruebas de inhibición *in vitro*.

Con el fin de determinar el efecto probiótico de las cepas aisladas como son: CN5 y RS3 ambos aislados se los sometió a pruebas de desafío por separado y una mezcla de ambas, se emplearon tres técnicas *in vitro*, (a) Técnica de difusión con bacterias vivas, (b) difusión en agar, y © método de estría cruzada. Para todos los casos de pruebas de desafío se utilizó la cepa viva de *V. parahaemolyticus* como agente patógeno y una colonia invasiva (CINV) que se identificó a nivel de metagenómica.

Figura 15

Prueba de antagonismo, técnica de Kirby Bauer.



Nota. Pruebas de antagonismo por difusión de tapón de agar y por cúmulos. Creado en BioRender.com (2023).

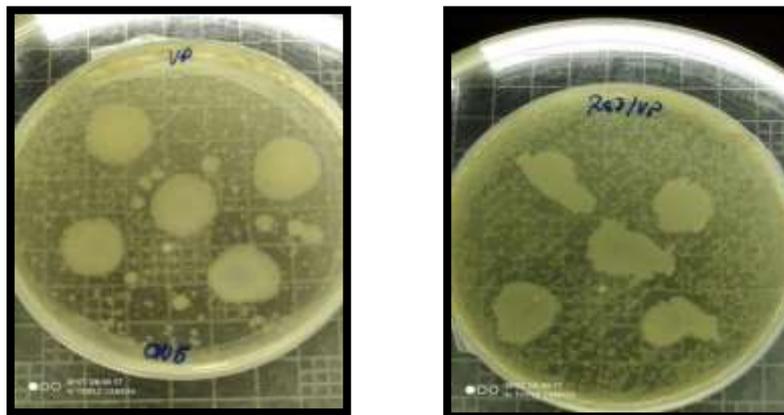
3.3.3.2. Técnica de difusión con bacterias vivas o Inhibición simultánea.

La preparación consistió en sembrar 100 ul de las bacterias patógenas crecidas en 30 ml de agar TSB al 2% con cloruro de sodio (NaCl), por 24 hrs luego se ajustó la concentración mediante un patrón de turbidez aproximadamente a 0,5 de la escala de Mac Farland del *V. parahaemolyticus* a una concentración de 1.7×10^6 ufc/ml.

Seguidamente con la ayuda de una micropipeta estéril se transfirió 100 ul en placa con agar TSA, distribuyendo la muestra por toda la superficie del agar con una varilla de vidrio estéril o con un hisopo de algodón esterilizado, esto con el fin de obtener un crecimiento uniforme a manera de césped de desarrollo bacteriano. Se dejó secar de 10 a 20 min en la cámara de flujo laminar. Finalmente, de manera masiva con la ayuda de una micropipeta se colocaron de manera radial gotas con 30 ul (microlitros) de las cepas antagonicas. Se dejó incubar durante 24 horas a 32°C. Las muestras se trabajaron por triplicado (Sierra Obrero 2023)

Figura 16

Técnica de difusión con bacterias vivas (cúmulos)



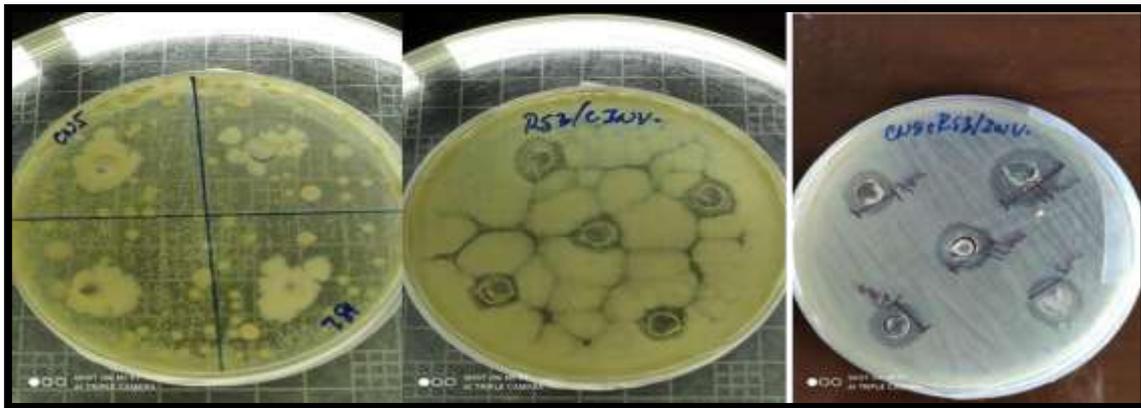
Nota. Estas imágenes indican las pruebas de exclusión competitiva contra *Vibrio Parahaemolyticus* de dos consorcios bacterianos CN5 y RS3 (Elaboración propia).

3.3.3.3. Técnica de difusión en agar.

Se sembró *V. parahaemolyticus* en medio TSA a una dosis de 1.7×10^6 ufc/ml, posteriormente a cada una de las placas se le hicieron 5 pocillos de 6mm de diámetro por 1cm de alto, sin que estos tocaran por completo el fondo de la placa, pero igualmente se les selló el fondo con agar agar aproximadamente 10 ul en los cuales se vertieron 30 ul de las bacterias antagonicas. Finalmente, las placas se incubaron a 32°C por 24 horas (Reinoso, 2015). Las muestras se trabajaron por triplicado.

Figura 17

Técnica de difusión en agar



Nota. Esta imagen representa pruebas de exclusión competitiva de los consorcios bacterianos contra *Vibrio p* y *C.INV* (Elaboración propia).

3.3.3.4. Método de estría cruzada.

Se realizó a partir de un cultivo líquido de TSB de 24 hrs en tubos de ensayo con (2% NaCl) donde anteriormente se sembró posibles colonias probióticas (CN5; RS3) se tomó una muestra con un hisopo estéril y se sembró una estría central o en forma de T con la cepa a evaluar y se incubó por 24 h a 32°C. Del mismo modo se preparó una suspensión con la cepa patógena (*V. parahaemolyticus*) y se sembraron por separado en un ángulo de 90° atravesando la zona de las bacterias candidatas cuando la estría presentaba un buen crecimiento (3 a 5 mm de ancho). Posteriormente se observó la presencia o ausencia de zona de inhibición a las 24-48 h de incubación y se realizaron mediciones. (Cázares et al., (2019).

Figura 18

Método de estría cruzada



Nota. Mezcla de ambos consorcios bacterianos contra *C. INV* y contra *Vibrio P* (Elaboración propia).

3.3.4. Caracterización por metagenómica de las cepas bacterianas aisladas en caldo TSB

Las cepas bacterianas cultivadas en medio líquido fueron remitidas a la empresa BIOSECUENS S.A.S. ubicada en la ciudad de Quito para la respectiva secuenciación de la región 16S rRNA con el fin de identificar la especie correspondiente.

3.3.4.1. Extracción de ADN de las cepas con potencial antagónico en caldo TSB por medio de biología molecular.

3.3.4.1.1. Genes analizados

Región V3 - V4, 16S.

341F: CCTACGGGNGGCWGCAG

805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC

Se utilizó un kit comercial ZymoBIOMICS DNA Kits a base de columnas diseñado para muestras de suelo, heces, agua, biofilms y células bacterianas/fúngicas. El objetivo del proceso de extracción es obtener el ADN total presente en la muestra, lo que comprende material genético de bacterias (incluyendo endoesporas), hongos, protozoos, algas, virus, mitocondrias, y también del hospedero. Durante el procesamiento, se busca excluir el ADN del huésped, sin embargo, el nivel de contaminación final por este elemento será dependiente de la proveniencia de las muestras. Se utiliza el protocolo otorgado por Illumina para la preparación de librerías en la secuenciación metagenómica 16S

3.3.4.1.2. Ampliación PCR.

Se amplificó las regiones de interés utilizando el ADN genómico extraído de cada muestra. Se utilizaron primers específicos acorde a las necesidades establecidas en la hoja de registro de muestras BSRT-2402-0001-UNEMI_AREYES. Con este paso identificamos la presencia o ausencia de los microorganismos de nuestro interés. De igual forma, se realiza el primer lavado usando perlas magnéticas para purificar el amplicón 16S, región V3-V4 de primers libres y especies de dímeros de primers.

3.3.4.1.3. Index PCR

Este proceso se conoce como la preparación de librerías y consiste en la adición de índices en cada extremo de los amplicones anteriormente obtenidos. Los índices son secuencias únicas que se asignan a todos los amplicones de una misma muestra para poder distinguirlos de los amplicones de otras muestras, lo que permite secuenciar múltiples muestras en paralelo y obtener datos independientes para cada una. Se realiza el segundo lavado usando perlas magnéticas para limpiar la biblioteca final. Finalmente, las librerías purificadas son cuantificadas y cualificadas para determinar su idoneidad para ser secuenciadas.

3.3.4.1.4. Análisis de diversidad.

Los archivos FastQ, son sometidos a un proceso de calidad y filtrado para garantizar la clasificación taxonómica, Para la clasificación taxonómica se utiliza una implementación de un algoritmo de alto rendimiento del clasificador Ribosomal Database Project (RDP) descrito en Wang Q. et al et al (<http://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.00062-07>). La base de datos utilizada es RefSeq RDP 16S v3, basada en un conjunto de archivos FASTA de: <https://benjjneb.github.io/dada2/training.html>. Secuencias del gen 16S rRNA con formato DADA2 para bacterias y arqueas (Versión 2).

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

4. Procesamiento estadístico de la información

4.1. Identificación de cepas nativas de agua de mar captada en reservorios mediante cultivos *in vitro* para la selección de probióticos entre las bacterias cultivables.

De las muestras de agua de mar tomadas durante 4 meses se procedió a sembrar en medios selectivos como TSA y Chromagar *bacillus* para así determinar las ufc/ml que entra el agua al sistema de producción de larvas de camarón y que ha sido sometida a tratamientos químicos encontrándose valores entre 10^{-1} y 10^{-2} ufc/ml de bacterias heterótrofas totales y *bacillus spp.*

Figura 19

Crecimiento bacteriano en Chromagar Bacillus y en TSA.



Nota. Resultado del Crecimiento bacteriano en Chromagar Bacillus y TSA (Elaboración propia).

Según Mendoza et al., (2016), las bacterias a lo largo de su evolución han desarrollado diversos mecanismos para enfrentar las dificultades que les presenta su entorno. Si bien algunas de estas adaptaciones pueden afectar su crecimiento en condiciones específicas, les permiten, en última instancia, sobrevivir y prosperar en un ambiente en constante cambio.

Shubha et al. (2005) indican que la variabilidad de las cargas bacterianas entre zonas de muestreo, tanto en aguas de sistemas productivos como en sedimentos, están mayormente encontradas en sus tracto digestivo, teniendo relación con el medio donde se desarrollan.

La comprensión de este fenómeno es fundamental para entender cómo las bacterias se adaptan y logran persistir en una amplia variedad de hábitats, incluso aquellos considerados hostiles o estresantes.

4.3. Caracterización de cepas probióticas de agua de mar mediante metagenómica.

4.3.1. Análisis metagenómico de cepas aisladas

La tabla 12 representa datos estadísticos expresados en porcentajes de lecturas que fueron identificadas y clasificadas a nivel taxonómico de muestra 231212 AR-001-16S (RS3), donde el 99.08 % de géneros no ha sido reconocido, siendo solo el 8.76 % clasificado a nivel de especie es decir de 13.945 pares de bases de lecturas clasificadas a nivel taxonómico.

Tabla 12

Estadística de clasificación a nivel taxonómico

Nivel taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico.	% Total de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Reino	157,897	99,20
Filo	157,882	99,19
Clase	157,876	99,19
Orden	157,864	99,18
Familia	157,752	99,11
Género	157,702	99,08
Especie	13,945	8,76

Nota. La tabla representa el número y el porcentaje del total de lecturas clasificadas a nivel taxonómico, en donde solo a nivel de especie no se pudo identificar un 99,08% de la muestra.

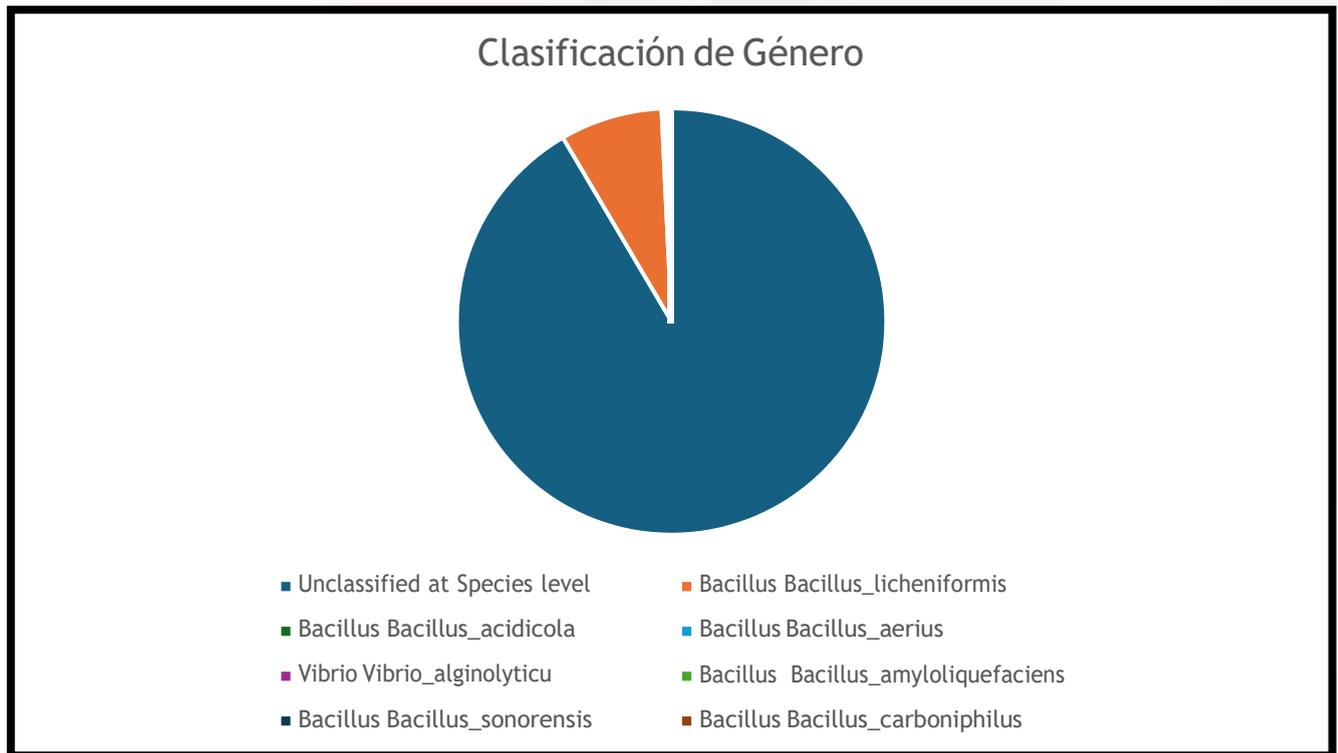
Elaboración propia).

El alto porcentaje de lecturas no reconocidas en la muestra puede deberse a varias razones. Wooley et al. (2010), señalan que las limitaciones de la base de datos de referencia utilizada para la clasificación taxonómica pueden ser una de las causas. Esta base de datos puede no contener información sobre todas las especies y géneros de bacterias presentes en el ambiente, lo que dificulta la identificación de las lecturas.

Según Pereira et al. (2018), en su estudio del sedimento de manglares mediante metagenómica, un 35% de las lecturas no se pudo identificar a nivel de phylum. Esto sugiere que algunas bacterias presentes en la muestra podrían no estar descritas previamente y, por lo tanto, no estar presentes en la base de datos de referencia utilizada. En nuestro estudio, si bien la mayoría de las lecturas no se identificaron a nivel de género (99.08%), la clasificación a nivel de phylum (24.38%) puede proporcionar información útil sobre la composición general de la microbiota. Esto se debe a que el porcentaje de lecturas clasificadas aumenta a medida que se asciende en el nivel taxonómico, siendo el phylum el nivel con mayor porcentaje de lecturas clasificadas.

Se identificaron 113 categorías taxonómicas totales a nivel de género, en la figura 20 se muestra los 8 principales resultados tales como un 87,64% pertenece a *Bacillus_licheniformes*, con 1.77% *Bacillus_aerius*, 1,66% *Vibrio_alginolyticus*, 1,34% *Bacillus_amyloliquefaciens*, 0,90% *Bacillus_sonorensis*, 0,75% *Bacillus_carboniphilus*, 0,66% *Vibrio_xuii*, 0,62% *Vibrio_jasicida*, 0,49% *Bacillus_vienamensis*, 0,15% *Bacillus_crescens* 0,22% *Bacillus_mojavensis* y 1.04% pertenece a otras especies.

Figura 20



Nota. El total de categorías taxonómicas a nivel de género identificadas son 113. Esta gráfica muestra las 8 principales de 113 clasificaciones, la categoría otros en este gráfico circular es la suma de todas las clasificaciones con menos del 1,08% de abundancia (Elaboración propia).

Logares et al., (2014), Plancton marino de estaciones marinas de la expedición Tara Oceans, se encontraron perfiles taxonómicos y estructura de comunidades procariotas mediante secuenciación masiva dirigida de 16S rRNA.

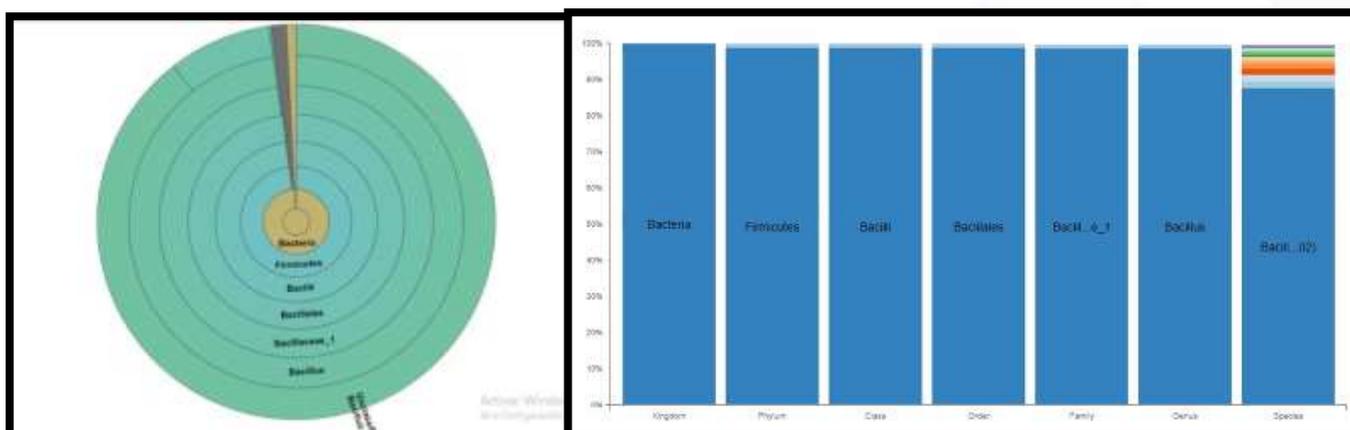
Según Cortés et al., (2020), la metagenómica utiliza técnicas para analizar la diversidad de los genomas microbianos, el gen 16S rRNA es el marcador más utilizado para clasificar bacterias y arqueas, pero no siempre permite una clasificación precisa a nivel de especie.

En la figura 21 se presentan en un gráfico circular las especies pertenecientes al reino: bacteria, división: firmicutes, clase: bacilli, orden: bacillales, familia: bacillaceae y género: bacillus en donde los resultados arrojan que un 87,64% pertenece a Bacillus_licheniformes, con 1.77% bacillus_aerius, 1,66% Vibrio_alginolyticus, 1,34% Bacillus_amyloliquefaciens, 0,90% Bacillus_sonorensis, 0,75% Bacillus_carboniphilus, 0,66% Vibrio_xuui, 0,62% Vibrio_jasicida, 0,49% Bacillus_vienamensis, 0,15% Bacillus_crescens 0,22% Bacillus_mojavensis y 1.04% pertenece a otras especies.

Estos resultados estadísticos corroboran la presencia de cepas probióticas presentes en la muestra.

Figura 21

Especies encontrados en la secuenciación de la muestra 1



Nota. Los gráficos representan el porcentaje de especies identificadas (Elaboración propia).

4.3.2. Análisis metagenómico de cepas aisladas muestra N° 2

La tabla 13 representa datos estadísticos expresados en porcentajes de lecturas que fueron identificadas y clasificadas a nivel taxonómico de muestra 231212 AR-002-16S (CINV), donde el 99.34 % de géneros no ha sido reconocido, siendo solo el 8.76 % clasificado a nivel de especie, es decir 45.140 pares de bases de lecturas clasificadas a nivel taxonómico

Tabla 13

Estadística de clasificación a nivel taxonómico

Nivel taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico.	% Total de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Reino	164,127	99,50
Filo	164,119	99,49
Clase	164,116	99,49
Orden	164,077	99,47

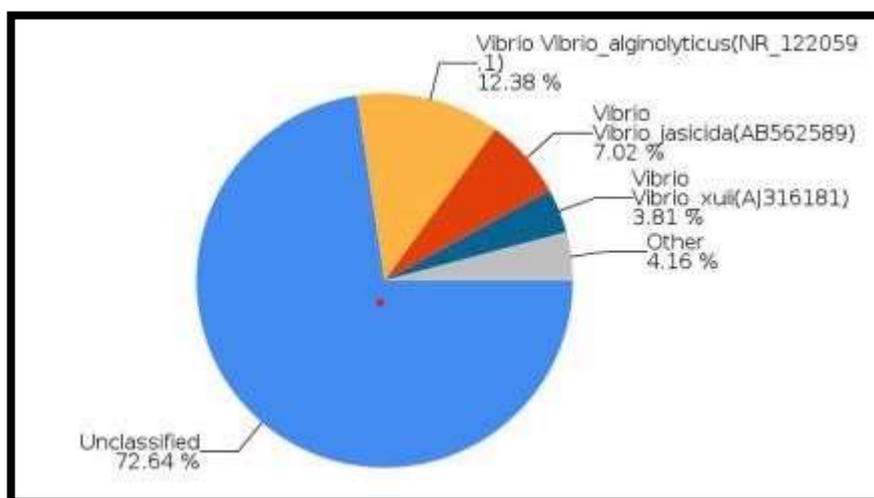
Familia	164,072	99,46
Género	163,865	99,34
Especie	45,140	27,36

Nota. La tabla representa el número y el porcentaje del total de lecturas clasificadas a nivel taxonómico, en donde solo a nivel de especie no se pudo identificar un 99,34% de la muestra (Elaboración propia).

Se identificaron 85 categorías taxonómicas totales a nivel de género, en la figura 22 se muestra los 5 principales resultados, en donde el género Vibrios se encuentra con un 23,21 % en la muestra, con un 72,64% restante se encuentran bacterias de género inespecíficos, otras con un 4,16%.

Figura 22

Resultados de las principales categorías taxonómicas a nivel de género identificadas



Nota. El total de categorías taxonómicas a nivel de género identificadas son 113. Esta gráfica muestra las 5 principales de 85 clasificaciones, la categoría otros en este gráfico circular es la suma de todas las clasificaciones con menos del 4,16% de abundancia. (Elaboración propia).

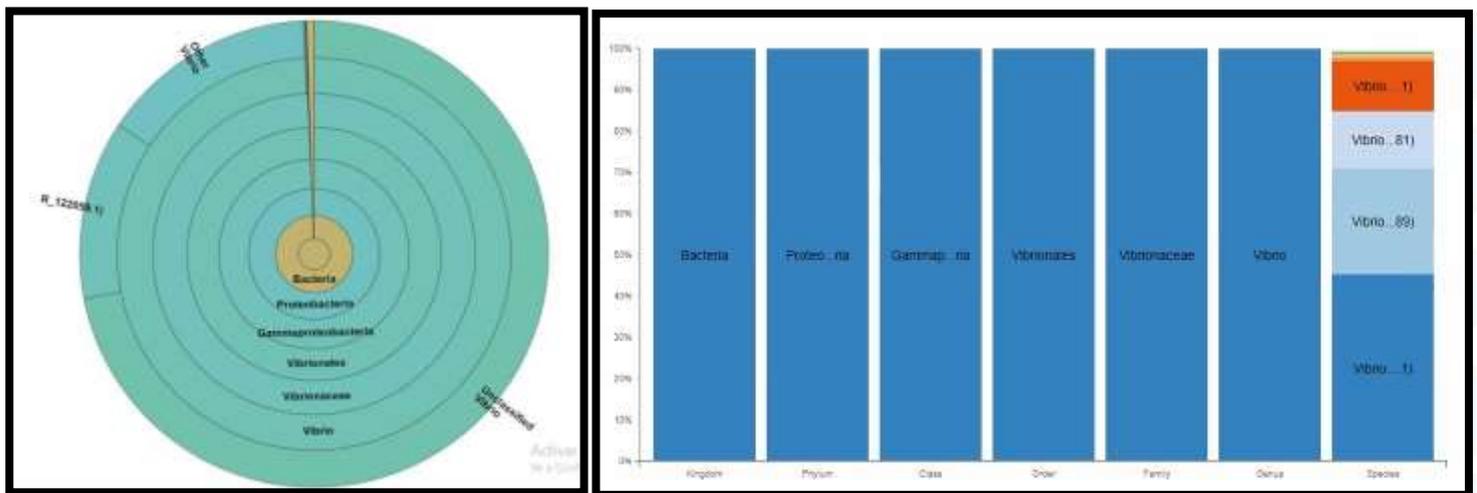
En la figura 23 se presentan en un gráfico circular las especies pertenecientes al reino: bacteria, división: proteobacteria, clase: Gammaproteobacteria, orden: vibrionales, familia: vibronaceae y género: *vibrio* en donde los resultados arrojan que un 45,25% pertenece a *Vibrio_alginolyticus*, con 25,64% *Vibrio_jasicida*, 13,91% *Vibrio_xuui*, 12,12%

Vibrio_alginolyticus, 0,78% *Vibrio_agarivorans*, con 0,43% pertenece a otras especies, 0,42% *Vibrio_paraahaemolyticus*, 0,15% *Vibrio_alfacsensis*. Estos resultados estadísticos corroboran la presencia de varias especies de *Vibrios* dentro del consorcio C. INV.

Un dato relevante en el estudio de Rungrassamee et al., 2014 utilizando NGS muestra que los grupos dominantes en camarón se clasificaron en seis géneros de Proteobacteria (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium* common y *Undibacterium*), dos géneros de Firmicutes (*Fusibacter* y *Lactobacillus*) y un género de Bacteroidetes (*Cloacibacterium*).

Figura 23

Especies encontrados en la secuenciación de la muestra 2

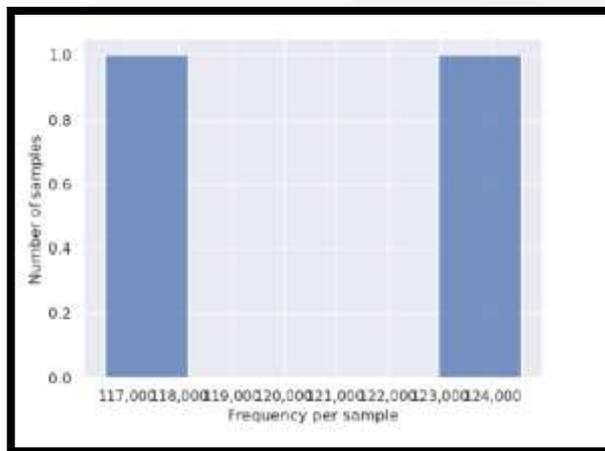


Nota. Los gráficos representan el porcentaje de especies identificadas (Elaboración propia).

4.3.3. Comparación de filtrados por muestras

Figura 24

Comparación de filtrados de las muestras



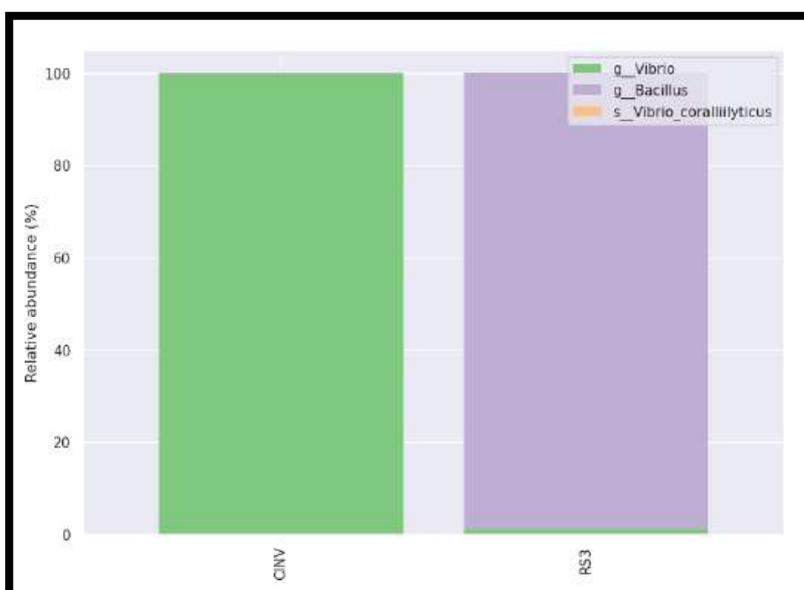
Nota. Gráfico de un análisis no muy profundo para las 2 muestras, se encuentra el número de lecturas que se han encontrado, lecturas menores fueron filtradas ya que no tenían utilidad (Elaboración propia).

Según Montoya et al., 2020 se remueve secuencias que no correspondan a la realidad biológica del sistema para verificar la distribución de tamaños de las secuencias generadas, así como su frecuencia para realizar la validación gráficamente y poder relacionar con una base de datos previamente construida para realizar asignaciones taxonómicas.

4.3.4. Composición de la comunidad bacteriana

Figura 25

Composición bacteriana de las muestras 1 y 2.

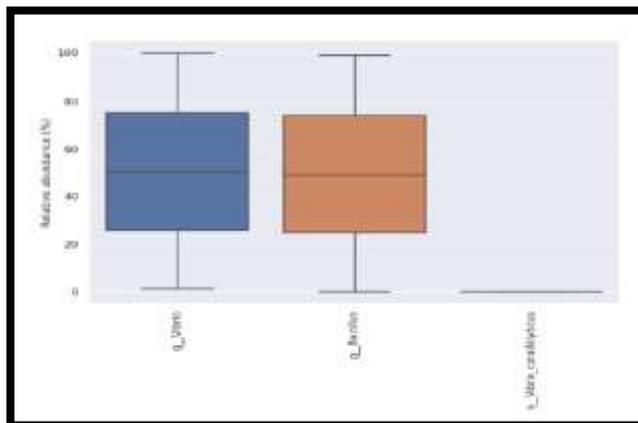


Nota. Diagrama de caja de distribución de la abundancia relativa de taxones individuales donde se muestra que en CINV la mayoría fueron vibrios y en la RS3 fueron Bacillus en función a la abundancia relativa acercándose ambas muestras al 90% a nivel de género, encontrándose también presencia de *Vibrio corallilyticus* en menor abundancia relativa (Elaboración propia).

4.3.5. Diagrama de bigotes

Figura 26

Abundancia entre bacterias

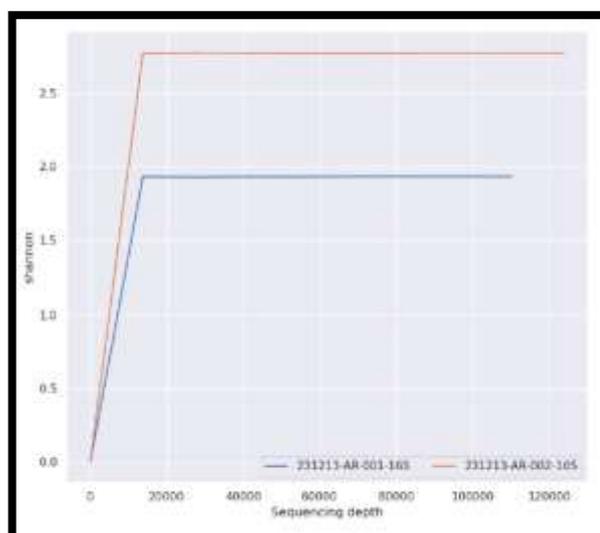


Nota. Permite visualizar la abundancia que hay entre las 2 muestras. La primera tiene un 100% con una abundancia bastante grande, mientras que la segunda el *Vibrio* se encuentra en un 0% (Elaboración propia).

4.3.6. Curvas de Rarefacción

Figura 27

Curva de rarefacción de las bacterias encontradas



Nota. Permite determinar el número de lecturas al cual ya no genera cambios de identificación de bacterias. Observando la curva, se puede analizar cómo esta se aplana a medida que se acumulan más lecturas. Si la curva tiende a estabilizarse, esto sugiere que la mayoría de las especies (o características) presentes en la muestra han sido detectadas. Si la curva no se aplana y sigue subiendo, indica que aún hay más diversidad por descubrir con una mayor profundidad de secuenciación (Elaboración propia).

Para ambas muestras analizadas se debió realizar una secuenciación repetitiva de cada una de las mismas es decir tomar como mínimo tres réplicas de cada una para poder determinar el número de reproducciones ya que pudo haberse formado un sesgo que tuvo influencia al momento de la secuenciación.

Esta investigación es de tipo cualitativa ya que los diferentes consorcios bacterianos no estaban totalmente aislados o no podían aislarse puesto que ciertos grupos bacterianos trabajan en asociación.

La metagenómica identifica a nivel de grupos de bacterias analizando un listado de microorganismos que están presentes en las muestras biológicas y asociarlos al estudio realizado detectando un 98% de microorganismos a nivel de genero para los grupos bacterianos en el caso de ambas muestras que no pudieron ser clasificados no se encontraban en la base de datos y se tuvo que trabajar con otra plataforma. Hay que tomar en cuenta también que a nivel de microbiología solo el 5% de microorganismos pueden ser cultivables.

Una de las ventajas de aplicar metagenómica es que la secuenciación de nueva generación se utiliza el amplicon 16S de RNAr que son genes conservados en el tiempo o han mutado muy poco, la región hipervariable clasifica las bacterias que se van encontrando. Así las regiones V3 – V4 a nivel mundial se las ha considerado que son las mejores regiones para la identificación bacteriana.

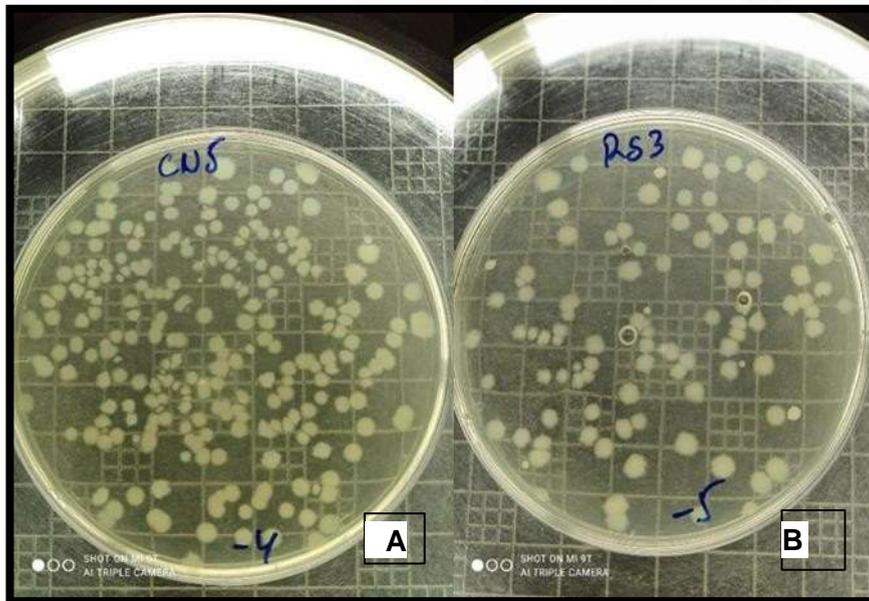
4.3.7. Evaluación de la potencialidad de cepas probióticas identificadas mediante metagenómica capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la técnica de Kirby bauer.

4.3.7.1. Agar TSA

Las cepas que se encontraron en este medio, por morfología se presentaron como redondas, cremosas, de tamaño medianas y pequeñas;

Figura 28

Resultado de crecimiento bacteriano en agar TSA



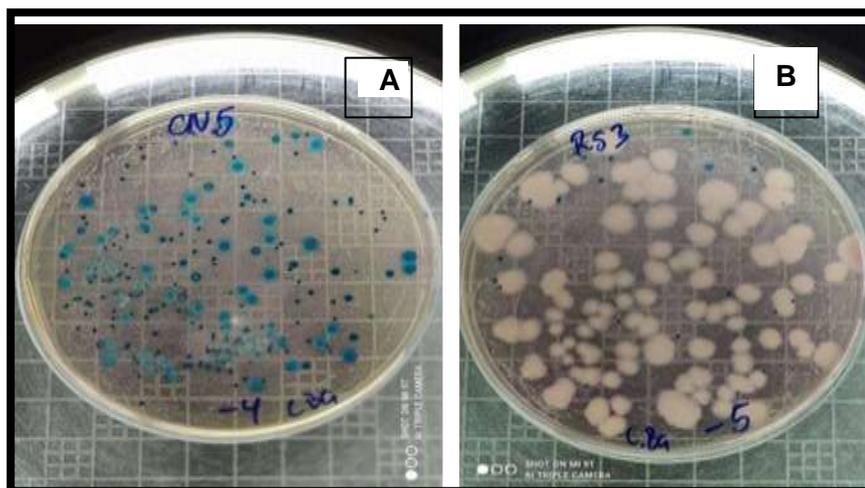
Nota. De este muestreo durante los meses detallados de hizo 2 tubos madres, de las bacterias seleccionadas denominándose como: A. CN5 y B. RS3 como potenciales probióticos (*Elaboración propia*).

Chromagar bacillus

Se observó crecimiento de bacterias azules grandes y medianas.

Figura 29

Resultado de crecimiento bacteriano en agar



Nota. Resultado de crecimiento bacteriano de los consorcios CN5 y RS3 (**Elaboración propia**).

4.3.7.2. Agar MRS

Hubo crecimiento a las 48 horas donde se observó colonias de aspecto cremosas pequeñas y colonias grandes.

Figura 30

Resultado de crecimiento bacteriano en agar



Nota. Resultado de crecimiento bacteriano de los consorcios CN5 (**Elaboración propia**).

4.3.7.3. Agar TCBS

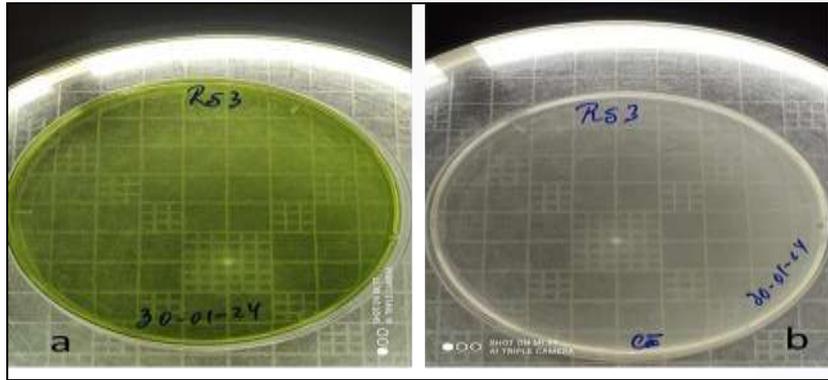
No hubo crecimiento en este medio de cultivo, por lo tanto, se toma como resultado que no hubo bacterias tipos *Vibrios*.

4.3.7.4. Agar Cetrimide

No hubo crecimiento en este medio de cultivo, por lo tanto, se toma como resultado que no hubo bacterias tipo pseudomonas.

Figura 31

Ausencia de crecimiento bacteriano en agar Cetrimide



Nota. Resultado no hubo crecimiento bacteriano en a) TCBS y b) Cetrimide (Elaboración propia).

4.3.7.5. Chromagar Vibrio.

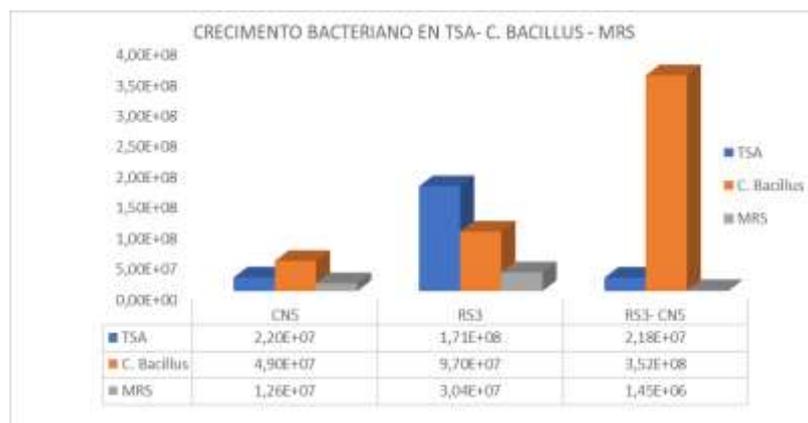
No hubo crecimiento en este medio de cultivo corroborando que no hubo crecimiento de tipo *Vibrio* en TCBS.

4.3.8. Cuantificación del crecimiento bacteriano de los consorcios CN5, RS3 y mezcla de ambos cultivados en medio líquido TSB.

Se realizaron diluciones seriadas en base 10 seleccionando las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y 10^{-6} de cada uno de los consorcios bacterianos y se los procedió a sembrar en agar TSA, chromagar bacillus y MRS para posterior conteo a las 24 hrs.

Figura 32

Resultado crecimiento bacteriano en TSA-C. BACILLUS-MRS



Nota. Cuantificación del crecimiento bacteriano de todos los consorcios (Elaboración propia).

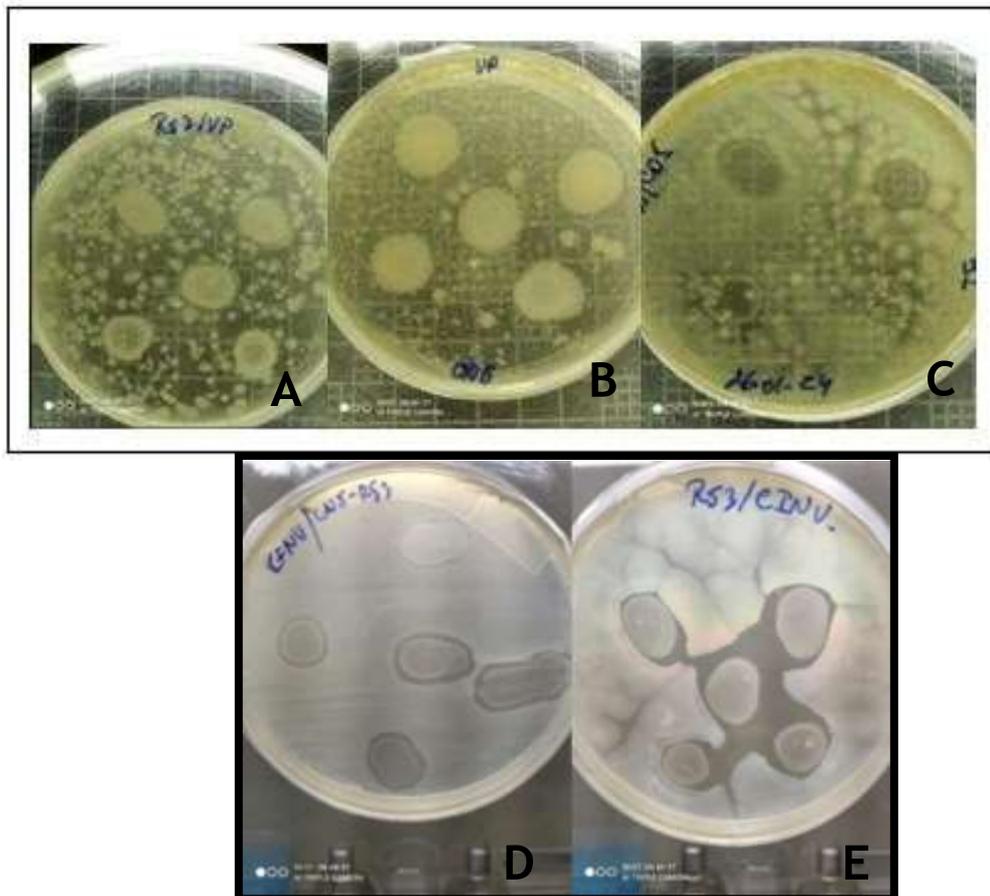
4.3.9. Evaluación de la actividad antagónica *in vitro*

4.3.9.1. Técnica de difusión con bacterias vivas o Inhibición simultánea.

Todas las cepas aisladas presentaron algún grado de capacidad competitiva, en la prueba de antagonismo *in vitro* sobre una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* y colonia invasiva (CINV). La combinación de aislados de cepas CN5 y RS3 mostraron una capacidad de inhibición significativamente superior pues se observó una formación de halo de crecimiento mayor en la superficie del agar, mientras que las cepas por separado presentaron halos de inhibición menores. Para la prueba de inhibición simultánea se observó que el 100% de los casos ambas cepas crecieron, sugiriendo así un efecto sinérgico entre ellas.

Figura 33

Técnica de inhibición simultánea



Nota. Prueba de exclusión competitiva. A. consorcio RS3 vs *Vibrio* sp. B. consorcio CN5 con *Vibrio* sp. C. consorcio CN5 vs CINV. D. mezcla de ambos consorcios contra CINV. E. consorcio RS3 vs CINV. (Elaboración propia).

Las cepas aisladas deben poseer efectos probados contra patógenos y las pruebas de antagonismo in vitro son una manera preliminar de conocer estos efectos (Balcazar et al., 2006).

González et al. (2021), explora la aplicación de la técnica de inhibición simultánea para la detección de bacterias resistentes a los antibióticos, se discuten las ventajas de la técnica para la detección rápida y precisa de bacterias resistentes, la técnica podría ser utilizada para la detección rápida de bacterias resistentes en diferentes entornos, como hospitales, clínicas y laboratorios de investigación.

4.3.10. Interpretación de los resultados

Todos los análisis fueron realizados en el programa Minitab 19.0. Se analizó la normalidad de los datos a través de un test de Anderson - Darling, luego se realizó un test de Levene (homocedasticidad). Después, se trabajó con Anova de una vía y test a posteriori de Tukey con valor de significancia del 95 % de confiabilidad ($p < 0.05$)

Figura 34

Prueba Anderson-Darling

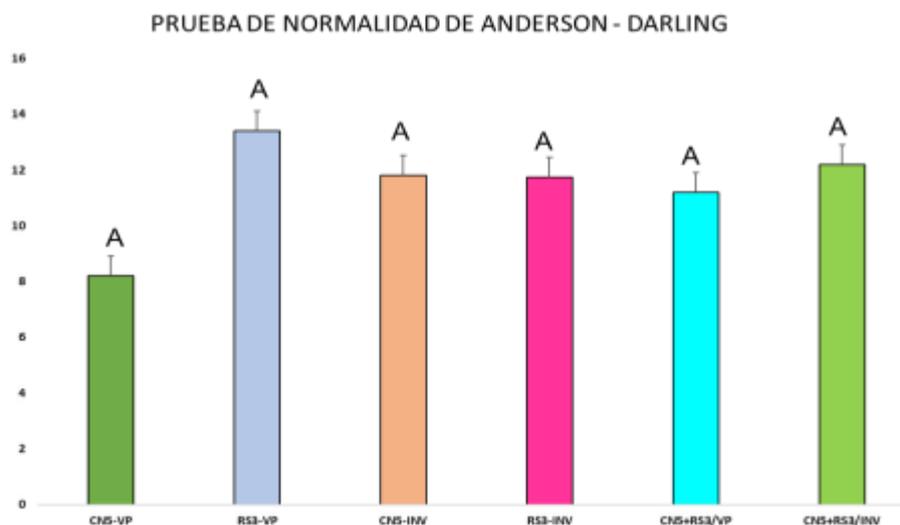


Figura 1. Promedio de tratamientos de consorcios bacterianos contra *V.parahaemolyticus* y CINV. Las barras representan Media \pm Ds. Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los tratamientos según Anova de 1 vía - test posterior de Tukey ($p > 0.05$)

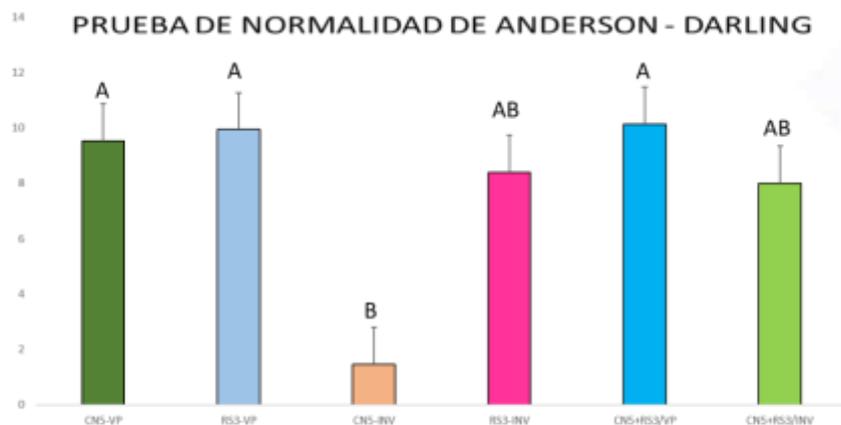
Nota. Tratamiento de consorcios bacterianos contra *Vp* y *CINV* (Elaboración propia).

4.3.10.1. Técnica de difusión en agar.

Para el ensayo de difusión en agar las bacterias antagonistas crecieron lo que podría indicar la existencia de un efecto sinérgico de los consorcios bacterianos hacia las bacterias de *V. Parahaemolyticus* y *C. INV*

Figura 35

Técnica de difusión en agar.



Promedio de tratamientos de consorcios bacterianos contra *V.parahaemolyticus* y *CINV*. Las barras representan Media \pm Ds. Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los tratamientos según Anova de 1 vía - test posterior de Tukey ($p > 0.05$), pero consorcio CNS - INV es diferente con un porcentaje de inhibición bajo.

Nota. Tratamiento de consorcios bacterianos contra *Vp* y *CINV* (Elaboración propia).

Figura 36

Técnica de difusión en agar.



Nota: Resultado de la Técnica de difusión en agar (Elaboración propia).

Generalmente las metodologías más empleadas para evaluar la inhibición de bacterias in vitro son la difusión en agar con bacterias vivas y la difusión en agar con pocillos resultando la más efectiva esta última por ser una técnica sencilla y menos susceptible a contaminaciones (Viachos et al., 1999; Rojas et al., 2006., Mayrhofer et al 2008).

El artículo de Rojas et al. (2006) presenta la difusión en agar como una técnica simple, versátil y visualmente fácil de interpretar para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana. Sin embargo, también reconoce sus limitaciones en cuanto a estandarización, influencia de factores externos y aplicabilidad con ciertos antimicrobianos. El autor considera que la elección del método más adecuado depende de diversos factores, como el tipo de bacteria, el antimicrobiano a evaluar y los objetivos del estudio.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se logro aislar un conjunto de cepas bacterianas de agua de mar mediante cultivos in vitro con características probióticas potenciales.

El análisis metagenómico reveló la diversidad genética de bacterias probióticas y sus posibles interacciones con otros microorganismos, incluyendo *Vibrio* sp y proporciono información detallada de la clasificación taxonómica, encontrando 113 categorías a nivel de género en RS3 y 85 categorías en CINV.

Las categorías taxonómicas a nivel de especie de la muestra RS3, destacan 87,64% perteneciente a *Bacillus_licheniformes*, con 1.77% *Bacillus_aerius*, 1,66% *Vibrio_alginolyticus*, 1,34% *Bacillus_amyloliquefaciens*, 0,90% *Bacillus_sonorensis*, 0,75% *Bacillus_carboniphilus*, 0,66% *Vibrio_xuui*, 0,62% *Vibrio_jasicida*, 0,49% *Bacillus_vienamensis*, 0,15% *Bacillus_crescens* 0,22% *Bacillus_mojavensis* y 1.04% pertenece a otras especies.

Las categorías taxonómicas a nivel de especie de la muestra CINV, destacan 45,25% pertenece a *Vibrio_alginolyticus*, con 25,64% *Vibrio_jasicida*, 13,91% *Vibrio_xuui*, 12,12%, *Vibrio_alginolyticus*, 0,78% *Vibrio_agarivorans*, con 0,43% pertenece a otras especies, 0,42% *Vibrio_paraahaemolyticus*, 0,15% *Vibrio_alfacsensis*.

Mediante cultivos in vitro se demostró que todas las mezclas de cepas probióticas nativas mostraron una alta potencialidad del 99% para inhibir el crecimiento de *Vibrio* sp y la bacteria denominada CINV. En los estudios realizados mediante ANOVA no se encontró significancia entre los consorcios ya que fueron valores superiores a 0,05. Los resultados sugieren que las cepas probióticas podrían ser utilizadas para prevenir o controlar infecciones por *Vibrio paraahaemolyticus*.

En resumen, las combinaciones de diferentes cepas probióticas poseen características que las convierten en agentes de biocontrol útiles tanto en laboratorios como en granjas de cultivo acuícolas.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda el uso de los probióticos como alternativa a los antibióticos, siendo necesario explorar opciones viables que fortalezcan las defensas naturales de los animales y disminuyan la dependencia excesiva a estos fármacos, ya que los probióticos estimulan el sistema inmune del animal, aumentando su capacidad para combatir enfermedades, protegen contra patógenos al competir por nutrientes o producir sustancias antimicrobianas y mejoran la salud intestinal del animal, lo que a su vez puede mejorar su salud en general.

Implementar tres réplicas en la secuenciación de ADN es una práctica fundamental para obtener resultados confiables, precisos y reproducibles, fortaleciendo la calidad y el impacto de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abasolo Pacheco, F. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha nácar (*Pteria sterna*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/469>
- Babic, A., Berkmen, M. B., Lee, C. A., & Grossman, A. D. (2011). Efficient Gene Transfer in Bacterial Cell Chains. *mBio*, 2(2), e00027-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00027-11>
- Barer, M. R., & Harwood, C. R. (1999). Bacterial Viability and Culturability. En R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 41, pp. 93-137). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60166-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60166-6)
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, 164(6), 620-639. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
- Bourne, D. G., Young, N., Webster, N., Payne, M., Salmon, M., Demel, S., & Hall, M. (2004). Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*, 242(1), 31-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.047>
- Chen, W.-Y., Ng, T. H., Wu, J.-H., Chen, J.-W., & Wang, H.-C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09923-6>
- Civera-Cerecedo, R., Alvarez-González, C. A., & Moyano-López, F. J. (2004). Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. *Avances en Nutrición Acuicola*. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/187>
- Cona T., E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*, 19, 77-81. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019200001>

- Cruz, M. A. Z., & Monzon, K. P. (2015). Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo sobre geotextil asociados a las raíces de manglares (canal de marea Puerto Rico, Tumbes, Perú) y aislamiento de cepas de diatomeas caracterizadas molecularmente. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 28(3), Article 3.
<http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/401>
- Escobar-Briones, L., Olvera-Novoa, M. A., & Puerto-Castillo, C. (2006). Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones. *Avances en Nutrición Acuicola*.
<https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/164>
- Gram, S., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Torben F., & Nielsen. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 969-973. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.969-973.1999>
- Grasso, D. (2006). Metagenómica: Un viaje a las estrellas. *Revista argentina de microbiología*, 38(4), 189-189.
- Guevara Castro, J. J., Martínez Novoa, L. A., & Ríos Castillo, Y. B. (2022). *Evaluación de buenas prácticas acuícolas de granjas camaroneras Bolívar y Cidaco, en el departamento de Chinandega, en el periodo de Julio-Diciembre del año 2022*. [Bachelor, Universidad de Ciencias Comerciales].
<http://repositorio.ucc.edu.ni/1126/>
- Guilemany, J. M., Cinca, N., Dosta, S., & Benedetti, A. V. (2009). Corrosion behaviour of thermal sprayed nitinol coatings. *Corrosion Science*, 51(1), 171-180.
<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.10.022>
- Gyles, C., & Boerlin, P. (2014). Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Veterinary Pathology*, 51(2), 328-340.
<https://doi.org/10.1177/0300985813511131>

- Kampelmacher, E. H., van Noorle Jansen, L. M., Mossel, D. A., & Groen, F. J. (1972). A survey of the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* on mussels and oysters and in estuarine waters in the Netherlands. *The Journal of Applied Bacteriology*, 35(3), 431-438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03719>.
- Kidane, D., Ayora, S., Sweasy, J. B., Graumann, P. L., & Alonso, J. C. (2012). The cell pole: The site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(6), 531-555. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.729562>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019a). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019b). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Lombal, A. C. (2021). *Acuariofilia. Peces ornamentales*. RUTH.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez Porchas, M., & Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(3), 181-196.
- Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albores, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: A potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1), 42-56. <https://doi.org/10.1111/raq.12102>
- McVey, J. P. (1993). *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture, Second Edition*. CRC Press.
- Méndez, M. (1981). Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. *Boletín Instituto del Mar del Perú*, 5(1), Article 1.

- Noss, R. F. (1990). Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology*, 4(4), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1990.tb00309.x>
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015a). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015b). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pérez-Chabela, M. de L., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., Pérez-Hernández, M. A., Pérez-Chabela, M. de L., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/perez>
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Ribera, I., Melic, A., & Torralba-Burrial, A. (2015). Introducción y guía visual de los artrópodos. *Revista IDE@-SEA*, 2, 1-30.
- Rivera Arreaga, A. J. (2021). *Análisis de la situación del sector camaronero ecuatoriano antes y durante la pandemia del COVID-19, período 2016-2020*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58622>
- Santur Rivera, S. (2022). Macrobentos en sustrato artificial en el estuario del Río Chira, distrito de Vichayal—Paita – Piura. *Universidad Nacional de Piura*. <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/20500.12676/3821>
- Schryver, P. D., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLOS Pathogens*, 10(4), e1003919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>

Suárez, J. E. (2013). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 38-41.

Suttle, C. A. (2007). Marine viruses—Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>

Aguilera Mero.pdf. (s. f.). Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52739/1/T-76761%20Aguilera%20Mero.pdf>

Tomalá Beltrán.pdf. (s. f.). Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/54691/1/T-76788%20Tomal%c3%a1%20Beltr%c3%a1n.pdf>

Tomalá Beltrán, C., & Rodríguez León, J. (2020). *Bacteria simbiótica marina Pseudovibrio denitrificans excluye vibrios patógenos y modifica la microbiota en camarón* [Thesis, ESPOL. FIMCM: Maestría en Ciencias de la Acuicultura Marina]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/54691>

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Varela Mejías, A., Peña, N., & Aranguren Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: Una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>

Varela, Z. S., Lavallo, L. P., & Alvarado, D. E. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.

Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., Olsen, R. E., Ringø, E., Bindelle, J., & Zhou, Z. (2019). Use of probiotics in aquaculture of China—A review of the past decade. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 734-755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.026> 73

Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>

Wooley JC, Godzik A, Friedberg I. Un imprimación en metagenómica. *PLoS Comput Biol*. 2010 Feb 26;6(2):e1000667. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000667. PMID: 20195499; PMCID: PMC2829047.

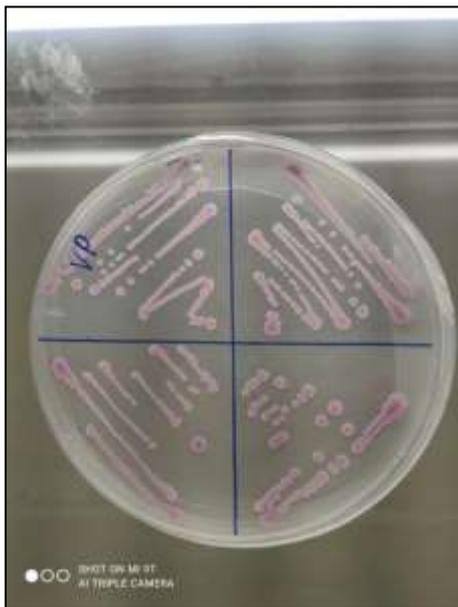
Pereira, F., Souza, R. C., & Jesus, E. C. (2018). Metagenomic analysis of the microbial diversity in mangrove sediments from the Brazilian Amazon. *Frontiers in Microbiology*, 11, 552.



Anexo 1. Siembra de los respectivos consorcios en la cámara de flujo laminar.



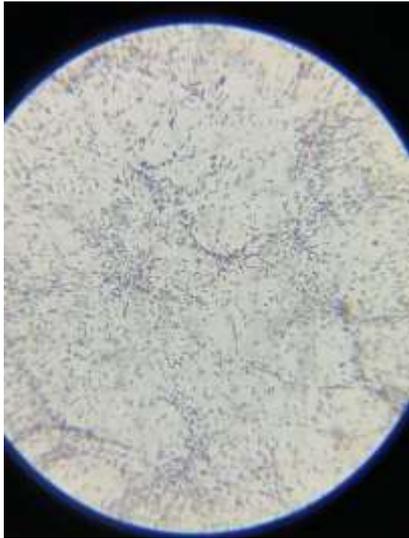
Anexo 2. Crecimiento de colonia invasiva en TSA, evidenciándose cargas elevadas de *Vibrios sp.*



Anexo 3. Aislamiento de *Vibrio Parahemolyticus*



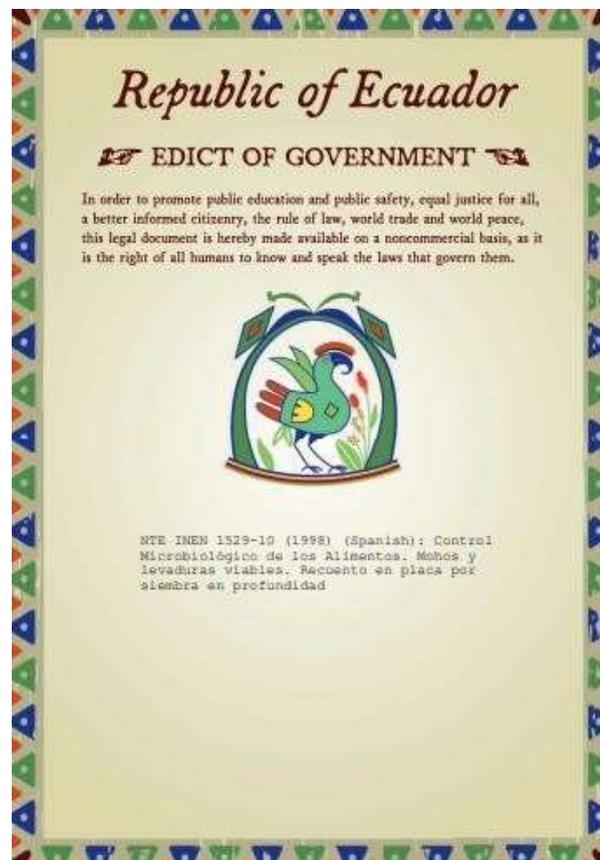
Anexo 4. Tinción de Gram de los consorcios bacterianos de la colonia invasiva visto al microscopio.



Anexo 5. Tinción de Gram de los consorcios bacterianos CN5 visto al microscopio.



Anexo 6. Tinción de Gram de los consorcios bacterianos RS3 visto al microscopio.



Anexo 7. Norma INEN 1529-10 (1998) Control microbiológico de los alimentos.

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

