



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y

Recursos Naturales

“EFICIENCIA DEL USO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CAMARÓN”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO ACUICULTOR

Presentado por:

Carlos Alberto Anangonó Lara

Guayaquil – Ecuador

2014

AGRADECIMIENTO

A DIOS

A mi Madre, por el esfuerzo de cada día.

A mi Padre, que aunque no está con vida, me brindo su apoyo.

A mi Esposa, hijos y hermanos por su ayuda incondicional.

A Ecuador Marcillo G., Ing., por su cooperación en la elaboración de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres.

A mis hermanos.

A mi esposa.

A mis hijos.

A la Patria.

TRIBUNAL DE GRADO



Marco Velarde Toscano, M.Sc.

Presidente del Tribunal



Marco Álvarez Gálvez, PhD.

Director de Tesis



Jerry Landivar Zambrano, M.Sc.

Miembro Principal



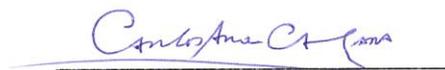
Ecuador Marcillo Gallino, M.Sc.

Miembro Alterno

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrina expuestas en esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la FIMCBOR (Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Oceánicas, Biológicas y Recursos Naturales) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamentos de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL)

A handwritten signature in blue ink, reading "Carlos Anangón Lara", is positioned above a horizontal line.

Carlos Anangón Lara

RESUMEN

Hay muchas referencias del beneficio de suministrar ácidos orgánicos a la dieta de muchos animales, tales como: cerdos, aves de corral, ganado, etc.

El presente trabajo estudia los efectos de suministrar al alimento balanceado un ácido orgánico comercial durante todo el ciclo de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en la fase de engorde.

Para poder evaluar el beneficio de los ácidos orgánicos, se hizo un tratamiento con 3 réplicas en verano y en invierno para descartar la influencia de la temperatura para cada estación. Los datos del tratamiento se compararon con el manejo tradicional de la finca.

Se demostró el beneficio del ácido con una diferencia significativa entre el control y tratamiento en los principales parámetros de producción: Peso promedio, Factor de conversión alimenticia, Supervivencia y libras producidas por hectárea.

En este ensayo se tomó en consideración que la única variable en juego fue la adición del ácido orgánico, el resto de las variables eran iguales para todas las réplicas como: forma de alimentación, toma de parámetros físico-químicos, recambios de agua, densidad de siembra y tamaño de la larva.

Se demuestra que hay un beneficio de utilizar ácidos orgánicos, no sólo porque mejora los resultados de producción sino que hay una mejor utilidad en las piscinas.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE TABLAS.....	xiii
INDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I.- Características generales de los ácidos orgánicos

1.1. Ácidos orgánicos: Disociación y propiedades.....	3
1.2. Modo de acción de los ácidos orgánicos: Efecto antimicrobiano.....	15
1.3. Ácidos orgánicos en el pienso. Interacciones entre el pienso y el ácido orgánico.....	19
1.4. Ácidos orgánicos como promotores de crecimiento.....	22
1.5. Estudios previos del uso de ácidos orgánicos en camarón.....	24

CAPÍTULO II.- Características generales de bacterias patógenas

2.1. Aspectos biológicos de bacterias.....	27
2.2. Principales bacterias causantes de infección en camarón.....	63
2.3. Mecanismo de defensa en microorganismos a los ácidos.....	74
2.4. Métodos para determinar la eficiencia de un antimicrobiano:	77

CAPÍTULO III.- Materiales y Métodos.

3.1. Descripción de la concentración mínima inhibitoria in vitro.....	83
3.2. Implementación del protocolo de trabajo: dosis, correcta preparación....	86

RESULTADOS**CONCLUSIONES****RECOMENDACIONES****ANEXOS****BIBLIOGRAFIA.**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Fórmula de un ácido orgánico	4
Figura 2.- Clasificación según el # de grupos carboxilos.....	4
Figura 3.- Acido orgánico alifático.....	5
Figura 4.- Acido orgánico aromático.....	5
Figura 5.- Solubilidad de ácidos alifáticos.....	9
Figura 6.- Solubilidad de ácidos aromáticos.....	10
Figura 7.- Punto de ebullición de los ácidos	10
Figura 8.- Oxidación de alcoholes primarios para obtener ácidos.....	13
Figura 9.- Oxidación de alquil-bencénicos para obtener ácidos.....	14
Figura 10.- Hidrólisis de nitrilos para obtener ácidos	14
Figura 11.- Reacciones de decarboxilación de aminoácidos asociadas al estrés ácido.....	.76



INDICE DE TABLAS

Tabla I.- Nomenclatura de algunos ácidos orgánicos.....	6
Tabla II.- Constantes de acidez de algunos ácidos carboxílicos.....	8
Tabla III.- Valores de Puntos de fusión y ebullición de algunos ácidos.....	12
Tabla IV: Diseño experimental del ensayo.....	..80
Tabla V: Áreas de las piscinas seleccionadas y sus tratamientos en verano.....	81
Tabla VI: Áreas de las piscinas seleccionadas y sus tratamientos en invierno.....	82
Tabla VII: Principales parámetros Físico-Químicos registrados en verano.....	91
Tabla VIII: Principales parámetros Físico-Químicos registrados en invierno.....	91
Tabla IX: Datos de producción en verano.....	92
Tabla X: Análisis de ANOVA para el rendimiento en verano.....	93
Tabla XI: Análisis de ANOVA para la supervivencia en verano.....	95

Tabla XII: Análisis de ANOVA para la conversión alimenticia en verano.....	96
Tabla XIII: Análisis de ANOVA para el peso promedio en verano.....	98
Tabla XIV: Datos de producción en invierno.....	99
Tabla XV: Análisis de ANOVA para el rendimiento en invierno.....	100
Tabla XVI: Análisis de ANOVA para la supervivencia en invierno.....	101
Tabla XVII: Análisis de ANOVA para la conversión alimenticia en invierno.....	103
Tabla XVIII: Análisis de ANOVA para el Peso promedio en invierno.....	104
TablaXIX: Datos promedios de Producción.....	105
Tabla XX: Evaluación costo/beneficio usando ácido orgánico.....	108

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.- Libras por Ha producidas en verano	94
Gráfico 2.- % de supervivencia en verano	95
Gráfico 3.- Factor de conversión alimenticia en verano	97
Gráfico 4.- Peso de cosecha en verano	98
Gráfico 5.- Libras por Ha producidas en invierno	100
Gráfico 6.- % de supervivencia en invierno	102
Gráfico 7.- Factor de conversión alimenticia en invierno.....	103
Gráfico 8.- Peso de cosecha en invierno	105
Gráfico 9.- Promedio de libras por Ha producidas en las 2 estaciones	106
Gráfico 10.- Promedio de % de Supervivencia en las 2 estaciones.....	106
Gráfico 11.- Promedio de peso de cosecha para las 2 estaciones	107
Gráfico 12.- Promedio de FCA para las dos estaciones	107

ANEXOS

Anexo 1 : Concentración mínima inhibitoria realizada en el CSA..... 112	
Anexo 2 : Concentración mínima inhibitoria realizada en el CSA.....	113
Anexo 3 : Vaciado de alimento en tinas rectangulares.....	114
Anexo 4 : Pesaje de la cantidad requerida de ácido y pegante.....	114
Anexo 5 : Aplicación de la solución ácido-agua sobre el alimento.....	115
Anexo 6 : Mezcla de alimento	115
Anexo7 : Aplicación de producto en máquina mezcladora.....	116
Anexo 8 : Proceso de mezclado en máquina.....	116
Anexo 9 : Colocando en sacos en alimento mezclado con el ácido Orgánico.....	117
Anexo10 :Alimentación en comederos.....	117
Anexo 11 : Tabla de Alimentación de la Camaronera.....	118

INTRODUCCIÓN

El uso de ácidos orgánicos como preservantes en alimentación animal y humana es muy antiguo. De hecho, el tradicional ensilado de forrajes se basa en las propiedades antimicrobianas del ácido láctico, generado por la fermentación que llevan a cabo bacterias lácticas. También en la Industria Alimentaria son bien conocidos los procesos que emplean este ácido como conservador, tales como el yogur, el “chucrut” o el salami. Sin embargo, el empleo de acidificantes en alimentación animal ha adquirido un considerable interés los últimos años, debido a la necesidad de encontrar alternativas al empleo de varios antibióticos, cuyo uso como preventivo se ha prohibido en la legislación europea. (70)

Los acidificantes pueden tener una influencia positiva en la producción ganadera, ya que pueden limitar la proliferación de bacterias y otros microorganismos patógenos o nocivos. Al mismo tiempo, es muy difícil prever las complejas interacciones que pueden darse entre ácidos orgánicos y otros componentes del alimento, así como la influencia de éstos en el metabolismo del animal y la microflora saprófita. (15)

“Como ingenieros acuicultores, tenemos el desafío de buscar nuevas alternativas de manejo para optimizar la producción. Anteriormente las enfermedades las controlábamos con antibióticos que en un futuro fueron contraproducentes porque ocasionaron efectos colaterales tales como: resistencia, acumulación en el fondo de las piscinas y mutación de los patógenos. Los ácidos orgánicos son una alternativa no sólo porque ayudan a controlar las enfermedades y obtener una mejor supervivencia, sino porque como vamos a ver más adelante mejoran la conversión alimenticia, el peso de cosecha, y como consecuencia un mayor rendimiento en las piscinas.”

CAPITULO I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ACIDOS ORGÁNICOS

1.1. Ácidos orgánicos: disociación y propiedades.

Concepto.- Los ácidos orgánicos son compuestos oxigenados derivados de los hidrocarburos que se forman al sustituir en un carbono primario dos hidrógenos por un oxígeno que se une al carbono mediante un doble enlace, y el tercer hidrógeno por un grupo (OH) que se une mediante un enlace simple, el grupo formado por esta sustitución, que como hemos

dicho se sitúa siempre en un extremo de la cadena y reciben el nombre de carboxilo y su fórmula es :

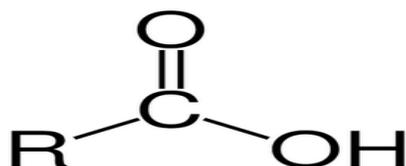


Figura 1.- Fórmula de un ácido orgánico (C. Mortimer)

Clasificación.- Según el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos se clasifican en: monocarboxílicos, dicarboxílicos y tricarboxílicos.

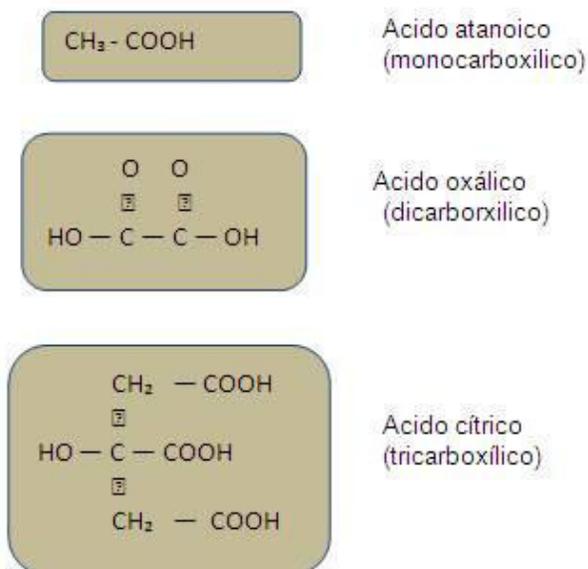


Figura 2.- Clasificación según el # de grupos carboxilos
(C. Mortimer)

También los ácidos orgánicos se clasifican en: alifáticos, si R es una cadena lineal de carbonos y aromáticos si R es un anillo de carbonos

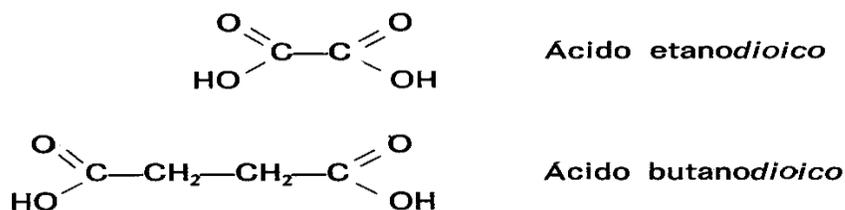


Figura 3.- Acido orgánico alifático (C. Mortimer)

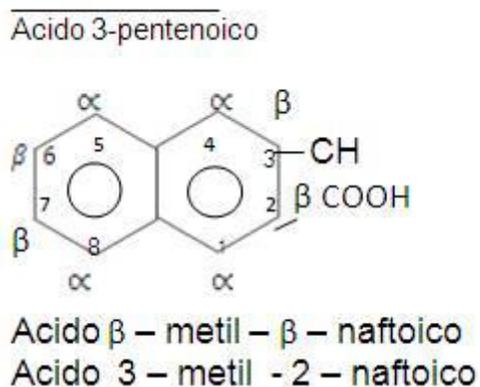


Figura 4.- Acido orgánico aromático (C. Mortimer)

Nomenclatura.- El nombre químico de los ácidos se basa en el del alcano o hidrocarburo aromático correspondiente, anteponiéndose la palabra “ácido” y empleando la terminación “oico”.

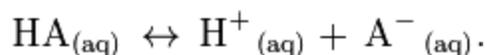
Se admiten numerosos nombres comunes para estas sustancias, por ejemplo, el ácido metanoico, presente en muchos insectos, se suele llamar fórmico (lat. *formica* = hormiga) y el ácido etanoico se denomina acético (lat. *acetum* = vinagre).

ACIDO	SISTEMA COMÚN	SISTEMA IUPAC
H - COOH	Acido fórmico	Acido metanoico
CH ₃ - COOH	Acido acético	Acido etanoico
CH ₃ - CH ₂ - COOH	Acido propiónico	Acido propanoico
CH ₃ - CH ₂ - CH ₂ - COOH	Acido butírico	Acido butanoico
CH ₃ - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - COOH	Acido valérico	Acido pentanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₄ - COOH	Acido caproico	Acido hexanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₅ - COOH	Acido enantílico	Acido heptanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₆ - COOH	Acido caprílico	Acido octanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₇ - COOH	Acido elargónico	Acido nonanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₈ - COOH	Acido cáprico	Acido decanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₉ - COOH	Acido laúrico	Acido dodecanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₁₀ - COOH	Acido mirístico	Acido tetradecanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₁₁ - COOH	Acido palmítico	Acido hexadecanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₁₂ - COOH	Acido margárico	Acido heptadecanoico
CH ₃ - (CH ₂) ₁₃ - COOH	Acido esteárico	Acido octadecanoico

Tabla I.- Nomenclatura de algunos ácidos orgánicos (C. Mortimer)

Disociación de los ácidos.- La mayoría de los ácidos orgánicos, como el acético, son ácidos débiles debido a que no se encuentran totalmente disociados en solución acuosa. Esto significa que aporta iones H^+ al medio, pero también es capaz de aceptarlos. Si representáramos el ácido con la fórmula general HA, en una disolución acuosa una cantidad significativa de HA permanece sin disociar, mientras que el resto del ácido se disociará

en iones positivos H^+ y negativos A^- , formando un equilibrio ácido-base en la siguiente forma (H. Dupont).



Las concentraciones en equilibrio de reactivos y productos se relacionan mediante la constante de acidez (K_a), cuya expresión es:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Cuanto mayor es el valor de K_a , más se favorece la formación de iones H^+ , y más bajo es el pH de la disolución. La K_a de los ácidos débiles varía entre $1,80 \times 10^{-16}$ y 55,50. Los ácidos con una constante K_a menor de $1,80 \times 10^{-16}$ son ácidos más débiles que el agua. Los ácidos con una constante K_a de más de 55,50 se consideran ácidos fuertes y se disocian casi en su totalidad cuando son disueltos en agua.

Ácidos alifáticos	Ka	Ácidos aromáticos	Ka
Métanoico	$17,7 \times 10^{-5}$	Fenil-metanóico	$6,3 \times 10^{-5}$
Etanóico	$1,75 \times 10^{-5}$	Paranitrobenzóico	36×10^{-5}
Propanóico	$1,3 \times 10^{-5}$	Metanitrobenzoico	32×10^{-5}
2-metilbutanoico	$1,68 \times 10^{-5}$	Ortonitrobenzóico	670×10^{-5}

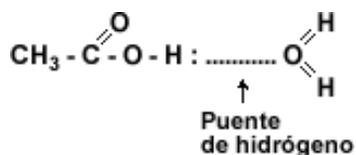
Tabla II.- Constantes de acidez de algunos ácidos carboxílicos

(H. Dupont)

Propiedades Físicas.-

Solubilidad.- El grupo carboxilo $-\text{COOH}$ confiere carácter polar a los ácidos y permite la formación de puentes de hidrógeno entre la molécula de ácido carboxílico y la molécula de agua. La presencia de dos átomos de oxígeno en el grupo carboxilo hace posible que dos moléculas de ácido se unan entre sí por puente de hidrógeno doble, formando un dímero cíclico. Esto hace que los primeros cuatro ácidos monocarboxílicos alifáticos sean líquidos completamente solubles en agua. La solubilidad disminuye a medida que aumenta el número de

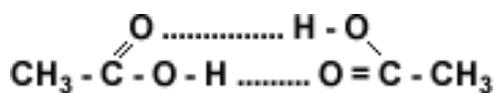
átomos de carbono. A partir del ácido dodecanóico o ácido láurico los ácidos carboxílicos son sólidos blandos insolubles en agua.



Ácido etanóico - agua

Figura 5.- Solubilidad de ácidos alifáticos (C. Harris)

En los ácidos aromáticos monocarboxílicos, la relación carbono-carbono es de 6:1 lo que provoca que la solubilidad se vea disminuida con respecto a los ácidos monocarboxílicos alifáticos.



Ácido etanóico - Ac. etanóico

Figura 6.- Solubilidad de ácidos aromáticos (C. Harris)

Punto de ebullición: Los ácidos carboxílicos presentan puntos de ebullición elevados debido a la presencia de doble puente de hidrógeno.



Figura 7.- Punto de ebullición de los ácidos (C. Harris)

Punto de fusión: El punto de fusión varía según el número de carbonos, siendo más elevado el de los ácidos fórmico y acético, al compararlos con los ácidos propiónico, butírico y valérico de 3, 4 y 5 carbonos, respectivamente. Después de 6 carbonos el punto de fusión se eleva de manera irregular.

Esto se debe a que el aumento del número de átomos de carbono interfiere en la asociación entre las moléculas. Los ácidos monocarboxílicos aromáticos son sólidos cristalinos con puntos de fusión altos respecto a los ácidos alifáticos.

Los ácidos fórmico y acético (1, 2 carbonos) son líquidos de olores irritantes. Los ácidos butíricos, valeriano y capríco (4, 5 y 6 carbonos) presentan olores desagradables. Los ácidos con mayor cantidad de carbonos presentan poco olor.

Nombre	Pto. de fusión °C	Pto. de ebullición °C	Solubilidad gr en 100 gr de agua.
Ac. metanóico	8	100,5	Muy soluble
Ac. etanóico	16,6	118	Muy soluble
Ac. propanóico	-22	141	Muy soluble
Ac. butanóico	-6	164	Muy soluble
Ac. etanodióico	189	239	0,7
Ac. propanodióico	135,6		Soluble
Ac. fenilmetanóico	122		Soluble
Ac. ftálico	231	250	0,34

Tabla III.- Valores de Puntos de fusión y ebullición de algunos ácidos

(C. Harris)

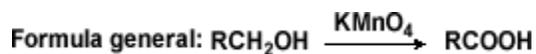
Propiedades Químicas.-

El comportamiento químico de los ácidos carboxílicos está determinado por el grupo carboxilo -COOH. Esta función consta de un grupo carbonilo (C=O) y de un hidroxilo

(-OH). Donde el -OH es el que sufre casi todas las reacciones: pérdida de protón (H⁺) o reemplazo del grupo -OH por otro grupo.

Síntesis de los ácidos carboxílicos.- Los ácidos carboxílicos pueden obtenerse a partir de reacciones químicas como la oxidación de alcoholes primarios, de los compuestos alquil-bencénicos y por la hidrólisis de nitrilos entre otras.

En la oxidación de alcoholes primarios para obtener ácidos carboxílicos mediante esta reacción, el alcohol primario se trata con un agente oxidante fuerte donde el alcohol actúa como un agente reductor oxidándose hasta ácido carboxílico.



Ejemplo:

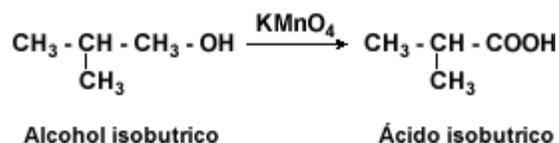


Figura 8.- Oxidación de alcoholes primarios para obtener ácidos (C. Harris)

La oxidación de los derivados alquil-bencénicos con mezclas oxidantes fuertes lleva a la formación de ácidos carboxílicos.

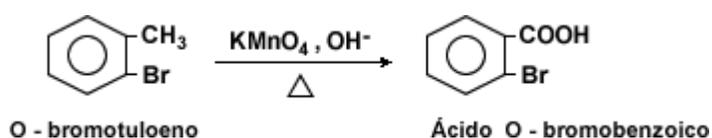


Figura 9.- Oxidación de alquil-bencénicos para obtener ácidos (C. Harris)

Los nitrilos se hidrolizan al ser sometidos a ebullición con ácidos minerales o álcalis en solución acuosa, generando ácidos carboxílicos mediante sustitución nucleofílica.

Reacción general:



Ejemplo:

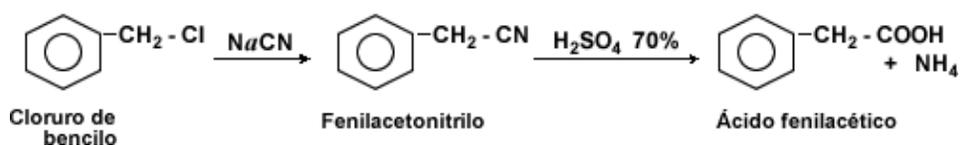


Figura 10.- Hidrólisis de nitrilos para obtener ácidos (C. Harris)

1.2. Modo de acción de los ácidos orgánicos: efecto antimicrobiano

Es importante señalar que los ácidos ejercen sobre los microorganismos dos tipos de efectos distintos, aunque estrechamente relacionados. En primer lugar, existe un efecto antimicrobiano debido a la acidez en sí, esto es, por un declive del pH extracelular. El segundo tipo, más importante en la práctica, es el efecto antimicrobiano específico debido a la forma no disociada, que atraviesa la membrana celular, y causa una disminución del pH intracelular.

Todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo de pH fuera del cual les resulta imposible proliferar. Esto se refiere al pH del medio o extracelular, ya que el pH intracelular tiene que estar necesariamente cerca de la neutralidad, incluso el de los organismos que crecen mejor a pH ácidos (acidófilos).

“El mantenimiento de estas condiciones adecuadas de pH se consigue mediante diversos mecanismos de homeostasis” (8)

Las bacterias entéricas, como *Escherichia* y *Salmonella* sólo crecen a pH próximos a la neutralidad (neutrófilos). Dada la naturaleza logarítmica de la escala de pH, una disminución de 1 o 2 unidades (equivalente a un aumento de

10 o 100 veces en la concentración de protones) tiene un efecto drástico sobre la proliferación de microorganismos.

“La mayoría de las bacterias crecen mal a pH inferiores a 5, pero este nivel de acidez no garantiza, naturalmente, la esterilidad microbiológica: muchas bacterias pueden sobrevivir en estas condiciones durante periodos prolongados de tiempo” (70).

Un pH extracelular muy alejado de 7 perturba el gradiente de protones, que es el principal componente de la fuerza proto-motriz, necesaria para los procesos de transporte a través de la membrana, motilidad y síntesis de ATP acoplada al proceso respiratorio. Además, el metabolismo anaeróbico de bacterias se encuentra regulado por el pH del medio (8). El efecto de la acidificación del medio depende de la concentración y fuerza del ácido.

Por tanto, este tipo de efecto antimicrobiano ocurrirá igual con ácidos orgánicos que inorgánicos, con la salvedad de que hará falta utilizar una cantidad mayor de un ácido orgánico (débil) que de un ácido inorgánico (fuerte) para alcanzar el mismo pH.

Otra consecuencia negativa de este proceso se debe al aumento de turgor celular. Al producirse la disociación del ácido en el interior de la célula, la concentración interna de

aniones va a aumentar. Esto a su vez, desencadena un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de Na^+ , K^+ y/o glutamato, lo que lleva a un incremento mayor de la fuerza iónica intracelular y del turgor. Este proceso provoca un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que eventualmente estalle (28).

Naturalmente, el efecto inhibitorio a causa de la forma no disociada no tiene lugar si la acidificación se produce utilizando ácidos inorgánicos fuertes, por la sencilla razón de que todo el ácido se encuentra disociado en disolución. La mayor o menor actividad inhibitoria de la forma no disociada depende, en primer lugar, de la capacidad de ésta para atravesar las membranas plasmática y exterior de la bacteria, por lo que, en general resultarán más eficaces moléculas de pequeño tamaño y carácter hidrofóbico. Con todo, este tipo de toxicidad se debe seguramente a otros efectos del anión en el interior de la célula y, por tanto, su toxicidad hay que determinarla empíricamente para cada ácido orgánico y cada tipo de microorganismo.

Aunque la acidificación del medio extracelular y el efecto antimicrobiano específico sean muy diferentes, se encuentran íntimamente relacionados,

debido a que la concentración de la forma no disociada de un ácido débil depende, a su vez, del pH del medio; de acuerdo con la ecuación:

$$[AH] = [AH] + [A^-] / (1 + 10^{pH-pKa})$$

indica que la concentración de la forma no disociada del ácido débil será mayor a un pH inferior al pKa correspondiente. Esta relación entre pH y concentración de la forma no disociada permite diseñar acidificantes compuestos por dos especies químicas, por ejemplo, un ácido inorgánico, con el objetivo de bajar el pH y un ácido orgánico débil con buen efecto antimicrobiano. Asimismo, es perfectamente posible emplear las sales correspondientes a los ácidos orgánicos, que al ser compuestos sólidos resultan más fáciles de manejar.

1.3. Ácidos orgánicos en el pienso. Interacciones entre el pienso y el ácido orgánico.

Para poder evaluar las consecuencias de añadir acidificantes al alimento, hay que tener en consideración que los ácidos orgánicos van a tener un efecto no sólo en el pienso en sí, sino también en el estómago e intestino del animal.

Además, estos efectos no se van a limitar a la inhibición de microorganismos potencialmente tóxicos, sino también a la flora microbiana del intestino y a la fisiología del animal. Resulta muy difícil hacer generalizaciones, porque los efectos pueden ser totalmente distintos al variar el tipo de ácido, el pienso sobre el que se aplica y la especie y la edad del animal.

En primer lugar, debe considerarse el efecto del acidificante sobre el pienso en sí. El declive del pH será mayor o menor dependiendo de la capacidad de tamponación del propio pienso. La mayoría de los piensos que se utilizan en la práctica son muy complejos químicamente y suelen contener sustancias con capacidad de actuar como tampón. En alimentos de origen animal, las moléculas más importantes en este sentido son: proteínas, fosfatos y el ácido láctico, mientras que en alimentos de origen vegetal, éstas son los ácidos policarboxílicos y, en menor medida, proteínas y fosfatos (24).

En definitiva, el efecto de un acidificante sobre el pH del alimento tiene que medirse experimentalmente, siendo necesario ajustar la cantidad de ácido en función de la capacidad de tamponación. En general, las leguminosas tienen mayor capacidad amortiguadora del pH que los cereales.

Los efectos de un acidificante sobre el alimento del ganado no se limitan a la acción inhibidora de microorganismos, sino que pueden producir otras modificaciones.

“Por ejemplo, a pH incluso moderadamente ácidos se puede producir la desnaturalización de proteínas, lo que en general se traduce en un aumento de la digestibilidad de las mismas” (6).

Mayor importancia pueden tener los cambios en la palatabilidad y aceptabilidad del alimento, factor que puede fácilmente limitar la máxima concentración posible de ácidos orgánicos.

Una vez ingeridos, los acidificantes también pueden tener efectos en el estómago del animal. Esto es importante en el caso de los lechones recién destetados, en virtud de que los mecanismos de secreción de HCl para acidificar el estómago aún no están completamente desarrollados, y frecuentemente se produce una ralentización del crecimiento.

“Se ha comprobado experimentalmente que la adición de acidificantes contribuye a disminuir el pH estomacal y disminuye la incidencia de infecciones por enterobacterias” (27, 7).

La disminución del pH estomacal también puede afectar a la digestión de proteínas, ya que la principal enzima proteolítica del estómago, la pepsina, tiene un pH óptimo ácido.

“Sin embargo, en la mayoría de los casos este efecto tiene una importancia secundaria, puesto que el grueso de la digestión proteica se produce en el intestino” (76).

“En rumiantes, la adición de ácidos orgánicos afecta a las bacterias del rumen, por lo que los efectos son sumamente complejos y hasta la fecha, están mal conocidos” (57).

Por último, la ingestión de ácidos orgánicos va a producir efectos en el intestino del animal, aunque no es fácil que se produzca una disminución del pH en este órgano. Puede pensarse en un cierto efecto de protección frente a enterobacterias patógenas, mientras que la flora beneficiosa, rica en bacterias lácticas, se verá poco afectada, de hecho, los monogástricos incluido el humano mantienen poblaciones bacterianas muy bajas en el intestino delgado, gracias a mecanismos naturales de defensa, en particular, a la secreción de proteínas antibacterianas (defensinas) por el epitelio intestinal. El posible sinergismo entre ácidos orgánicos y proteínas antibacterianas constituye una interesante área de

investigación para el futuro. Como síntesis se establece que los ácidos orgánicos son metabolizables y contribuyen a la energía bruta del alimento.

“En algunas ocasiones se ha determinado que la combinación de ácidos orgánicos resulta más efectiva que la suma de los efectos de ambos por separado” (73).

Una explicación posible se asocia a la combinación acidificante-antibacteriano antes mencionada. En otros casos, la explicación al sinergismo requerirá un mejor conocimiento del mecanismo de acción de los ácidos (70)

1.4. Ácidos orgánicos como promotores de crecimiento

La aplicación de ácidos orgánicos y sus sales para las dietas de cerdos ha sido extensamente estudiada. Han comenzado a utilizarse desde que la prohibición de promotores de crecimiento a base de antibióticos entró en vigencia en Europa en el 2006. Numerosos estudios han demostrado su modo y magnitud de acción y han establecido las dosis efectivas para los lechones, cerdos de engorde y cerdas. El uso de ácido fórmico y su doble sal de potasio en particular han sido objeto de intensa investigación, con el resultado que ahora conocemos su efecto dependiente de la dosis sobre el desempeño del crecimiento y la conversión alimenticia en cerdos bajo un rango de diferentes condiciones ambientales y las formulaciones de alimentos. Su principal modo de acción es

su efecto antimicrobiano, lo cual hace que sea comparable con los promotores de crecimiento a base de antibióticos; sin embargo, los ácidos orgánicos también reducen el pH en el estómago, lo que optimiza las condiciones para la actividad de la pepsina, y aumenta la digestibilidad del nitrógeno, fósforo y algunos minerales.

Esto no es solo benéfico al reservar los nutrientes, sino que también previene pérdidas que podrían de otro modo contribuir a la contaminación ambiental. Más recientemente, el uso de ácidos en general y en particular los diformatos, se ha extendido a las industrias de las aves de corral y de la Acuicultura. Sus efectos en el mejoramiento del rendimiento en las aves de corral y los peces están documentados (70). Con un efecto promotor de crecimiento similar al de los promotores de crecimiento a base de antibióticos, el paso de promotores de crecimiento hacia los ácidos orgánicos, especialmente diformato de potasio, puede lograrse sin detrimento de la rentabilidad.

La aplicación benéfica de las sales de ácidos orgánicos también fue demostrada por Tung *et al.* (2006) quien utilizó 5 kg / Ton de citrato de sodio junto a lactobacilos inactivados para impulsar el crecimiento del camarón de kuruma

(*Masurpenaeus japonicus*). Por último, un informe reciente (Lückstädt, datos no publicados) sugiere que una dosis de 2,5 kg / Ton de formiato de calcio también puede aumentar las tasas de supervivencia en el cultivo de camarón de agua dulce en Taiwán. Sin embargo, aquellos resultados obtenidos deben ser evaluados en más de una temporada de cultivo.

1.5. Estudios previos del uso de ácidos orgánicos en camarón

Ácidos orgánicos como inhibidores del crecimiento de un potencial patógeno para el camarón: vibrio harveyi (ensayo in vitro)

Saori Mine y Raj Boopathy (2011) del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Nicholls estudiaron el efecto de ácidos orgánicos sobre un patógeno del camarón: El vibrio harveyi., en este estudio, se investigaron los efectos inhibidores del crecimiento de los ácidos orgánicos de cadena corta, a saber: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, sobre *V. Harveyi*(82).

Los resultados de esta prueba de laboratorio fueron los siguientes:

Entre los cuatro ácidos, el ácido fórmico mostró el mayor efecto inhibitorio sobre *V. harveyi* seguido de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico:

Acido fórmico >Acido acético >Acido propiónico >Acido butírico

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de ácido fórmico al 0.035% suprimió el crecimiento de *V. harveyi*. El principal mecanismo de inhibición parece ser el efecto del pH de los ácidos orgánicos:

Acido fórmico (0,035 %) < ácido Propiónico (0,06 %) < ácido acético y Butírico (0,1 %).

Los valores de la concentración efectiva 50 (EC₅₀) a las 96 horas de inoculación para todos los ácidos orgánicos se determinó en 0.023, 0.041, 0.03, y 0.066% para ácido fórmico, acético, propiónico y butírico, respectivamente:

Acido fórmico (0, 023 %) < Acido propiónico (0,030 %) < Acido acético (0,041 %) < Acido butírico (0,066 %).

Estos resultados del estudio de laboratorio son alentadores para formular alimentos para camarones con ácidos orgánicos y así controlar la infección por vibrio en las granjas de camarones de acuicultura.

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS PATÓGENAS

2.1. Aspectos biológicos de las bacterias

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre (29). Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (98).

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de éstas. Como ejemplo cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, solamente la mitad de los filos conocidos de bacterias tienen especies que se pueden cultivar en el laboratorio, por lo que una gran parte (se supone que cerca del 90%) de las especies de bacterias existentes todavía no ha sido descrita (75).

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces más células bacterianas que células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el

tracto digestivo. Aunque el efecto protector del sistema inmunitario hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas, incluyendo: cólera, sífilis, lepra, tifus, difteria, escarlatina, etc. Las enfermedades bacterianas mortales más comunes son las infecciones respiratorias, con una mortalidad sólo para la tuberculosis de cerca de dos millones de personas al año (83).

En todo el mundo se utilizan antibióticos para tratar las infecciones bacterianas. Los antibióticos son efectivos contra las bacterias porque inhiben la formación de la pared celular o detienen otros procesos de su ciclo de vida. También se usan extensamente en la agricultura y la ganadería, lo que ocasiona que se esté generalizando la resistencia de las bacterias a los antibióticos. En la industria, las bacterias son importantes en procesos tales como: En el tratamiento de aguas residuales, producción de queso, yogur, mantequilla, vinagre, y la fabricación de medicamentos y de otros productos químicos (39).

Morfología bacteriana

La forma de las bacterias es muy variada y, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como pleomorfismo. De todas formas, podemos distinguir tres tipos fundamentales de bacterias:

Coco (del griego kókkos, grano): de forma esférica.

Diplococo: cocos en grupos de dos.

Tetracoco: cocos en grupos de cuatro.

Estreptococo: cocos en cadenas.

Estafilococo: cocos en agrupaciones irregulares o en racimo.

Bacilo (del latín baculus, varilla): en forma de bastoncillo.

Formas helicoidales:

Vibrio: ligeramente curvados y en forma de coma, judía o cacahuete.

Espirilo: en forma helicoidal rígida o en forma de tirabuzón.

Espiroqueta: en forma de tirabuzón (helicoidal flexible).

Algunas especies presentan incluso formas tetraédricas o cúbicas (30). Esta amplia variedad de formas es determinada en última instancia por la composición de la pared celular y el citoesqueleto, siendo de vital importancia, porque puede influir en la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes, unirse a superficies o moverse en presencia de estímulos (100).

A continuación se citan diferentes especies con diversos patrones de asociación:

Neisseria gonorrhoeae en forma diploide (por pares).

Streptococcus en forma de cadenas.

Staphylococcus en forma de racimos.

Actinobacteria en forma de filamentos. Dichos filamentos suelen rodearse de una vaina que contiene multitud de células individuales, pudiendo llegar a ramificarse, como el género *Nocardia*, adquiriendo así el aspecto del micelio de un hongo, (26).

Por último, cabe destacar un tipo de morfología más compleja aún, observable en algunos microorganismos del grupo de las mixobacterias. Cuando estas bacterias se encuentran en un medio escaso en aminoácidos son capaces de detectar a las células de alrededor, en un proceso conocido como quorum sensing, en el cual todas las células migran hacia las demás y se agregan, dando lugar a cuerpos fructíferos que pueden alcanzar los 0,5 mm de longitud y contener unas 100.000 células (85). Una vez formada dicha estructura las bacterias son capaces de llevar a cabo diferentes funciones, es decir, se diferencian, alcanzando así un cierto nivel de organización pluricelular. Por ejemplo, entre una y diez células migran a la parte superior del cuerpo fructífero y, una vez allí, se diferencian para dar lugar a un tipo de células latentes denominadas mixosporas, las cuales son más resistentes a la desecación y, en general, a condiciones ambientales adversas (46).

Estructura de la célula bacteriana

Las bacterias son organismos relativamente sencillos. Sus dimensiones son muy reducidas, unos 2 μm de ancho por 7-8 μm de longitud en la forma cilíndrica (bacilo) de tamaño medio; aunque son muy frecuentes las especies de 0,5-1,5 μm .

Carecen de un núcleo delimitado por una membrana aunque presentan un nucleoide, una estructura elemental que contiene una gran molécula circular de ADN. El citoplasma carece de orgánulos delimitados por membranas y de las formaciones protoplasmáticas propias de las células eucariotas. En el citoplasma se pueden apreciar plásmidos, pequeñas moléculas circulares de ADN que coexisten con el nucleoide, contienen genes y son comúnmente usados por las bacterias en la conjugación. El citoplasma también contiene vacuolas (gránulos que contienen sustancias de reserva) y ribosomas (utilizados en la síntesis de proteínas).

Una membrana citoplasmática compuesta de lípidos rodea el citoplasma y, al igual que las células de las plantas, la mayoría posee una pared celular, que en este caso está compuesta por peptidoglicano (mureína). Algunas bacterias, además, presentan una segunda membrana lipídica (membrana externa) rodeando a la pared celular. El espacio comprendido entre la membrana citoplasmática y la pared celular (o la membrana externa si esta existe) se denomina espacio periplásmico. Algunas bacterias presentan una cápsula y otras son capaces de desarrollarse como endosporas, estados latentes capaces

de resistir condiciones extremas. Entre las formaciones exteriores propias de la célula bacteriana destacan los flagelos y los pili (36).

Estructuras intracelulares

La membrana citoplasmática bacteriana tiene una estructura similar a la de plantas y animales. Es una bicapa lipídica compuesta fundamentalmente de fosfolípidos en la que se insertan moléculas de proteínas. En las bacterias realiza numerosas funciones entre las que se incluyen las de barrera osmótica, transporte, biosíntesis, transducción de energía, centro de replicación de ADN y punto de anclaje para los flagelos. A diferencia de las membranas eucarióticas, generalmente no contiene esteroides (son excepciones micoplasmas y algunas proteobacterias), aunque puede contener componentes similares denominados hopanoides.

Muchas importantes reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células se producen por la existencia de gradientes de concentración a ambos lados de

una membrana. Este gradiente crea una diferencia de potencial análoga a la de una batería eléctrica y permite a la célula, por ejemplo, el transporte de electrones y la obtención de energía. La ausencia de membranas internas en las bacterias significa que estas reacciones tienen que producirse a través de la propia membrana citoplasmática, entre el citoplasma y el espacio periplásmico. (46).

Puesto que las bacterias son procariotas no tienen orgánulos citoplasmáticos delimitados por membranas y por ello presentan pocas estructuras intracelulares. Carecen de núcleo celular, mitocondrias, cloroplastos y de los otros orgánulos presentes en las células eucariotas, tales como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (36).

Como excepción, algunas bacterias contienen estructuras intracelulares rodeadas por membranas que pueden considerarse primitivos orgánulos. Ejemplos son los tilacoides de las cianobacterias, los compartimentos que contienen amonio monooxigenasa en nitrosomonadaceae y diversas estructuras en planctomycetes (5)

Como todos los organismos vivos, las bacterias contienen ribosomas para la síntesis de proteínas, Muchas bacterias presentan vacuolas, gránulos intracelulares para el almacenaje de sustancias, como por ejemplo glucógeno, polifosfatos, azufre o polihidroxicanoatos. (10). Ciertas especies bacterianas fotosintéticas, tales como las cianobacterias, producen vesículas internas de gas que utilizan para regular su flotabilidad y así alcanzar la profundidad con intensidad de luz óptima y/o unos niveles de nutrientes óptimos. Otras estructuras presentes en ciertas especies son los carboxisomas (que contienen enzimas para la fijación de carbono) y los magnetosomas (para la orientación magnética) (45)

Las bacterias no tienen un núcleo delimitado por membranas. El material genético está organizado en un único cromosoma situado en el citoplasma, dentro de un cuerpo irregular denominado nucleoide (32). La mayoría de los cromosomas bacterianos son circulares, si bien existen algunos ejemplos de cromosomas lineales, por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*. El nucleoide contiene el cromosoma junto con las proteínas asociadas y ARN. El orden Planctomycetes es una excepción, pues una membrana rodea su nucleoide y tiene varias estructuras celulares delimitadas por membranas (5)

Anteriormente se pensaba que las células procariotas no poseían citoesqueleto, pero desde entonces se han encontrado homólogos bacterianos de las principales proteínas del citoesqueleto de los eucariontes. Estos incluyen las proteínas estructurales FtsZ (que se ensambla en un anillo para mediar durante la división celular bacteriana) y MreB (que determina la anchura de la célula). El citoesqueleto bacteriano desempeña funciones esenciales en la protección, determinación de la forma de la célula bacteriana y en la división celular (32)

Estructuras extracelulares

Las bacterias disponen de una pared celular que rodea a su membrana citoplasmática. Las paredes celulares bacterianas están hechas de peptidoglicano (llamado antiguamente mureína). Esta sustancia está compuesta por cadenas de polisacárido enlazadas por péptidos inusuales que contienen aminoácidos (84). Estos aminoácidos no se encuentran en las proteínas, por lo que protegen a la pared de la mayoría de las peptidasas. Las paredes celulares bacterianas son distintas de las que tienen plantas y hongos, compuestas de celulosa y quitina, respectivamente (96). Son también distintas a las paredes celulares de Archaea, que no contienen peptidoglicano. El antibiótico penicilina

puede matar a muchas bacterias inhibiendo un paso de la síntesis del peptidoglicano..

Existen dos diferentes tipos de pared celular bacteriana denominadas Gram-positiva y Gram-negativa, respectivamente. Estos nombres provienen de la reacción de la pared celular a la tinción de Gram, un método tradicionalmente empleado para la clasificación de las especies bacterianas (47). Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglicano en las que se inserta ácido teicoico. En cambio, las bacterias Gram-negativas tienen una pared relativamente fina, consistente en unas pocas capas de peptidoglicano, rodeada por una segunda membrana lipídica (la membrana externa) que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas.

Las micoplasmas son una excepción, pues carecen de pared celular. La mayoría de las bacterias tienen paredes celulares Gram-negativas; solamente son Gram-positivas Firmicutes y Actinobacteria. Estos dos grupos eran antiguamente conocidos como bacterias Gram-positivas de contenido GC bajo y bacterias Gram-positivas de contenido GC alto, respectivamente. Estas

diferencias en la estructura de la pared celular dan lugar a diferencias en la susceptibilidad antibiótica. Por ejemplo, la vancomicina puede matar solamente a bacterias Gram-positivas y es ineficaz contra patógenos Gram-negativos, tales como *Haemophilus influenzae* o *Pseudomonas aeruginosa* (38).

Dentro del filo Actinobacteria cabe hacer una mención especial al género *Mycobacterium*, el cual, si bien se encuadra dentro de las Gram positivas, no parece serlo desde el punto de vista empírico, ya que su pared no retiene el tinte. Esto se debe a que presentan una pared celular poco común, rica en ácidos micólicos, de carácter hidrófobo y ceroso y bastante gruesa, lo que les confiere una gran resistencia.

Muchas bacterias tienen una capa S de moléculas de proteína de estructura rígida que cubre la pared celular. Esta capa proporciona protección química y física para la superficie celular y puede actuar como una barrera de difusión macromolecular. Las capas S tienen diversas (aunque todavía no bien comprendidas) funciones. Por ejemplo, en el género *Campylobacter* actúan

como factores de virulencia y en la especie *Bacillus stearothermophilus* contienen enzimas superficiales (21)

Los flagelos son largos apéndices filamentosos compuestos de proteínas y utilizados para el movimiento. Tienen un diámetro aproximado de 20 nm y una longitud de hasta 20 μm . Los flagelos son impulsados por la energía obtenida de la transferencia de iones. Esta Transferencia es impulsada por el gradiente electroquímico que existe entre ambos lados de La membrana citoplasmática. Las fimbrias son filamentos finos de proteínas que se distribuyen sobre la superficie de la célula. Tienen un diámetro aproximado de 2-10 nm y una longitud de hasta varios μm . Cuando se observan a través del microscopio electrónico se asemejan a pelos finos. Las fimbrias ayudan a la adherencia de las bacterias a las superficies sólidas o a otras células y son esenciales en la virulencia de algunos patógenos. Los pili son apéndices celulares ligeramente mayores que las fimbrias y se utilizan para la transferencia de material genético entre bacterias en un proceso denominado conjugación bacteriana (48).

Muchas bacterias son capaces de acumular material en el exterior para recubrir su superficie. Dependiendo de la rigidez y su relación con la célula se clasifican en cápsulas y glicocalix. La cápsula es una estructura rígida que se une

firmemente a la superficie bacteriana, en tanto que el glicocalix es flexible y se une de forma laxa. Estas estructuras protegen a las bacterias pues dificultan que sean fagocitadas por células eucariotas tales como los macrófagos. También pueden actuar como antígenos y estar implicadas en el reconocimiento bacteriano, así como ayudar a la adherencia superficial y a la formación de biopelículas (90).

La formación de estas estructuras extracelulares depende del sistema de secreción bacteriano. Este sistema transfiere proteínas desde el citoplasma al periplasma o al espacio que rodea a la célula. Se conocen muchos tipos de sistemas de secreción, que son a menudo esenciales para la virulencia de los patógenos, por lo que son extensamente estudiados.

Ciertos géneros de bacterias Gram-positivas, tales como *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporohalobacter*, *Anaerobacter* y *Heliobacterium*, pueden formar endosporas.^[79] Las endosporas son estructuras durmientes altamente resistentes cuya función primaria es sobrevivir cuando las condiciones ambientales son adversas. En casi todos los casos, las endosporas no forman parte de un proceso

reproductivo, aunque *Anaerobacter* puede formar hasta siete endosporas a partir de una célula.^[80] Las endosporas tienen una base central de citoplasma que contiene ADN y ribosomas, rodeada por una corteza y protegida por una cubierta impermeable y rígida (67).

Las endosporas no presentan un metabolismo detectable y pueden sobrevivir a condiciones físicas y químicas extremas, tales como altos niveles de luz ultravioleta, rayos gamma, detergentes, desinfectantes, calor, presión y desecación. En este estado durmiente, las bacterias pueden seguir viviendo durante millones de años, e incluso pueden sobrevivir en la radiación y vacío del espacio exterior. Las endosporas pueden también causar enfermedades. Por ejemplo, puede contraerse carbunco por la inhalación de endosporas de *Bacillus anthracis* y tétanos por la contaminación de las heridas con endosporas de *Clostridium tetani* (12).

Metabolismo

En contraste con los organismos superiores, las bacterias exhiben una gran variedad de tipos metabólicos. La distribución de estos tipos metabólicos dentro de un grupo de bacterias se ha utilizado tradicionalmente para definir su taxonomía, pero estos rasgos no corresponden a menudo con las clasificaciones genéticas modernas. El metabolismo bacteriano se clasifica con base en tres criterios importantes: el origen del carbono, la fuente de energía y los donadores de electrones. Un criterio adicional para clasificar a los microorganismos que respiran es el receptor de electrones usado en la respiración (99).

Según la fuente de carbono, las bacterias se pueden clasificar como:

Heterótrofas, cuando usan compuestos orgánicos.

Autótrofas, cuando el carbono celular se obtiene mediante la fijación del dióxido de carbono.

Las bacterias autótrofas típicas son las cianobacterias fotosintéticas, las bacterias verdes del azufre y algunas bacterias púrpura. Pero hay también muchas otras especies quimiolitotrofas, por ejemplo, las bacterias nitrificantes y oxidantes del azufre (102).

Según la fuente de energía, las bacterias pueden ser:

Fototrofas, cuando emplean la luz a través de la fotosíntesis.

Quimiotrofas, cuando obtienen energía a partir de sustancias químicas que son oxidadas principalmente a expensas del oxígeno (respiración aerobia) o de otros receptores de electrones alternativos (respiración anaerobia).

Según los donadores de electrones, las bacterias también se pueden clasificar como:

Litotrofas, si utilizan como donadores de electrones compuestos inorgánicos.

Organotrofas, si utilizan como donadores de electrones compuestos orgánicos.

Los organismos quimiotrofos usan donadores de electrones para la conservación de energía (durante la respiración aerobia, anaerobia y la fermentación) y para las reacciones biosintéticas (por ejemplo, para la fijación del dióxido de carbono), mientras que los organismos fototrofos los utilizan únicamente con propósitos biosintéticos.

Los organismos que respiran usan compuestos químicos como fuente de energía, tomando electrones del sustrato reducido y transfiriéndolos a un receptor terminal de electrones en una reacción redox. Esta reacción desprende energía que se puede utilizar para sintetizar ATP y así mantener activo el metabolismo. En los organismos aerobios, el oxígeno se utiliza como receptor de electrones. En los organismos anaerobios se utilizan como receptores de electrones otros compuestos inorgánicos tales como nitratos, sulfatos o dióxido de carbono. Esto conduce a que se lleven a cabo los importantes procesos biogeoquímicos de la desnitrificación, la reducción del sulfato y la acetogénesis, respectivamente. Otra posibilidad es la fermentación, un proceso de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico, que al reducirse será el receptor final de los electrones. Ejemplos de productos de fermentación reducidos son el lactato (en la fermentación láctica), etanol (en la fermentación alcohólica), hidrógeno, butirato, etc. La fermentación es posible porque el contenido de energía de los sustratos es mayor que el de los productos, lo que permite que los organismos sinteticen ATP y mantengan activo su metabolismo. Los organismos anaerobios facultativos pueden elegir entre la fermentación y diversos receptores terminales de electrones dependiendo de las condiciones ambientales en las cuales se encuentren (103).

Las bacterias litotrofas pueden utilizar compuestos inorgánicos como fuente de energía. Los donadores de electrones inorgánicos más comunes son el hidrógeno, el monóxido de carbono, el amoníaco (que conduce a la nitrificación), el hierro ferroso y otros iones de metales reducidos, así como varios compuestos de azufre reducidos. En determinadas ocasiones, las bacterias metanotrofas pueden usar gas metano como fuente de electrones y como sustrato simultáneamente, para el anabolismo del carbono.^[92] En la fototrofia y quimiolitotrofia aerobias, se utiliza el oxígeno como receptor terminal de electrones, mientras que bajo condiciones anaeróbicas se utilizan compuestos inorgánicos. La mayoría de los organismos litotrofos son autótrofos, mientras que los organismos organotrofos son heterótrofos (19).

Además de la fijación del dióxido de carbono mediante la fotosíntesis, algunas bacterias también fijan el gas nitrógeno usando la enzima nitrogenasa. Esta característica es muy importante a nivel ambiental y se puede encontrar en bacterias de casi todos los tipos metabólicos enumerados anteriormente, aunque no es universal.^[93] El metabolismo microbiano puede jugar un papel importante en la biorremediación pues, por ejemplo, algunas especies pueden

realizar el tratamiento de las aguas residuales y otras son capaces de degradar los hidrocarburos, sustancias tóxicas e incluso radiactivas. En cambio, las bacterias reductoras de sulfato son en gran parte responsables de la producción de formas altamente tóxicas de mercurio (metil- y dimetil-mercurio) en el ambiente (101).

Movimiento

Algunas bacterias son inmóviles y otras limitan su movimiento a cambios de profundidad. Por ejemplo, cianobacterias y bacterias verdes del azufre contienen vesículas de gas con las que pueden controlar su flotabilidad y así conseguir un óptimo de luz y alimento. Las bacterias móviles pueden desplazarse por deslizamiento, mediante contracciones o más comúnmente usando flagelos. Algunas bacterias pueden deslizarse por superficies sólidas segregando una sustancia viscosa, pero el mecanismo que actúa como propulsor es todavía desconocido. En el movimiento mediante contracciones, la bacteria usa su pilus de tipo IV como gancho de ataque, primero lo extiende, anclándolo y después lo contrae con una fuerza notable (>80 Newton (unidad)|pN) (3).

El flagelo bacteriano es un largo apéndice filamentoso helicoidal propulsado por un motor rotatorio (como una hélice) que puede girar en los dos sentidos. El motor utiliza como energía un gradiente electroquímico a través de la membrana. Los flagelos están compuestos por cerca de 20 proteínas, con aproximadamente otras 30 proteínas para su regulación y coordinación. Hay que tener en cuenta que, dado el tamaño de la bacteria, el agua les resulta muy viscosa y el mecanismo de propulsión debe ser muy potente y eficiente. Los flagelos bacterianos se encuentran tanto en las bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y son completamente diferentes de los eucarióticos y, aunque son superficialmente similares a los arqueanos, se consideran no homólogos (62).

Según el número y disposición de los flagelos en la superficie de la bacteria se distinguen los siguientes tipos: un solo flagelo (*monotrico*), un flagelo en cada extremo (*anfitrico*), grupos de flagelos en uno o en los dos extremos (*lofotrico*) y flagelos distribuidos sobre toda la superficie de la célula (*peritricos*). En un grupo único de bacterias, las espiroquetas, se presentan unos flagelos especializados, denominados *filamentos axiales*, localizados intracelularmente en el espacio periplásmico, entre las dos membranas. Estos producen un movimiento rotatorio

que hace que la bacteria gire como un sacacorchos desplazándose hacia delante (62).

Muchas bacterias (tales como *E. coli*) tienen dos tipos de movimiento: en línea recta (carrera) y aleatorio. En este último, se realiza un movimiento tridimensional aleatorio al combinar la bacteria carreras cortas con virajes al azar. Las bacterias móviles pueden presentar movimientos de atracción o repulsión determinados por diferentes estímulos. Estos comportamientos son denominados *taxis*, e incluyen diversos tipos como la quimiotaxis, la fototaxis o la magnetotaxis. En el peculiar grupo de las mixobacterias, las células individuales se mueven juntas formando ondas de células, que terminarán agregándose para formar los cuerpos fructíferos característicos de este género. El movimiento de las mixobacterias se produce solamente sobre superficies sólidas, en contraste con *E. coli*, que es móvil tanto en medios líquidos como sólidos (59).

Varias especies de *Listeria* y *Shigella* se mueven dentro de las células huésped apropiándose de su citoesqueleto, que normalmente movería los orgánulos. La polimerización de actina crea un empuje en un extremo de la bacteria que la mueve a través del citoplasma de la célula huésped (46)

Reproducción

En las bacterias, el aumento en el tamaño de las células (crecimiento) y la reproducción por división celular están íntimamente ligados, como en la mayor parte de los organismos unicelulares. Las bacterias crecen hasta un tamaño fijo y después se reproducen por fisión binaria, una forma de reproducción asexual (33). En condiciones apropiadas, una bacteria Gram-positiva puede dividirse cada 20–30 minutos y una Gram-negativa cada 15–20 minutos, y en alrededor de 16 horas su número puede ascender a unos 5.000 millones (aproximadamente el número de personas que habitan la Tierra). Bajo condiciones óptimas, algunas bacterias pueden crecer y dividirse muy rápido, tanto como cada 9,8 minutos. En la división celular se producen dos células hijas idénticas. Algunas bacterias, todavía reproduciéndose asexualmente, forman estructuras reproductivas más complejas que facilitan la dispersión de las células hijas recién formadas. Ejemplos incluyen la formación de cuerpos fructíferos (esporangios) en las mixobacterias, la formación de hifas en *Streptomyces* y la gemación. En la gemación una célula forma una protuberancia que a continuación se separa y produce una nueva célula hija (47).

Por otro lado, cabe destacar un tipo de reproducción sexual en bacterias, denominada parasexualidad bacteriana. En este caso, las bacterias son capaces de intercambiar material genético en un proceso conocido como conjugación bacteriana. Durante el proceso una bacteria donante y una bacteria receptora llevan a cabo un contacto mediante pelos sexuales huecos o pili, a través de los cuales se transfiere una pequeña cantidad de ADN independiente o plásmido conjugativo. El mejor conocido es el plásmido F de *E. coli*, que además puede integrarse en el cromosoma bacteriano. En este caso recibe el nombre de episoma, y en la transferencia arrastra parte del cromosoma bacteriano. Se requiere que exista síntesis de ADN para que se produzca la conjugación. La replicación se realiza al mismo tiempo que la transferencia.

Crecimiento

El crecimiento bacteriano sigue tres fases. Cuando una población bacteriana se encuentra en un nuevo ambiente con elevada concentración de nutrientes que le permiten crecer necesita un período de adaptación a dicho ambiente. Esta

primera fase se denomina fase de adaptación o fase log y conlleva un lento crecimiento, donde las células se preparan para comenzar un rápido crecimiento, y una elevada tasa de biosíntesis de las proteínas necesarias para ello, como ribosomas, proteínas de membrana, etc. La segunda fase de crecimiento se denomina fase exponencial, ya que se caracteriza por el crecimiento exponencial de las células. La velocidad de crecimiento durante esta fase se conoce como la tasa de crecimiento k y el tiempo que tarda cada célula en dividirse como el tiempo de generación g . Durante esta fase, los nutrientes son metabolizados a la máxima velocidad posible, hasta que dichos nutrientes se agoten, dando paso a la siguiente fase. La última fase de crecimiento se denomina fase estacionaria y se produce como consecuencia del agotamiento de los nutrientes en el medio. En esta fase las células reducen drásticamente su actividad metabólica y comienzan a utilizar como fuente energética aquellas proteínas celulares no esenciales. La fase estacionaria es un período de transición desde el rápido crecimiento a un estado de respuesta a estrés, en el cual se activa la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, en el metabolismo antioxidante y en el transporte de nutrientes (20).

Genética

La mayoría de las bacterias tienen un único cromosoma circular cuyo tamaño puede ir desde sólo 160.000 pares de bases en la bacteria endosimbionte *Candidatus Carsonella ruddii* a los 12.200.000 pares de bases de la bacteria del suelo *Sorangium cellulosum*. Las espiroquetas del género *Borrelia* (que incluyen, por ejemplo, a *Borrelia burgdorferi*, la causa de la enfermedad de Lyme) son una notable excepción a esta regla pues contienen un cromosoma lineal. Las bacterias pueden tener también plásmidos, pequeñas moléculas de ADN extra-cromosómico que pueden contener genes responsables de la resistencia a los antibióticos o factores de virulencia. Otro tipo de ADN bacteriano proviene de la integración de material genético procedente de bacteriófagos (los virus que infectan bacterias). Existen muchos tipos de bacteriófagos, algunos simplemente infectan y rompen las células huésped bacterianas, mientras que otros se insertan en el cromosoma bacteriano. De esta forma se pueden insertar genes del virus que contribuyan al fenotipo de la bacteria. Por ejemplo, en la evolución de *Escherichia coli* O157:H7 y *Clostridium botulinum*, los genes tóxicos aportados por un bacteriófago convirtieron a una inofensiva bacteria ancestral en un patógeno letal (74).

Las bacterias, como organismos asexuales que son, heredan copias idénticas de genes, es decir, son clones. Sin embargo, pueden evolucionar por selección natural mediante cambios en el ADN debidos a mutaciones y a la recombinación genética. Las mutaciones provienen de errores durante la réplica del ADN o por exposición a agentes mutagénicos. Las tasas de mutación varían ampliamente entre las diversas especies de bacterias e incluso entre diferentes cepas de una misma especie de bacteria. Los cambios genéticos pueden producirse al azar o ser seleccionados por estrés, en donde los genes implicados en algún proceso que limita el crecimiento tienen una mayor tasa de mutación (17).

Las bacterias también pueden transferirse material genético entre células. Esto puede realizarse de tres formas principalmente. En primer lugar, las bacterias pueden recoger ADN exógeno del ambiente en un proceso denominado transformación. Los genes también se pueden transferir por un proceso de transducción mediante el cual un bacteriófago introduce ADN extraño en el cromosoma bacteriano. El tercer método de transferencia de genes es por conjugación bacteriana, en donde el ADN se transfiere a través del contacto directo (por medio de un pilus) entre células. Esta adquisición de genes de otras bacterias o del ambiente se denomina transferencia de genes horizontal y puede

ser común en condiciones naturales. La transferencia de genes es especialmente importante en la resistencia a los antibióticos, pues permite una rápida diseminación de los genes responsables de dicha resistencia entre diferentes patógenos (18).

Interacciones con otros organismos

A pesar de su aparente simplicidad, las bacterias pueden formar asociaciones complejas con otros organismos. Estas asociaciones se pueden clasificar como parasitismo, mutualismo y comensalismo (97).

Comensales

Debido a su pequeño tamaño, las bacterias comensales son ubicuas y crecen sobre animales y plantas exactamente igual a como crecerían sobre cualquier otra superficie. Así, por ejemplo, grandes poblaciones de estos organismos son las causantes del mal olor corporal y su crecimiento puede verse aumentado con el calor y el sudor.

Mutualistas

Ciertas bacterias forman asociaciones íntimas con otros organismos, que les son imprescindibles para su supervivencia. Una de estas asociaciones mutualistas es la transferencia de hidrógeno entre especies. Se produce entre grupos de bacterias anaerobias que consumen ácidos orgánicos tales como ácido butírico o ácido propiónico y producen hidrógeno, y las arqueas metanógenas que consumen dicho hidrógeno. Las bacterias en esta asociación no pueden consumir los ácidos orgánicos cuando el hidrógeno se acumula a su alrededor. Solamente la asociación íntima con las arqueas mantiene una concentración de hidrógeno lo bastante baja para permitir que las bacterias crezcan.

En el suelo, los microorganismos que habitan la rizosfera (la zona que incluye la superficie de la raíz y la tierra que se adhiere a ella) realizan la fijación de nitrógeno, convirtiendo el nitrógeno atmosférico (en estado gaseoso) en compuestos nitrogenados. Esto proporciona a muchas plantas, que no pueden fijar el nitrógeno por sí mismas, una forma fácilmente absorbible de nitrógeno (89).

Muchas otras bacterias se encuentran como simbioses en seres humanos y en otros organismos. Por ejemplo, en el tracto digestivo proliferan unas mil especies bacterianas. Sintetizan vitaminas tales como ácido fólico, vitamina K y biotina. También fermentan los carbohidratos complejos indigeribles y convierten las proteínas de la leche en ácido láctico (por ejemplo, *Lactobacillus*). Además, la presencia de esta flora intestinal inhibe el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (generalmente por exclusión competitiva). Muchas veces estas bacterias beneficiosas se venden como suplementos dietéticos probióticos (34).

Patógenos

Las bacterias patógenas son una de las principales causas de las enfermedades y de la mortalidad humana, causando infecciones tales como el tétanos, la fiebre tifoidea, la difteria, la sífilis, el cólera, intoxicaciones alimentarias, la lepra y la tuberculosis. Hay casos en los que la etiología o causa de una enfermedad conocida se descubre solamente después de muchos años, como fue el caso de la úlcera péptica y *Helicobacter pylori*. Las enfermedades bacterianas son también importantes en la agricultura y en la ganadería, donde existen multitud de enfermedades como por ejemplo la mancha de la hoja, la plaga de fuego, la

paratuberculosis, el añublo bacterial de la panícula, la mastitis, la salmonela y el carbunco.

Cada especie de patógeno tiene un espectro característico de interacciones con sus huéspedes humanos. Algunos organismos, tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*, pueden causar infecciones de la piel, pulmonía, meningitis e incluso sepsis, una respuesta inflamatoria sistémica que produce shock, vasodilatación masiva y muerte.^[121] Sin embargo, estos organismos son también parte de la flora humana normal y se encuentran generalmente en la piel o en la nariz sin causar ninguna enfermedad (81).

Otros organismos causan invariablemente enfermedades en los seres humanos. Por ejemplo, el género *Rickettsia*, que son parásitos intracelulares obligados capaces de crecer y reproducirse solamente dentro de las células de otros organismos. Una especie de *Rickettsia* causa el tifus, mientras que otra ocasiona la fiebre de las Montañas Rocosas. *Chlamydiae*, otro filo de parásitos obligados intracelulares, contiene especies que causan neumonía, infecciones urinarias y pueden estar implicadas en enfermedades cardíacas coronarias.

Finalmente, ciertas especies tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* y *Mycobacterium avium* son patógenos oportunistas y causan enfermedades principalmente en las personas que sufren inmunosupresión o fibrosis quística (25).

Las infecciones bacterianas se pueden tratar con antibióticos, que se clasifican como bactericidas, si matan bacterias, o como bacterioestáticos, si solo detienen el crecimiento bacteriano. Existen muchos tipos de antibióticos y cada tipo inhibe un proceso que difiere en el patógeno con respecto al huésped. Ejemplos de antibióticos de toxicidad selectiva son el cloranfenicol y la puromicina, que inhiben el ribosoma bacteriano, pero no el ribosoma eucariota que es estructuralmente diferente. Los antibióticos se utilizan para tratar enfermedades humanas y en la ganadería intensiva para promover el crecimiento animal. Esto último puede contribuir al rápido desarrollo de la resistencia antibiótica de las poblaciones bacterianas. Las infecciones se pueden prevenir con medidas antisépticas tales como la esterilización de la piel antes de las inyecciones y con el cuidado apropiado de los catéteres. Los instrumentos quirúrgicos y dentales también son esterilizados para prevenir la contaminación e infección por bacterias. Los desinfectantes tales como la lejía se utilizan para matar bacterias

u otros patógenos que se depositan sobre las superficies y así prevenir la contaminación y reducir el riesgo de infección (80).

Clasificación e identificación

La clasificación taxonómica busca describir y diferenciar la amplia diversidad de especies bacterianas poniendo nombres y agrupando organismos según sus similitudes. Las bacterias pueden clasificarse con base en diferentes criterios, como estructura celular, metabolismo o con base en diferencias en determinados componentes como ADN, ácidos grasos, pigmentos, antígenos o quinonas. Sin embargo, aunque estos criterios permitían la identificación y clasificación de cepas bacterianas, aún no quedaba claro si estas diferencias representaban variaciones entre especies diferentes o entre distintas cepas de la misma especie. Esta incertidumbre se debía a la ausencia de estructuras distintivas en la mayoría de las bacterias y a la existencia de la transferencia horizontal de genes entre especies diferentes, la cual da lugar a que bacterias muy relacionadas puedan llegar a presentar morfologías y metabolismos muy diferentes. Por ello, y con el fin de superar esta incertidumbre, la clasificación bacteriana actual se centra en el uso de técnicas moleculares modernas (filogenia molecular), tales como la determinación del contenido de

guanina/citosina, la hibridación genoma-genoma o la secuenciación de ADN ribosómico, el cual no se ve involucrado en la transferencia horizontal (94).

El Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP) es el organismo encargado de la nomenclatura, taxonomía y las normas según las cuales son designados los procariotas. El ICSP es responsable de la publicación del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (lista de nombres aprobados de especies y taxones bacterianos). También publica la Revista Internacional de Bacteriología Sistemática (International Journal of Systematic Bacteriology). En contraste con la nomenclatura procariótica, no hay una clasificación oficial de los procariotas porque la taxonomía sigue siendo una cuestión de criterio científico. La clasificación más aceptada es la elaborada por la oficina editorial del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) como paso preliminar para organizar el contenido de la publicación. Esta clasificación, conocida como "The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea" (TOBA), está disponible en Internet. Debido a la reciente introducción de la filogenia molecular y del análisis de las secuencias de genomas, la clasificación bacteriana actual es un campo en continuo cambio y plena expansión (23).

La identificación de bacterias en el laboratorio es particularmente relevante en medicina, donde la determinación de la especie causante de una infección es crucial a la hora de aplicar un correcto tratamiento. Por ello, la necesidad de identificar a los patógenos humanos ha dado lugar a un potente desarrollo de técnicas para la identificación de bacterias.

La técnica de tinción de membranas de bacterias de Gram, desarrollada por Hans Christian Gram en 1884, ha supuesto un antes y un después en el campo de la medicina, y consiste en teñir con tintes específicos diversas muestras de bacterias en un portaobjetos para saber si se han teñido o no con dicho tinte (17)

Una vez se han adicionado los tintes específicos en las muestras, y se ha lavado la muestra pasados unos minutos para evitar confusiones, hay que limpiarlas con unas gotas de alcohol etílico. La función del alcohol es la de eliminar el tinte de las bacterias, y es aquí donde se reconocen las bacterias que se han tomado: si la bacteria conserva el tinte, es una Gram positiva, las cuales poseen una pared más gruesa constituida por varias decenas de capas de

diversos componentes proteicos; en el caso de que el tinte no se mantenga, la bacteria es una Gram negativa, la cual posee una pared de una composición diferente. La función biológica que posee ésta técnica es la de fabricar antibióticos específicos para esas bacterias.

Esta tinción es empleada en microbiología para la visualización de bacterias en muestras clínicas. También se emplea como primer paso en la distinción de diferentes especies de bacterias,^[139] considerándose bacterias Gram positivas a aquellas que se tornan de color violeta y Gram negativas a las que se tornan de color rojo (78).

2.2. Principales bacterias causantes de infecciones en camarón.

La acuicultura es el sector de producción de alimento de más rápido crecimiento en el ámbito mundial y se establecido como una fuente de proteína para satisfacer la demanda de alimentos mundial debido a que los recurso naturales están sobreexplotados. Pero, en la actualidad, el mayor problema que enfrenta la industria de la Acuicultura en el ámbito mundial, son las enfermedades

causadas por varios agentes biológicos y no biológicos. Entre los grupos de microorganismos que causan pérdidas serias en el cultivo de camarón, los mejores conocidos son las bacterias debido a los efectos devastadores que tienen sobre las granjas afectadas. Las enfermedades bacterianas, debido principalmente a *Vibrio*, que han sido reportadas en los sistemas de cultivo de penaeideos implican a al menos 14 especies, las cuales son: *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. campbelli*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii*, *V. mediterrani*, *V. logei* etc.

La vibriosis es una de las enfermedades más problemáticas en la Acuicultura de camarones y peces. La vibriosis es una enfermedad bacteriana responsable de la mortalidad del camarón de cultivo en todo el mundo (55, 52, 50 y 13).

Las especies *Vibrio* están ampliamente distribuidas en las instalaciones de cultivo de todo el mundo. Las infecciones relacionadas con el *Vibrio* frecuentemente se dan en los laboratorios, pero las epizootias también se dan en las camaroneras. La vibriosis es causada por una bacteria gram-negativa de la familia *Vibrionaceae*. Los brotes pueden ocurrir cuando los factores

ambientales disparan la rápida multiplicación de las bacterias que son toleradas a bajos niveles dentro de la sangre del camarón (87), o por la penetración de bacteria a las barreras del huésped. El exoesqueleto provee una barrera física efectiva para los patógenos que tratan de penetrar la superficie externa de los crustáceos, así como en los intestinos anterior y posterior. Sin embargo, *Vibrio* spp. están entre las bacterias quitinoclasticas asociadas con la enfermedad de la concha (14) y puede ingresar a través de las heridas en el exoesqueleto o poros (44 y 1). Las branquias parecen ser susceptibles a la penetración bacterial debido a que están cubiertas por exoesqueleto delgado (93), El intestino medio, compuesto por la glándula digestiva (DG) y el tronco medio (MGT, frecuentemente referido como el intestino, (58), no está revestido por un exoesqueleto y por consiguiente parece ser el sitio probable de penetración de patógenos presentes en el agua, alimentos y sedimentos (77 y 42).

Vibrio harveyi, una bacteria Gram negativa, es una de los importantes agentes etiológicos de las mortalidades masivas de los sistemas de crianza de larvas de *Penaeus monodon*. Un gran número de laboratorios a lo largo de la línea costera de nuestro país involucrada en la producción de semilla de camarón frecuentemente tienen problemas debido a la enfermedad bacteriana luminiscente y sufren enormes pérdidas económicas.

Entre los *Vibrio harveyi* aislados, algunos son virulentos y otros no, sugiriendo una gran variación molecular y genética en este grupo de bacterias. Los mecanismos patogénicos han sido recientemente atribuidos a los bacteriófagos.

La vibriosis está presente en todo el mundo y en todos los crustáceos marinos, incluido los camarones que son los más susceptibles. Las epizootias ocurren todos los estadios de vida, pero son más comunes en los laboratorios. Las mayores epizootias de vibriosis han sido reportadas para *P. monodon* en la región Indo-Pacífico, *P. japonicus* de Japón, y *P. vannamei* de Ecuador, Perú, Colombia y América Central (53).

La vibriosis se expresa de diferentes formas de síndromes. Estos incluyen: vibriosis oral y entérica, vibriosis de los apéndices y cuticular, vibriosis localizadas en las heridas, enfermedad de la concha, vibriosis sistémica y hepatopancreatitis séptica (53).

La vibriosis es causada por varias especies de *Vibrio*, entre las que se incluyen: *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* (9 y 40). Existen reportes de vibriosis causados por *V. damsela*, *V. fluvialis* y otras especies de *Vibrio* no definidas (53).

Las especies de *Vibrio* son parte de la microflora natural en los camarones silvestres y de cultivo (86) y se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural están suprimidos (9). Ellos están usualmente asociados con múltiples agentes etiológicos. Sin embargo, algunas especies de *Vibrio*, o cepas de ciertas especies, han sido identificadas como patógenos primarios (69, 50 y 16). Las cepas patogénicas de *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* han causado epidemias masivas en Tailandia (65) y Filipinas (50). *V. harveyi* luminiscente parece liberar exotoxinas (56) y puede causar del 80 – 100% de mortalidad en los hatcheries de *P. monodon* (37). *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. nereis*, *V. cholerae* y *V. splendidus* han sido asociados con brotes de enfermedades en camarones (13, 50, 22 y 79). La relación entre la luminiscencia y la toxicidad de *Vibrio carchariae* es camarones fue investigado por Tatsuya Nakayama en el 2005 (92).

Se presentan cinco tipos de enfermedades: necrosis de la cola, enfermedad de la concha, enfermedad roja, síndrome de la concha suelta (LSS) y enfermedad de intestino blanco (WGD) por la presencia de *Vibrio* spp. en *P. monodon* de los estanques de cultivo en la costa de Andhra Pradesh (India). Entre estos, LSS, WGD y la enfermedad roja causan mortalidades masivas en los estanques de

cultivo de camarón. Seis especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *V. splendidus*) están asociadas con las enfermedades del camarón (41). La distribución y composición de especies de bacterias luminosas en los hatcheries comerciales de camarones penaeideos fueron estudiadas (43). La observación sobre la presencia de *V. harveyi* (97.30%) y *V. orientalis* (2.70%) en el contenido de los intestinos de los camarones evidencian que la fuente primaria de estas bacterias en un laboratorio de camarón fue la materia fecal del stock de reproductores, posiblemente durante el desove.

Signos Clínicos

Las mortalidades debido a la vibriosis se presentan cuando los camarones están estresados por factores como: Pobre calidad del agua, elevadas densidades, alta temperatura del agua, baja concentración del oxígeno disuelto y una baja tasa de recambio de agua (51, 55 y 9). Las mayores mortalidades usualmente se presentan en las postlarvas y camarones jóvenes. Las larvas de *P. monodon* sufren de mortalidades dentro de las 48 horas de una inmersión de desafío con cepa de *V. harveyi* y *V. splendidus* (50). Las mortalidades relacionadas con la vibriosis han sido reportados en *P. monodon* de talla comercial (2). Los

camarones adultos que sufren de vibriosis pueden parecer hipóxico, mostrando un enrojecimiento del cuerpo con branquias rojas o marrones, reduce la alimentación y puede ser observado nadando letárgicamente en el borde y la superficie de los estanques (2 y 65). *Vibrio* spp. causa la enfermedad de los apéndices rojos, caracterizada por una coloración roja de los pleopodos, periopodos y branquias, en camarones juveniles y adultos, y pueden causar una mortalidad de hasta 95% durante la estación cálida (13). La enfermedad de la necrosis ocular es causada por *V. cholerae*. Los globos oculares de los camarones infectados se vuelven marrón y se caen, la mortalidad se presenta en pocos días (13).

Seis especies de *Vibrio*, incluido *V. harveyi* y *V. splendidus* causan luminiscencia, el cual es visible durante la noche, en las postlarvas, juveniles y adultos infectados (77 y 52). Las postlarvas infectadas pueden exhibir una mortalidad reducida, reducido fototaxismo e intestinos vacíos (13).

Patología gruesa

Los camarones que sufren de vibriosis pueden presentar lesiones localizadas de la cutícula que son típicas de la enfermedad bacteriana de la caparazón, las

infecciones localizadas en las heridas, perdidas de miembros, musculatura blanda, infección localizada en el intestino o hepatopáncreas y/o septicemia general (52). Las lesiones de la enfermedad bacterial del caparazón son marrones o negras y aparecen en la cutícula del cuerpo, apéndices y branquias (86).

Las postlarvas pueden presentar un hepatopáncreas turbio (91). Las branquias frecuentemente tienen un color marrón (2). La septicemia hepatopancreatitis está caracterizada por la atrofia del hepatopáncreas con necrosis multifocal e inflamación haemocítica.

El contenido de altas cantidades de *V. parahaemolyticus* o *V. harveyi* induce a la unión y separación de las células epiteliales de la lámina basal del MGT. Las células epiteliales separadas no se presentan cuando hay bacterias no patogénicas (probióticos) (13 y 31).

Patógenos como el *Vibrio* spp., que causan la separación del epitelio en el MGT, pueden generar una alta mortalidad en camarones, mediante la eliminación de dos capas que protegen al camarón de las infecciones: el epitelio y la membrana peritrofica que secreta. En adición, la pérdida del epitelio puede afectar la

regulación de agua y asimilación de iones en el cuerpo (63 y 66).

Histopatología

La vibriosis sistémica típicamente resulta en la formación de nódulos sépticos haemocíticos en el órgano linfóideo, corazón y tejidos conectivos de las branquias, hepatopáncreas, glándula de la antena, nervios, telson y músculo (2, 64 y 44). Los hepatopáncreas infectados pueden aparecer con pocas vacuolas, indicando bajas reservas de lípidos y glicógeno (2). La vibriosis en *P. monodon* está asociado con la formación de “esferoides” en el órgano linfóideo (65).

Diagnóstico

El diagnóstico de la infección de vibrio se basa en los signos clínicos y la demostración histológica de la bacteria *Vibrio* en forma de varilla en las lesiones, nódulos o hemolinfa. Los órganos internos y hemolinfa pueden ser estrujados en un medio de agar marino general o selectivo para *Vibrio* (TCBS). Cuando se investiga en postlarvas, todo el animal puede ser aplastado y rayado en una

placa de agar. Las colonias luminiscentes pueden ser observadas después de 12 a 18 horas si se incuban a una temperatura de 25 a 30 °C.

El vibrio aislado puede ser identificado por varios métodos, se incluyen la tinción Gram, motilidad, una prueba de oxidasa, modo de utilización de la glucosa, crecimiento en la presencia de NaCl, reducción del nitrato y luminiscencia. Las especies vibrio pueden ser identificadas rápidamente en el campo usando el sistema API-20 NF el cual incluye el cultivo de colonias vibrio en un API-NFT y cuentan las colonias de acuerdo a las direcciones del kit (53). Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana pueden ser usadas para identificar la vibriosis y pueden implementarse usando el método del disco Kirby-Bauer (DIFCO, 1986) o el método de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) (53).

Transmisión

Las especies vibrio existen en el agua usada en las instalaciones de cultivo de camarón (50) y el biofilm, el cual se forma en diferentes estructuras que están en contacto con el agua de laboratorio y camaroneras. La bacteria ingresa al camarón vía las heridas o grietas en la cutícula y son ingeridas con el alimento

(71 y 50). La principal fuente de *V. harveyi* en laboratorios parece ser el contenido del intestino medio de las hembras en el grupo de reproductores, las cuales están mudando durante el desove (50).

2.3. Mecanismos de defensa en microorganismos a los ácidos.

Las bacterias experimentan diferentes tipos de “estrés” en su vida diaria, a los cuales deben adaptarse. Por ejemplo, una bacteria entérica tendrá que sobrevivir al pH extremadamente bajo del estómago y a la acción antibacteriana de los ácidos grasos de cadena corta presentes en el intestino. Un patógeno intracelular, como *Salmonella*, tendrá además que tolerar episodios de bajo pH cuando se encuentre en el interior del fago-lisosoma del macrófago.

El fenómeno de tolerancia inducida a estrés ácido fue descubierto inicialmente en *Escherichia* y *Salmonella*, pero se ha generalizado después a muchas otras bacterias Gram (-) y Gram (+). El hecho fundamental de este mecanismo de adaptación estriba en que el crecimiento a un pH moderadamente ácido induce la síntesis de proteínas específicas, las cuales protegen a las células a pH extremadamente ácidos. Existen diferentes sistemas implicados, dependiendo de la fase de crecimiento, medio de cultivo y tipo de estrés ácido

(88). Tal como podía esperarse, la respuesta a los ácidos inorgánicos (efecto de pH) es distinta e independiente de la desencadenada por ácidos orgánicos (efecto de la forma no disociada).

Nuestro conocimiento de los mecanismos de adaptación a estrés ácido es aún muy incompleto, aunque ha habido un considerable progreso en los últimos años en las enterobacteriáceas. La disminución del pH extracelular acaba provocando una disminución del pH intracelular. Esto es debido a la difusión pasiva de los protones, a pesar de que la membrana plasmática de la célula es bastante impermeable a estas moléculas. La caída del pH intracelular activa la expresión de genes que codifican descarboxilasas de aminoácidos y estas enzimas pueden elevar el pH interno, porque catalizan reacciones en las que se consumen protones. Se han descrito 3 reacciones de descarboxilación asociadas a este fenómeno: el paso de glutamato a GABA, el de arginina a agmatina y el de lisina a cadaverina. En todos los casos se consume un protón por cada molécula de aminoácido. Los nuevos productos así formados se intercambian por un nuevo sustrato mediante mecanismos de tipo anti-porte. Naturalmente, este mecanismo resulta caro para la célula desde el punto de vista energético.

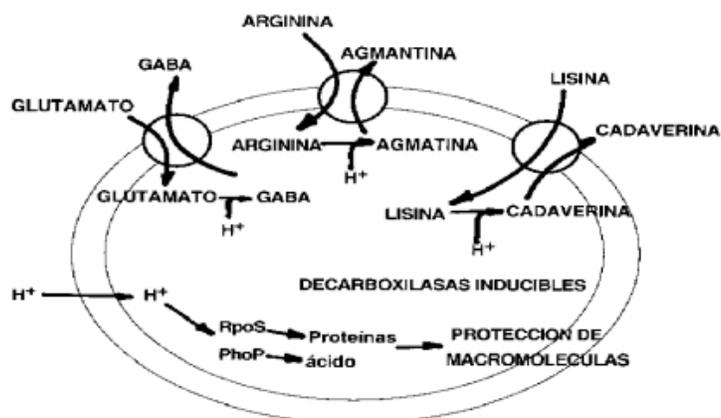


Figura 11.-Reacciones de decarboxilación de aminoácidos asociadas al estrés ácido (P. Rodríguez Valenzuela)

Además, la disminución del pH interno produce la acumulación de dos importantes proteínas reguladoras: RpoS y PhoP. Estos reguladores controlan distintos conjuntos de genes que están implicados en la protección y reparación de macromoléculas. Asimismo, en *Salmonella typhimurium* se ha descrito un mecanismo fisiológico de adaptación a la acción antimicrobiana de ácidos grasos de cadena corta y esta resistencia inducida se ve reforzada en condiciones de anaerobiosis, pH ácido y exposición prolongada a dichos ácidos (49).

2.4. Método para determinar la eficiencia de un antimicrobiano: Concentración mínima inhibitoria.

La Concentración mínima inhibitoria (MIC), en microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.

Las concentraciones mínimas inhibitorias pueden ser determinadas mediante métodos de microdilución en caldo, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards), BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Existen otros métodos basados en la difusión en agar, tales como difusión de discos, y tiras de Etest. Las tiras de Etest son un método cuantitativo de difusión en agar comercializado por AB Biodisk, Solna, Sweden. Consiste en unas tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano.

Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antimicrobiano difunde en el medio, y tras la incubación, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento.

En medicina, la concentración mínima inhibitoria no sólo se usa para determinar la concentración de antimicrobiano que recibirá el paciente sino también el tipo de antimicrobianos a utilizar, lo que a su vez reduce la oportunidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos.

CAPÍTULO III.- Materiales y Métodos.

En base a los resultados alentadores de las diferentes pruebas llevadas a cabo con el uso de ácidos orgánicos en diferentes especies animales, se decidió realizar el estudio en la camaronera del Sr Luis Encalada, ubicada en la zona de Cien Familias, Balao Chico, Guayas; buscando mejorar los resultados obtenidos con diferentes protocolos de manejo anteriores.

El manejo técnico estaba a cargo del Ing. Marco Noblecilla, siguiendo un protocolo ya establecido por la gerencia, el cual consistía principalmente del uso de antibióticos cuando se presentaban los síntomas de enfermedades.

El objetivo era comparar los resultados tanto en verano como en invierno con el uso de ácidos orgánicos y el protocolo anterior, para ello se escogieron 6 piscinas al azar para cada estación: 3 de prueba y 3 de control (Tabla 4);

procurando que no haya mucha diferencia con las áreas, fechas y densidades de siembra para verano (Tabla V) e invierno (Tabla VI).

Tabla IV: Diseño experimental del ensayo

CONTROL	PRUEBA
Pisc. 7B Protocolo Normal	Pisc. 5B Ácido orgánico
Pisc. 10 B Protocolo Normal	Pisc. 9B Ácido orgánico
Pisc. 8B Protocolo Normal	Pisc. 6B Ácido orgánico

Fuente: Investigación realizada

Tabla V: Áreas de las piscinas seleccionadas y sus tratamientos en verano.

	PISCINAS	AREA (Ha.)	FECHA DE SIEMBRA	DENSIDAD DE SIEMBRA (Pl/Ha.)	DÍAS DE CULTIVO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
CONTROL	7B	11,7	2011-08-09	100.000	106	PI 12	13,20
	10B	10,5	2011-08-11	100.000	107	PI 12	12,50
	8B	9,2	2011-08-30	100.000	110	PI 12	16,00
PROMEDIOS		10,47		100000,00	108		13,90
TRATAMIENTO	5B	13,4	2011-08-25	100.000	111	PI 12	17,00
	9B	8,95	2011-09-08	100.000	106	PI 12	12,10
	6B	8,77	2011-09-08	100.000	110	PI 12	13,30
PROMEDIOS		10,37		100000,00	109		14,13

Fuente: Investigación realizada

Tabla VI: Áreas de las piscinas seleccionadas y sus tratamientos en invierno

	PISCINAS	AREA (Ha.)	FECHA DE SIEMBRA	DENSIDAD DE SIEMBRA (Pl/Ha.)	DÍAS DE CULTIVO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
CONTROL	7B	11,7	2012-01-17	100.000	109	PI 12	14,30
	10B	10,5	2012-01-15	100.000	104	PI 12	11,50
	8B	9,2	2012-01-22	100.000	102	PI 12	14,00
PROMEDIOS		10,47		100000,00	105		13,27
TRATAMIENTO	5B	13,4	2012-01-25	100.000	101	PI 12	11,80
	9B	8,95	2012-01-28	100.000	110	PI 12	15,00
	6B	8,77	2012-01-15	100.000	108	PI 12	17,00
PROMEDIOS		10,37		100000,00	106		14,60

Fuente: Investigación realizada

El ácido orgánico se iba aplicar en campo directamente al alimento balanceado, no al agua por ser muy costoso.

La composición del ácido orgánico en estudio es: ácido cítrico (33.3%), ácido fumárico (33.3%) y ácido láctico (33.3%). Fuente (NEPROPAC S.A)

3.1. Descripción de la concentración mínima inhibitoria in vitro (MIC).

Para determinar la cantidad de ácido orgánico a aplicar en el alimento, se realizó el MIC en laboratorio, utilizando las cepas de bacterias que más afectan al camarón y ocasionan mortalidades.

A continuación detallamos los pasos para realizar dicha prueba (Fuente: CSA)

Recuperación de Cepas bacterianas

Se descongelan las bacterias que están guardadas en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se raya en placas de TSA, en el caso de que las bacterias se encuentren en stock o se realiza purificación de las colonias bacterianas a partir de cultivos realizados con anterioridad.

Preparación de soluciones stock de antibióticos

Los antibióticos usados en su mayoría son los que se encuentran disponibles en el mercado, en este caso se uso el ácido orgánico en estudio. Las concentraciones usadas para los antibióticos están dentro de los rangos que se usan comúnmente en rutinas de prevención y control, pero también se utilizan concentraciones requeridas. Para realizar los cálculos usamos la siguiente

fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Por lo general iniciamos con una concentración de 10,000 ppm a partir de la cual obtenemos las diversas concentraciones .

Siembra en microplacas

a.-Preparación de suspensión bacteriana.

Utilizamos un sustituto del standar de McFarland en el podemos utilizar 6ul de leche de magnesia en 5 ml de agua destilada para obtener la concentración bacteriana requerida, la cual se obtiene tomando colonias aisladas y repicandolos en 5 ml de solución salina, esta solución la comparamos siempre con la turbidez obtenida en el McFarland

b.- Depósito de bacterias y ácido

Colocamos en los pozos 200ul de control (ácido sin bacteria) y en los siguientes, se colocan las diluciones del ácido a las diversas concentraciones 200ul/pozo, más 20ul del inculo.

Se deja incubar a 24 °C, y se hacen lecturas de turbidez a partir de las 18 horas de crecimiento aproximadamente.

Determinación de Bactericida o bacteriostático

Después de la lectura realizamos un rayado en placas de TSA de las diversas concentraciones donde no se obtuvo turbidez para determinar si el antibiótico funciona como bactericida o bacteriostático

3.2. Implementación del protocolo de trabajo.

Dosis

Preliminarmente el 29 de julio del 2011, se envió muestra del ácido orgánico al CSA, para realizar el MIC frente a 4 cepas patógenas: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Pseudomona auriginosa*. Se utilizaron varias concentraciones del ácido: 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000,

19000, 20000 y 21000 ppm; en ninguna de ellas hubo crecimiento bacteriano. (Anexo 1)

A causa de que con estos resultados no se encontró la concentración mínima inhibitoria, posteriormente se realizó otro análisis el 5 de agosto del 2011, utilizando concentraciones más bajas, frente a las dos cepas más patógenas: *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomona auriginosa*. Se usaron: 200, 500, 1000, 1500, 1800, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000 ppm. Como vemos a 200 y 500 ppm hubo presencia de *Pseudomona auriginosa*; pero a partir 1000 ppm no hubo crecimiento bacteriano. (Anexo 2).

Con este estudio la Concentración Mínima Inhibitoria, es de 1000 ppm, esto equivale a 1 g de ácido/ Kg de alimento. Cabe recalcar que estos resultados son in vitro y que en la práctica siempre hay pérdidas por lixiviación, manipuleo, transporte, etc.; por eso la dosis utilizada en este estudio fue de 10 veces más de lo que indicó el análisis, o sea 10 g de ácido/ kg de alimento durante todo el ciclo de cultivo.

Correcta aplicación

La aplicación correcta tiene que ver con la mezcla homogénea del alimento, con el fin que en todos los pellets se adhiera el ácido y de esa manera toda la población de camarones reciba la medicación adecuada. Así mismo una vez adherido el producto en el alimento para que no se pierda rápidamente al hacer contacto con el agua, se utilizó un pegante comercial a base de alginatos a una dosis de 1.5 g/kg de alimento. La mezcla del alimento con el ácido se realizó en la camaronera de la siguiente manera: (Anexos 3-4-5 y 6)

1. Colocar la cantidad de alimento a aplicar en tinas rectangulares
2. Pesar la cantidad de ácido necesario para dosificar 10 g/kg de alimento
3. Disolver el ácido en agua, a razón de 3 lt/saco de alimento de 40 Kg.
4. Verter la solución ácido-agua homogéneamente sobre el alimento.
5. Mezclar rigurosamente el alimento.
6. Pesar la cantidad de pegante necesario para dosificar 1.5 g/kg de alimento
7. Disolver el pegante en agua, a razón de 2 lt/saco de alimento de 40 Kg

8. Verter la solución pegante-agua homogéneamente sobre el alimento.
9. Mezclar rigurosamente el alimento.
10. Colocar el alimento en sacos.
11. Transporte a las piscinas destino.

En camaroneras más tecnificadas se utilizan máquinas mezcladoras de alimento, con la cual se suprime el paso 5 y 9, y se obtiene una mezcla más homogénea. (Anexos 8-9 y 10)

Actualmente muchas plantas procesadoras de alimento balanceado venden alimentos funcionales, en los cuales vienen incluidos ácidos orgánicos, probióticos, nucleótidos, etc.; la cual sería una opción a futuro a tomar en cuenta más que todo porque se ahorra mano de obra.

A parte de la mezcla homogénea del ácido en alimento, un factor importante es la dosificación del alimento balanceado, porque un mal cálculo puede comprometer la producción. En esta camaronera para estimar la cantidad de alimento a suministrar se usaban 2 variables: Una es la utilización de comederos testigos a razón de 4 com/Ha. y chequeando

su consumo a las 3 horas de haber aplicado las raciones indicadas en ellos.
(Anexo 11).

Otra es guiándose con una tabla de alimentación ajustada para la camaronera de acuerdo a su experiencia. (Anexo 12)

Utilizando estas 2 herramientas es como se ajustó la cantidad de alimento a suministrar en las piscinas diariamente.

CAPÍTULO IV.- RESULTADOS

Resultados

Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos de las piscinas se mantuvieron en valores normales dentro del ciclo de cultivo tanto en verano (Tabla VII), como en invierno (Tabla VIII)

Tabla VII: Principales parámetros Físico-Químicos registrados en verano.

CONTROL			
PARAMETRO	Prom.	Max	Min
OD (mg/lt)	4,25	7,10	3,01
Temp.(°C)	26,2	27,1	26,0
Turbidez (cm)	40	50	30
Salinidad (ppt)	22	28	18

TRATAMIENTO			
PARAMETRO	Prom.	Max	Min
OD (mg/lt)	4,18	7,20	3,03
Temp.(°C)	26,3	27,0	26,0
Turbidez (cm)	35	45	30
Salinidad (ppt)	22	28	18

Fuente: Investigación realizada

Tabla VIII: Principales parámetros Físico-Químicos registrados en invierno.

CONTROL			
PARAMETRO	Prom.	Max	Min
OD (mg/lt)	4,25	8,60	7,20
Temp.(°C)	28,1	29,2	27,3
Turbidez (cm)	30	35	25
Salinidad (ppt)	12	15	10

TRATAMIENTO			
PARAMETRO	Prom.	Max	Min
OD (mg/lt)	4,29	8,50	7,40
Temp.(°C)	28,2	29,1	27,2
Turbidez (cm)	35	40	25
Salinidad (ppt)	12	15	10

Fuente: Investigación realizada

Datos de Producción

Los resultados tanto para el control como para el tratamiento se evaluaron por estaciones y son los siguientes:

Datos de Verano

Tabla IX: Datos de producción en verano

Ps	Peso cosecha	Lbs totales	Lbs/Ha	% Superv	FCA	Observación
5B	11,84	21140	1577	60,0	1,20	10 g/Kg Acido
9B	15,00	19550	2100	63,5	1,25	10 g/Kg Acido
6B	17,00	17600	2085	56,0	1,20	10 g/Kg Acido
7B	14,30	13625	1363	41,2	1,40	Protocolo normal
10B	11,46	20000	1709	67,7	1,20	Protocolo normal
8B	14,00	10147	1140	43,0	1,30	Protocolo normal

Fuente: Investigación realizada

Análisis de Rendimiento en verano:

El rendimiento es la cantidad producida por unidad de cultivo, en este caso lo evaluamos como libras por Ha. El Gráfico 1 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla X) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

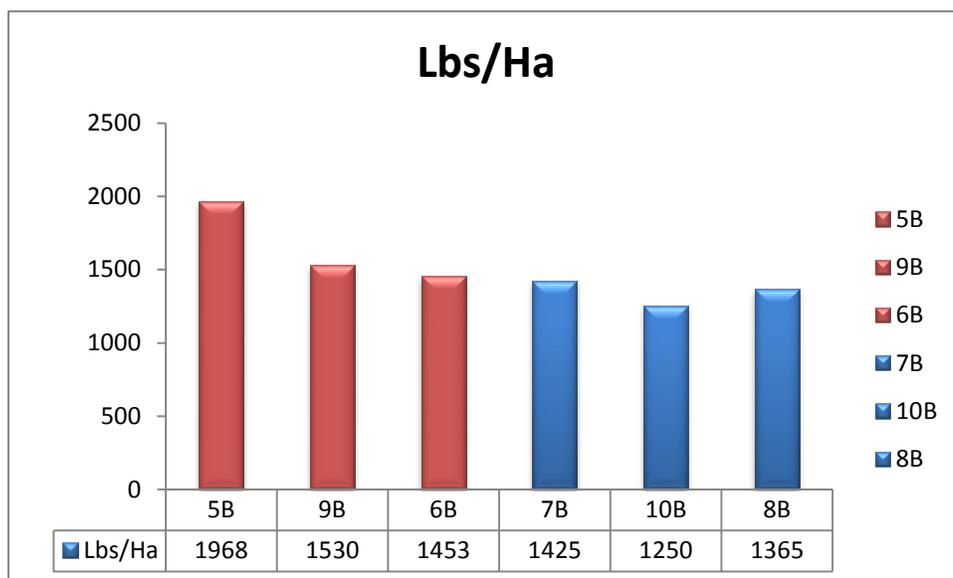
Tabla X: Análisis de ANOVA para el rendimiento en verano

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	4040	1347	7908
Tratamiento	3	4951	1650	77166

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	138320,17	1	138320,17	3,25	0,15	7,71
Dentro de los grupos	170149,33	4	42537,33			
Total	308469,50	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 1.- Libras por Ha producidas en verano (rojo: tratamiento y azul: control)



Fuente: Investigación realizada

Análisis de la Supervivencia en verano:

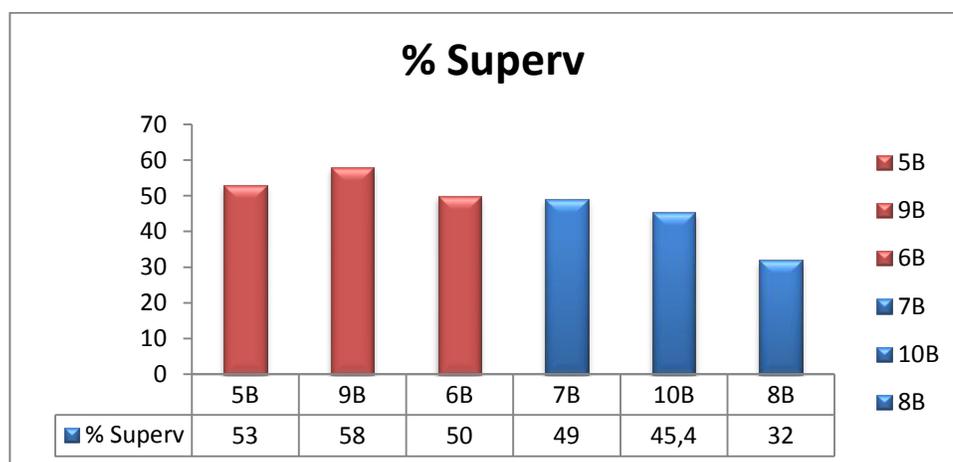
El Gráfico 2 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XI) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

Tabla XI: Análisis de ANOVA para la supervivencia en verano

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	151,9	50,63	219,26
Tratamiento	3	179,5	59,83	14,08

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	126,96	1,00	126,96	1,09	0,36	7,71
Dentro de los grupos	466,69	4,00	116,67			
Total	593,65	5,00				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 2.- % de supervivencia en verano (rojo: tratamiento y azul: control)

Fuente: Investigación realizada

Análisis de la Conversión Alimenticia en verano:

El Gráfico 3 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XII) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

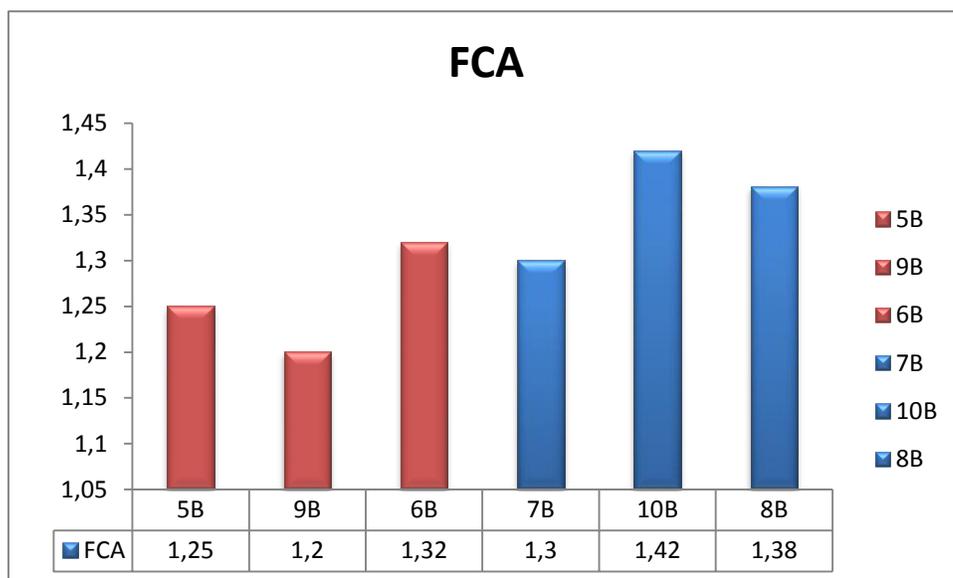
Tabla XII: Análisis de ANOVA para la conversión alimenticia en verano

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	4,10	1,37	0,00
Tratamiento	3	3,77	1,26	0,00

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,02	1	0,02	4,93	0,09	7,71
Dentro de los grupos	0,01	4	0,00			
Total	0,03	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 3.- Factor de conversión alimenticia en verano (rojo: tratamiento y azul: control)



Fuente: Investigación realizada

Análisis del Peso promedio en verano:

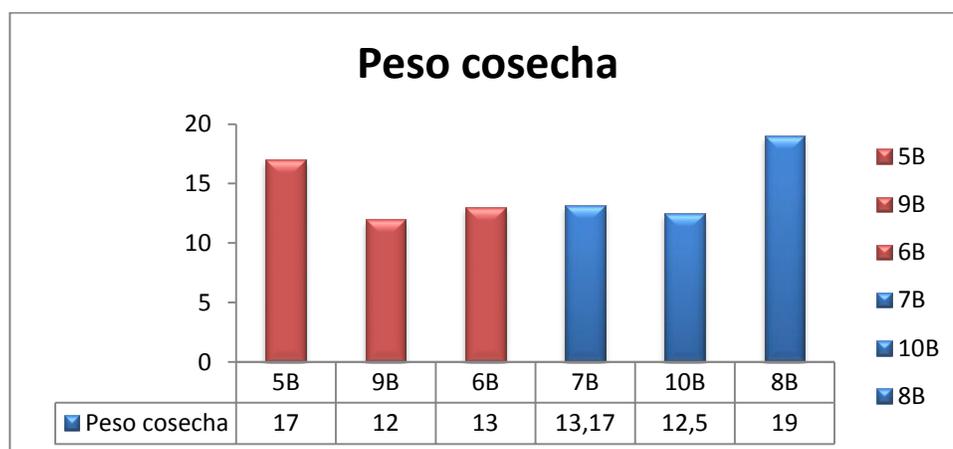
El Gráfico 4 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XIII) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

Tabla XIII: Análisis de ANOVA para el peso promedio en verano

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	3	39,8	13,27	2,4
Tratamiento	3	43,8	14,60	6,9

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,67	1	2,67	0,58	0,49	7,71
Dentro de los grupos	18,49	4	4,62			
Total	21,15	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 4.- Peso de cosecha en verano (rojo: tratamiento y azul: control)

Fuente: Investigación realizada

Datos de Invierno

Tabla XIV: Datos de producción en invierno

Ps	Peso cosecha	Lbs totales	Lbs/Ha	% Superv	FCA	Observación
5B	17	26370	1968	53	1,25	10 g/Kg acido
9B	12	13700	1530	58	1,2	10 g/Kg acido
6B	13	12585	1453	50	1,32	10 g/Kg acido
7B	13,17	16675	1425	49	1,3	Protocolo Normal
10B	12,5	13125	1250	45,4	1,42	Protocolo Normal
8B	19	12565	1365	32	1,38	Protocolo Normal

Fuente: Investigación realizada

Análisis de Rendimiento en invierno:

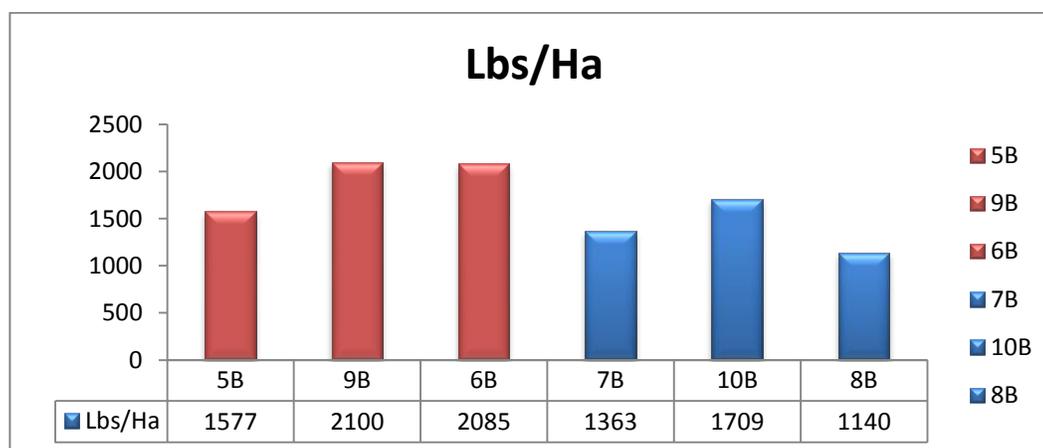
El Gráfico 5 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XV) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

Tabla XV: Análisis de ANOVA para el rendimiento en invierno

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	4212	1404	82201
Columna 2	3	5762	1920,67	88636,33

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	400416,7	1	400416,67	4,69	0,10	7,71
Dentro de los grupos	341674,7	4	85418,67			
Total	742091,3	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 5.-Libras por Ha producidas en invierno (rojo: tratamiento y azul: control)

Fuente: Investigación realizada

Análisis de la supervivencia en invierno:

El Gráfico 6 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XVI) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

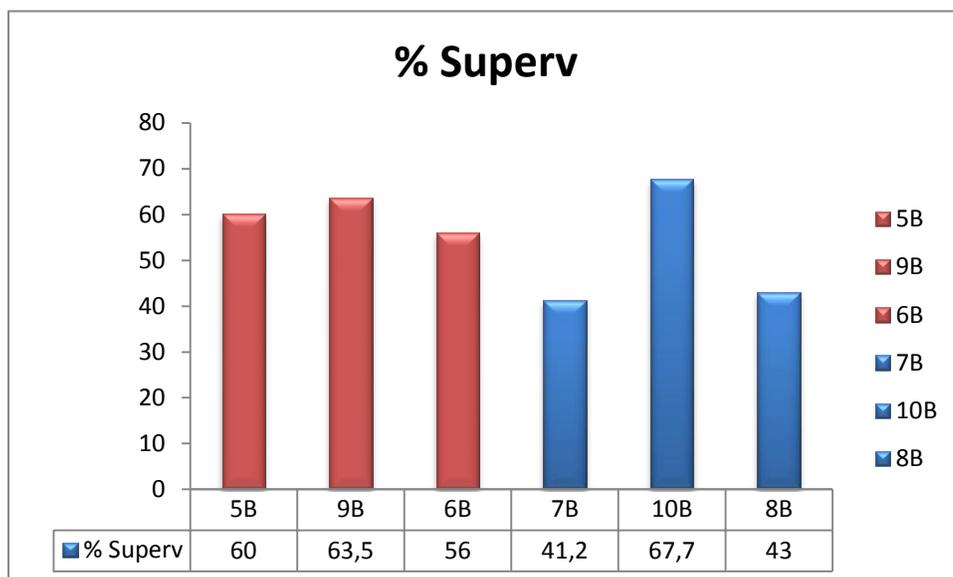
Tabla XVI: Análisis de ANOVA para la supervivencia en invierno

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	151,90	50,63	219,26
Columna 2	3	179,50	59,83	14,08

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	126,96	1	126,96	1,09	0,36	7,71
Dentro de los grupos	466,69	4	116,67			
Total	593,65	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 6.- % de supervivencia en invierno (rojo: tratamiento y azul: control)



Fuente: Investigación realizada

Análisis de la Conversión alimenticia en invierno:

El Gráfico 7 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XVII) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

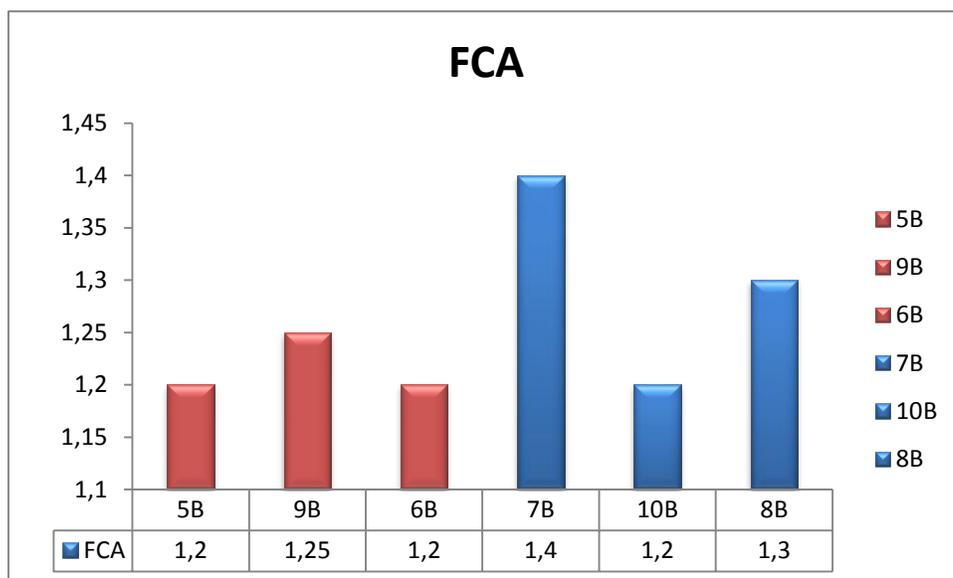
Tabla XVII: Análisis de ANOVA para la conversión alimenticia en invierno

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	3,90	1,30	0,01
Columna 2	3	3,65	1,22	0,00

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,01	1	0,01	1,92	0,24	7,71
Dentro de los grupos	0,02	4	0,01			
Total	0,03	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 7.-Factor de conversión alimenticia en invierno (rojo: tratamiento y azul: control)



Fuente: Investigación realizada

Análisis del Peso promedio en invierno:

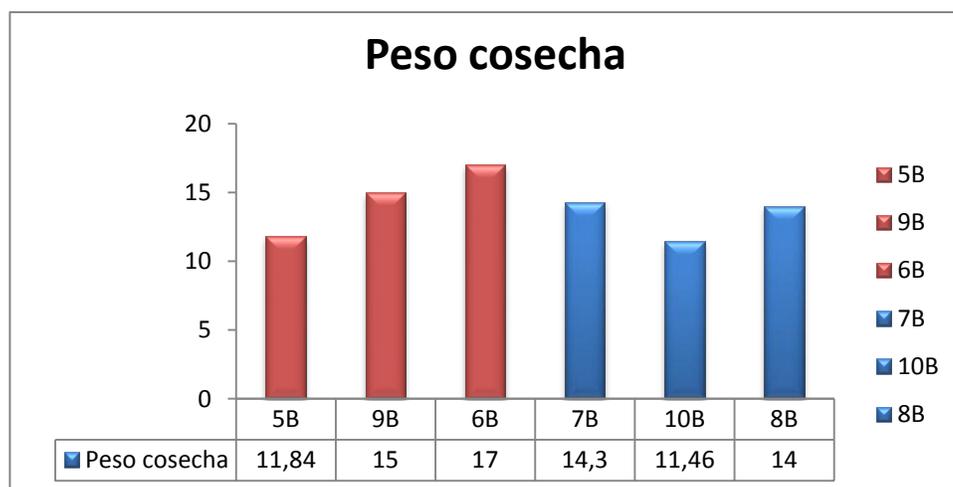
El Gráfico 8 nos ilustra las diferencias entre el control y tratamiento con sus réplicas y según el análisis de ANOVA (Tabla XVIII) si hay una diferencia significativa ($P = 0.05$) entre ellos.

Tabla XVIII: Análisis de ANOVA para el Peso promedio en invierno

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	39,76	13,25	2,43
Columna 2	3	43,84	14,61	6,77

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,77	1	2,77	0,60	0,48	7,71
Dentro de los grupos	18,41	4	4,60			
Total	21,18	5				

Fuente: Investigación realizada

Gráfico 8.- Peso de cosecha en invierno (rojo: tratamiento y azul: control)

Fuente: Investigación realizada

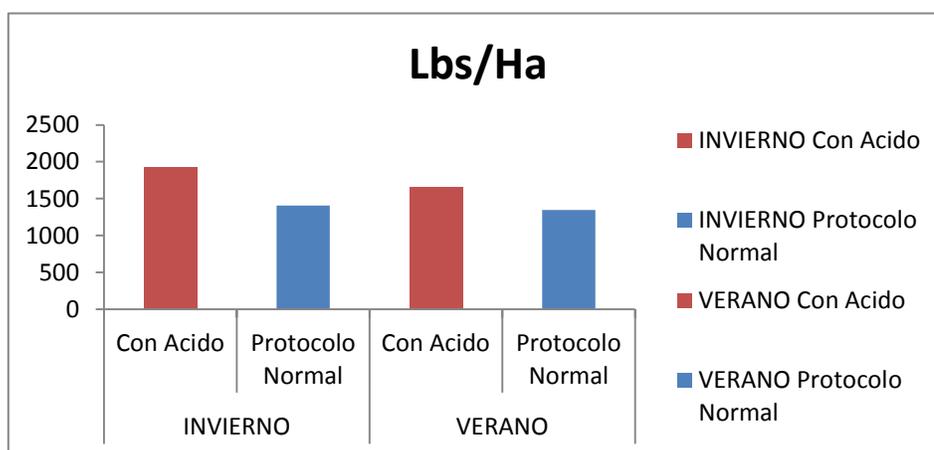
PROMEDIO DE RESULTADOS DE INVIERNO Y VERANO

Tabla XIX: Datos promedios de Producción

	INVIERNO		VERANO	
	Tratamiento	Control	Tratamiento	Control
Lbs/Ha	1920	1404	1650	1347
% Superv	59,8	50,6	53,7	42,1
Peso cosecha	14,6	13,3	14,0	14,9
FCA	1,22	1,30	1,26	1,37
Días	106	104	113	112

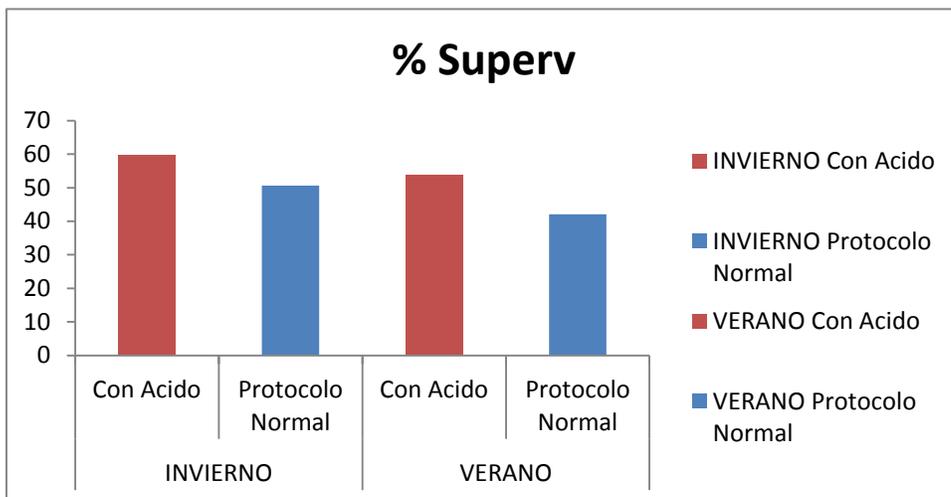
Fuente: Investigación realizada

Gráfico 9.- Promedio de libras por Ha producidas en las 2 estaciones (rojo: tratamiento y azul: control)



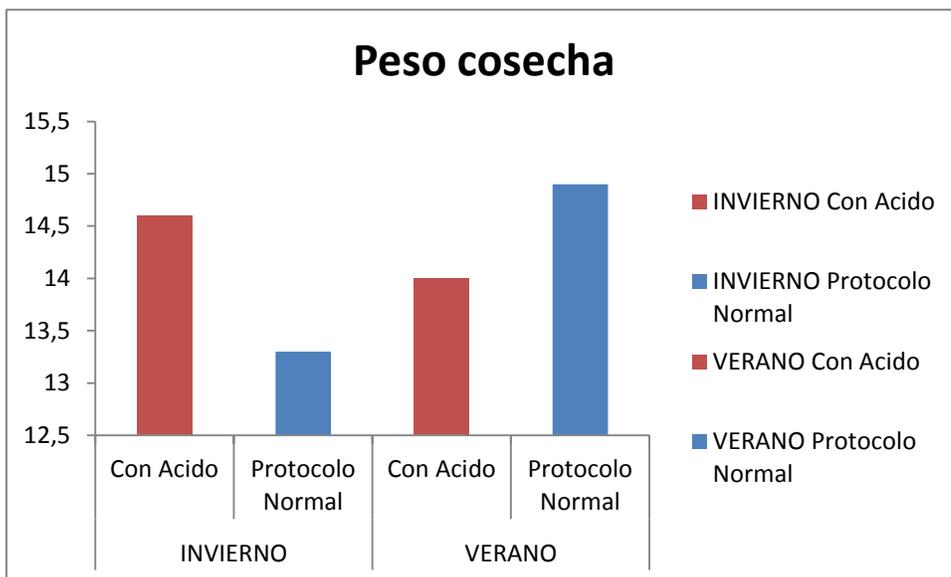
Fuente: Investigación realizada

Gráfico 10.- Promedio de % de Supervivencia en las 2 estaciones (rojo: tratamiento y azul: control)



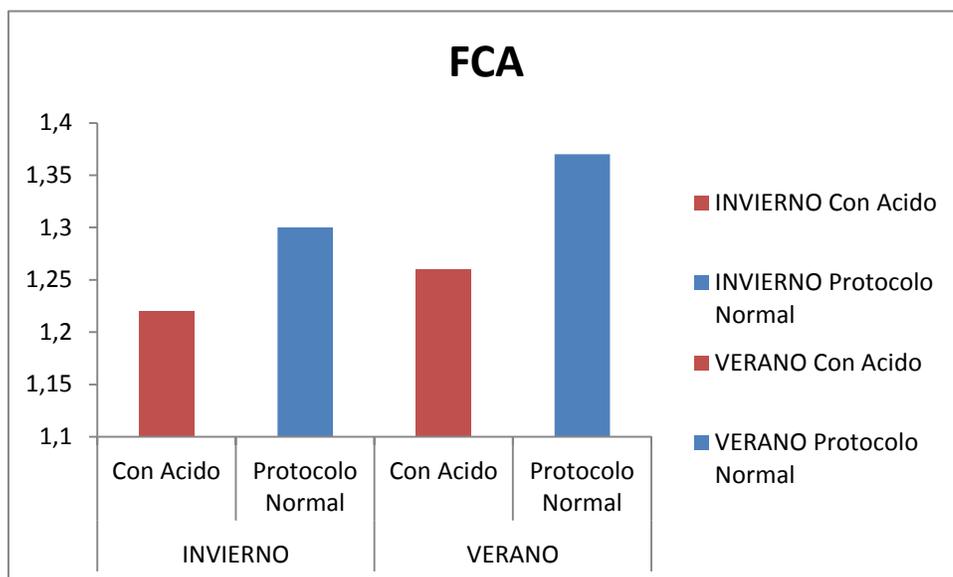
Fuente: Investigación realizada

Gráfico 11.- Promedio de peso de cosecha para las 2 estaciones (rojo: tratamiento y azul: control)



Fuente: Investigación realizada

Gráfico 12.- Promedio de Factor de conversión alimenticia para las dos estaciones (rojo: tratamiento y azul: control)



Fuente: Investigación realizada

Análisis Costo/Beneficio del Estudio

Para la evaluación del Costo-Beneficio del Tratamiento sólo se va a considerar el costo del alimento balanceado y del tratamiento con ácido orgánico; tanto en verano como en invierno. (Tabla 20)

Tabla XX: Evaluación costo/beneficio usando ácido orgánico.

	VERANO		INVIERNO	
	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento
PARAMETROS				
Producción por Ha (Lbs/Ha)	1347	1650	1404	1920
Peso promedio	14,9	14	13,3	14,6
Precio por libra	2,11	2,11	1,98	2,11
Ingresos totales (US\$)	2842	3482	2780	4051
Conversión Alimenticia	1,37	1,26	1,3	1,22
Consumo de Alimento (Kg/Ha)	1845	2079	1825	2342
Costo del Balanceado (US\$/Kg)	0,7	0,7	0,7	0,7
Costo del tratamiento (US\$/Kg)	0	0,07	0	0,07
Costo Total del Balanceado (US\$/Ha)	1292	1455	1278	1640
Costo Total del Tratamiento (US\$/Ha)	0	146	0	164
COSTO TOTAL (US\$/Ha)	1292	1601	1278	1804
UTILIDAD (US\$/Ha)	1550	1881	1502	2248
UTILIDAD ADICIONAL (US\$)		330		745
RELACIÓN				
UTILIDAD ADICIONAL/COSTO DE TRATAMIENTO		2,27		4,55

Fuente: Investigación realizada

CONCLUSIONES

Analizando estadísticamente los resultados podemos concluir que la administración de ácidos orgánicos en el alimento mejoró significativamente la producción en la camaronera en los siguientes parámetros:

- Incremento significativo del Peso de Cosecha tanto en verano como en invierno.
- Mejoría significativa en la Conversión alimenticia para las dos estaciones.
- Incremento significativo de la Supervivencia en invierno y en verano.
- Como consecuencia hubo un incremento significativo del Rendimiento o sea de las libras de camarón cosechas para las dos estaciones.

Adicionalmente haciendo el análisis costo/beneficio, la utilidad es de 2.27 y 4.55 veces más que el costo del tratamiento para invierno y verano respectivamente.

En términos generales es una buena alternativa de manejo, la utilización de ácidos orgánicos en el alimento y lo más importante es que es un producto eco-amigable que no ocasionará en el futuro efectos colaterales negativos en el cultivo de camarón.

RECOMENDACIONES

Podemos enumerar las siguientes recomendaciones:

- Como alternativa de manejo para bajar los costos hay que analizar la utilización de ácidos orgánicos no en todo el ciclo sino en etapas críticas del camarón, como por ejemplo: períodos de muda, eventos de enfermedad.
- La dosis utilizada si bien es 10 veces más alta que lo que indicó el MIC, por la pérdidas; está puede ser menor si se mejoran las técnicas de mezcla del alimento o si se lo hace directamente en las plantas procesadoras de alimento balanceado.
- La utilización de otros tipos de ácidos orgánicos, especialmente de cadena corta podría dar resultados diferentes.

- La dosis de ácido orgánico podría cambiar en el espacio y en el tiempo, por la variabilidad de parámetros físicos, químicos y bacteriológicos. Por eso es importante realizar análisis de MIC frecuentemente para ajustar el tipo y la cantidad de ácidos orgánicos a utilizar.

Se recomienda realizar este tipo de estudio en otras fases de cultivo del camarón tales como: maduración, larvicultura y raceways.

ANEXOS

Anexo 1: Concentración mínima inhibitoria realizada en el CSA.

www.espol.edu.ec

 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
DEL LITORAL
"Impulsando la Sociedad del Conocimiento"

INFORME DE ANALISIS IA -228-2011

1. Información general

SOLICITUD DE ANALISIS	UD-228-2011		
FECHA DEL INFORME	4 de Agosto de 2011		
Datos del cliente			
NOMBRE DEL CLIENTE	Ing. Bolívar Villón		
NOMBRE DE LA EMPRESA	Negocios y Productos del Pacifico NEPROPAC S.A.		
DIRECCIÓN	Urdenor II Mz 240 Solar 6 Oficina 1		
TELÉFONO	04-2382552		
Datos de la muestra			
TIPO DE MUESTRA	Acido orgánico		
DATOS DEL MUESTREO	Realizado por el cliente		
LUGAR DE MUESTREO			
FECHA DE MUESTREO			
FECHA/HORA DE RECEPCION DE LA MUESTRA	29 de Julio de 2011	Hora:	12h35
FECHA DE ENSAYO	Inicio 1 de Agosto de 2011	Fin:	4 de Agosto de 2011
CONDICIONES AMBIENTALES	Temperatura (°C) 21,5°C	Humedad (%)	46%HR
METODO	Concentración mínima inhibitoria (MIC)		

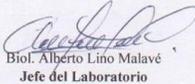
2. Resultados

Código Cliente: Acido Orgánico		Código CSA: CSA-1771-2011									
Cepas Bacteriana		Concentraciones en ppm									
		12000	13000	14000	15000	16000	17000	18000	19000	20000	21000
Crescitamento	Vibrios parahaemolyticus	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Vibrios vulnificus	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Vibrios harvey	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Pseudomonas auriginosa	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Observación: Los resultados del ensayos son obtenidos en base a las concentraciones sugeridas por el cliente
P: Positivo
N: Negativo

Resultados de Controles	
Controles Positivos (Agua de peptona + bacterias):	Positivos
Controles blanco (Concentraciones de Acido Orgánico sin bacterias):	Negativos
Control negativo (Agua de peptona sin bacterias):	Negativos


 Marcelo Muñoz Naranjo Ph. D.
 Director del laboratorio


 Biol. Alberto Liño Malavé
 Jefe del Laboratorio

Notas: 1. Los resultados solo se refieren a la muestra presentada al ensayo.
2. El presente informe no debe ser reproducido, excepto en forma total, sin la aprobación escrita del laboratorio.

Guayaquil: Campus "Gustavo Galindo Vº", Km. 30.5 Vía Perimetral, contiguo a la Cilla. Santa Cecilia • Castilla: 09-01-5863
 Fax: (593-4) 2854629 • Teléfonos: 2269269 - 2850341 - 2851094 - 2854482 - 2854550 - 2854518 - 2854486 - 2854501
 Campus "Las Peñas", Malecón 100 y Loja • Fax: (593-4) 2530283 • Teléfonos: 2530491 - 2530271
 Quito: Av. 6 de Diciembre N 33-55 y Av. Eloy Alfaro, Edif. Torre Blanca, Piso 2 • Castilla: 17-01-1076 • Telefaxes: (593-2) 2521408 - 2561199 - 2235150 - 2527986 - 2550618

F-PG5.10-03 Rev. 01 Página 1 de 1

Fuente: Investigación realizada

Anexo 2: Concentración mínima inhibitoria realizada en el CSA.

www.espol.edu.ec

 **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**
"Impulsando la Sociedad del Conocimiento"

INFORME DE ANALISIS IA -238-2011

1. Información general

SOLICITUD DE ANALISIS	UD-238-2011		
FECHA DEL INFORME	11 de Agosto de 2011		
Datos del cliente			
NOMBRE DEL CLIENTE	Ing. Bolívar Villón		
NOMBRE DE LA EMPRESA	Negocios y Productos del Pacifico NEPROPAC S.A.		
DIRECCIÓN	Urdenor II Mz 240 Solar 6 Oficina 1		
TELEFONO	04-2382552		
Datos de la muestra			
TIPO DE MUESTRA	Acido orgánico		
DATOS DEL MUESTREO	Realizado por el cliente		
LUGAR DE MUESTREO			
FECHA DE MUESTREO			
FECHA/HORA DE RECEPCION DE LA MUESTRA	5 de Agosto de 2011	Hora:	16h09
FECHA DE ENSAYO	Inicio	8 de Agosto de 2011	Fin: 11 de Agosto de 2011
CONDICIONES AMBIENTALES	Temperatura (°C)	22°C	Humedad (%) 48%HR
METODO	Concentración mínima inhibitoria (MIC)		

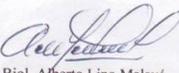
2. Resultados

Código Cliente: Acido Orgánico		Código CSA: CSA-1800-2011									
Cepas Bacteriana		Concentraciones en ppm									
		200	500	1000	1500	1800	2000	2500	3000	3500	4000
Crecimiento	Vibrios parahaemolyticus	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Pseudomonas auriginosa	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N

Observación: Los resultados de los ensayos son obtenidos en base a las concentraciones sugeridas por el cliente
P: Positivo
N: Negativo

Resultados de Controles	
Controles Positivos (Agua de peptona + bacterias):	Positivos
Controles blanco (Concentraciones de Acido Orgánico sin bacterias):	Negativos
Control negativo (Agua de peptona sin bacterias):	Negativos


Marcelo Muñoz Naranjo Ph. D.
 Director del laboratorio


Biol. Alberto Lino Malavé
 Jefe del Laboratorio

Notas: 1. Los resultados solo se refieren a la muestra presentada al ensayo.
2. El presente informe no debe ser reproducido, excepto en forma total, sin la aprobación escrita del laboratorio.

Guayaquil: Campus "Gustavo Galindo V", Km. 30.5 Vía Perimetral, contiguo a la Cilla. Santa Cecilia • Casilla: 09-01-5863
Fax: (593-4) 2854629 • Telefonos: 2869269 - 2850341 - 2851094 - 2854482 - 2854500 - 2854518 - 2854486 - 2854501
Campus "Las Peñas", Malecón 100 y Loja • Fax: (593-4) 2530283 • Telefonos: 2530491 - 2530271
Quito: Av. 6 de Diciembre N 33-55 y Av. Eloy Alfaro, Edif. Torre Blanca, Piso 2 • Casilla: 17-01-1076 • Telefaxes: (593-2) 2521408 - 2561199 - 2235150 - 2527986 - 2550618

F-PG5.10-03 Rev. 01 Página 1 de 1

Fuente: Investigación realizada

Anexo 3. Vaciado de alimento en tinas rectangulares



Fuente: Investigación realizada

Anexo 4.- Pesaje de la cantidad requerida de ácido y pegante



Fuente: Investigación realizada

Anexo 5: Aplicación de la solución ácido-agua sobre el alimento

Fuente: Investigación realizada

Anexo 6: Mezcla de alimento

Fuente: Investigación realizada

Anexo 7: Aplicación de producto en máquina mezcladora

Fuente: Investigación realizada

Anexo 8: Proceso de mezclado en máquina

Fuente: Investigación realizada

Anexo 9: Colocando en sacos en alimento mezclado con el ácido orgánico

Fuente: Investigación realizada

Anexo 10: Alimentación en comederos

Fuente: Investigación realizada

Anexo 11: Tabla de Alimentación de la Camaronera

Dias	Semanas	Peso Aproximado	% Supervivencia de	% Biomasa de a alimentar
1	1	0,001	100	16
8	2	0,1	85	14
15	3	0,5	80	10
22	4	1,5	75	8
29	5	2,5	70	7
36	6	3,5	65	6
43	7	4,5	60	5
50	8	5,5	58	4
57	9	6,5	56	3,5
64	10	7,5	54	3,3
71	11	8,5	52	3
78	12	9,5	50	2,5
85	13	10,5	48	2
92	14	11,5	47	2
99	15	12,5	46	2
106	16	13,5	45	2
113	17	14,5	44	2

Fu
ent
e:
Inv
esti
ga
ció
n
rea
liza
da

BIBLIOGRAFIA

1. ALDAY- SANZ V., ROQUEC. MORTIMER 1989. Química General Orgánica.
2. ANDERSON I., SHAMSUDIM M. AND SHARIFF M. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fis. Sci.* 2, Pages:93-108.
3. BARDYS, NG S, JARRELL K 2003. Prokaryotic motility structures. *Microbiology* 149 (2): Pages: 295 – 304.
4. BEARSON, S. ET AL. 1997. *Microbiology Letters*, Pages 173 – 180.
5. BERG J., TYMOCZKO J., STRYER L., 2002. *Biochemistry*.
6. BELITZ, H.D. Y GROSCH W. 1986. *Food Chemistry*.
7. BOLDUAN, G. 1999. *Feed Tech*. Pages 3 – 4.
8. BOOTH. I.R. 1985. *Microbiological Reviews*. Pages 359 -378
9. BROCK, J.A. and LIGHTNER D. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea and Diseasea of Marine Animals Vol. 3, *Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg*. Pages: 245 – 424

10. BRUNE DC. 1995. Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa*. Pages: p 391- 99
11. C. MORTIMER, 1989. Química General Orgánica.
12. CANO R., BORUCKI M. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25 to 40 million year old- . Pages: 1060- 4
13. CHEN D. 1992. An overview of the disease situation, diagnostic techniques, treatments and preventatives used on shrimp farms in China. Pages: 47-55
14. COOK DW., LOFTON SR. 1973. Chitinoclastic bacteria associated with shell diseases in *Penaeus* shrimp and the blue crab. Pages: 154 - 159
15. DANIEL C. HARRIS 2004. Análisis Químico Cuantitativo.
16. de la PEÑA L.D. , KAKAI, T . , MUROGA K. 1995. Dynamics of *Vibrio* sp PJ in organs of orally infected kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Fish. Pathol. 30: Pages :39-45
17. DOOLITE DF 2005. Evolutionary aspects of whole-genome biology. Pages: 248-253.
18. DOUWES K., SCHMALZBAUER E., LINDE H., REISBERGER E.

19. DRAKE H., DANIEL S., KUSEL K, ET AL. 1997. Acetogenic bacteria : what are the in situ consequences of their diverse metalobic versabilities ? Pages: 13-14.
20. EAGON R. 2001. Pseudomonas natriegens, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes. Pages : 736-7.
21. ENGELHARDT H., PETERS J 1998. Structural research on surface layers : a focus on stability , surface layer.
22. ESTEVE M. and QUIJADA R. 1993. Evaluation of three experimental infection techniques with with anguillarum un Penaeus brasiliensis in Carillo at al., (ed.), “ From discovery to commercialization ” '93 World Aquaculture , European Aquaculture Society Special publication #19 Torremolinos, Spain, Pages :129.3
23. EUZEBY, JP 2008. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
24. FENNEMA, O.R. 1993. Química de los alimentos. Edición : Acribia.
25. FISH D.1992. Optimal antimicrobial therapy for sepsis. Pages :13—19.
26. FLEISCHER K, et al. 2003. Branched filaments no fungus, ovoid bodies no bacteria: Two unusual cases of mycetoma.
- 27 .FONTAINE, J. 1994. Feed Mix. Pages: 2- 31.

28. FOSTER ,J.W. 1999. Current Opinion in Microbiology. Pages: 170 -174
29. FREDRICKSON J., ZACHARA J., BALKWILL D. et al. 2004.
Geomicrobiology of high level nuclear waste- contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington.
- 30.FRITZ I., STROMPL C., ABRAHAM W. 2004. Phylogenetic relationships of the genera vibrio . Pages: 228-232
- 31.GARY G. Martin, NICOLE RUBIN, ERICA SWANSON. 2004. Vibrio parahaemolyticus and V. harveyi cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp Sicyonia ingenti. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 60: Pages: 21 –29
32. GITAI Z., 2005. The New Bacterial Cell Biology: Moving Parts and Subcellular Architecture.
33. GOLDBERG.2001. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. Microbiol I Biol Rev 65 (4): Pages 595—626.
- 34.GORBACH S. 1990. Lactic acid bacteria and human health. Pages 211-18
- 35.H. DUPONT DURTS. 1998. Química Orgánica Experimental. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España.

36. HAROLF F.1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes.
37. HARRIS L. 1995. The involvement of toxins in the virulence of *Vibrio harveyi* strains pathogenic to the back tiger shrimp *Penaeus monodon* and the use of commercial probiotics to reduce shrimp hatchery disease outbreaks caused by *V. harveyi* strains. CRC for Aquaculture, Scientific Conference abstract, Bribie Island, Australia.
- 38.HUGENHOLTZ P 2003. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era.
39. ISHIGE T., HONDA K., SHIMIZU.2005. WHOLE organism biocatalysis. Pages :174-80.
- 40.ISHIMARU K., AKARAWA-MATSUSHITA M., MUROGA K, 1995. *Vibrio penaeicida* sp, a pathogen of kuruma shrimps (*Penaeus japonicus*). Pages :8-19
41. JAYASREE L., JANAKIRAM P. and MADHAVI R. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). Journal of the world Aquaculture Society, Volume 37 Issue 4. Page 523.
42. JAYABALAN N., CHANDRAN R., SIYAKUMAR V., RAMAMOORTHY K. 1982. Occurrence of luminescent bacteria in sediment. Pages :710—711

43. JAWAHAR ABRAHAM T and R. PALANIAPPAN.2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of tamil Nadu, India. *Aquaculture*, Vol. 232, Issues 1-4, Pages 81-90.
44. JIRAVANICHPAISAL and CHUAYCHUWONGI.1997. The use of *Lactobacillus p.* as treatment of vibriosis in *Penaeus monodon* (giant tiger shrimp). Pages:151
45. KADOURI D., JURKEVITCH E., OKON Y., CASTRO – SOWINSKI. 2005. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Rev Micribiol* 31(2) "Pages : 55—67.
46. KAISER D. Signaling in myxobacteria.2008. *Annual Rev Microbial* 58: Pages 75-98.
47. KOCH A. 2003. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clin Microbiol Rev* 16(4): Pages:673—87.
48. KOJIMA S., BLAIR D.2002. The bacterial flagellar motor : structure and function of a complex molecular machine. *Rev Cytol* 233: Pages 93—134.
49. KWON, Y.M. Y RICKE, S.C 1998. *Applied and Environmental Micribiology*, Pages : 3458-3463.

50. LAVILLA-PITOGO C, BATICADOS C.AND CRUZ-LACIERDA E. 1990. Occurrence of luminous bacteria disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91, Pages :1-13.
51. LEWIS D. 1973. Response of Brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. *Proc. Wid. Maricult. Soc.*4, Pages :333-338.
52. LIGHTNER D.1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey (ed.) *CRC Handbook of Mariculture, Second edition, Volume 1, Crustacean Aquaculture*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fl., Pages :393-486.
53. LIGHTNER D. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge , LA, USA.
54. LIGHTNER D. and LEWIS D. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* , 164. Pages:201-220.
55. LIGHTNER D. and LEWIS D.1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp . *Mar. Fish.Rev.* 37(5-6) :25-28.
56. LIU P., LEE K. and CHEN S. 1996.Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger shrimp , *Penaeus monodon*, *Letters in Applied Microbiology* 22, Pages.413-416.

57. LÓPEZ, S et al. 1999. J. Nutrition., Pages .59-64.
58. LOVETT DL., FELDER DL. 1990. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea,Decapoda,Penaeidae). Pages :164-174.
- 59 .LUX R., SHI W., 2004. Chemotaxis-guided movements in bacteria .Pages:207-20.
60. MADIGAN , M.T. et al . 1997. Brock Biology of Microorganisms.
61. MORALES, VIELKA Y CUÉLLAR- ANJEL.2008. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos.
62. MOREL. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Annual Review of Ecological Sytems 29: Pages: 523—566.
- 63.MYKLES DL. 1977. The ultrastructure of the posterior midgut caecum of *pachygrapsus crassipies* (Decapoda, Brachyura) adapted to low salinity. Tissue Cell 9, Pages :681—691
64. MOHNEY L. and LIGHTNER D. 1991. Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Pomet 30 in the nematode *Panagrellas redivivus* and in naplii of *Artemia salina*. J. World. Aquacult. Soc. 21)3), Pages : 186 – 191

65. NASH G., NITHIMATHACHOKE C., TUNGMANDI C., ARKARJAMORN A., PRATHANPIPAT P. and RUAMTHAVEESUB P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand and Diseases in Asian Aquaculture 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. Pages:143-155.
66. NEUFELD DS, CAMERON JN. 1994.Mechanism of the net uptake of Water in moulting blue crabs(*Callinectes sapidus*)acclimated to high and low salinities. Journal Exp Biol 188: Pages:11-23
67. NICHOLSON W., MUNAKATA N., HOMECK G., MELOSH H.M SETLOW P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. / Rev. 64 (3) : Pages :548-72.
68. ÖSTLING, C.E. y LINDGREN, S.E. 1993. Appl. Bacteriology, Pages : 18-24.
69. OWENS L. and HALL- MENDELIN. 1989. Recent advances in Australian shrimps (sic) diseases and pathology. Advances in Tropical Aquaculture, Tahiti, AQUACOP, IFREMER, Pages:103-112.
70. P.RODRÍGUEZ VALENZUELA, 200. Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. XVI Curso de Especialización FEDNA.

71. PAYNTER J.L 1989. Invertebrates in Aquaculture. Refresh Course for Veterinarians, Proceedings 117. The University of Queensland.
72. PHILIP S. BAILEY 1997. Química Orgánica : Conceptos y Aplicaciones.
73. PÖLÖNEN, I. et al . 1997 Anim. Feed Sci. Technic. Pages:197 -202.
74. PRADELLA s., HANS A., ET AL. 2002. Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium Sorangium cellulosum. Rev Microbiol 178 (6); Pages :484-92.
75. RAPPÉ M., GIOVANNONI S. 1999 The uncultured microbial majority Pages :639-94.
76. ROTH,F..X. y KICHGEBNER,M.1998. J. Anim. Feed Sci. Pages 25-33
77. RUBY E.G., GREENBERG E.P. and HASTINGS J.W. 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribución in the water column. Applied and Environmental Microbiology. Pages:302-306.

78. RYAN KJ. RAY CG 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed. Edición) .

McGraw Hill. Pages :232-3..

79. SAHUL HAMEED A., RAO P.. FARMER J. and FANNING G. 1996.

Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio cambelli*-like bacterium affecting hatchery-reared *Penaeus indicus* (Milne Edwards, 1837) larvae. *Aquacult. Res.* 27, Pages: 853-863.

Res. 27, Pages: 853-863.

80. SAIMAN.L. 2002. Microbiology of early CF lung disease, Pages:367-369.

81. SALMINEN S., GUEIMONDE M., ISOLAURI E. 20005. Probiotics that modify disease risk. Pages : 1294-8.

82.SAORI MINE, RAJ BOOPATHY. 2011. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*.

83. SEARS C 2005. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. Pages : 247 -51.

84. SHIH YL., ROTHFIELD L. 2006. The bacterial cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*70 (3): Pages:729

85. SHIMKETS L. 2001. Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Rev Microbiol* 53: Pages:525-49.
86. SINDERMAN . 1990. *Principal Diseases of marine fish and Shellfish*, Vol.2, 2nd edition . Academic Press, New York.
87. SIZEMORE and Davis. 1985. *Vibriosis en la Acuicultura de camarón*.
88. SLONCZEWSKI, J.L. y FOSTER, J.W. 1987. *Escherichia Coli and Salmonella Typhimorium*. *Cellular and Molecular Biologu*, Ingraham J.L. et al., American Society for Microbiology, capitulo 96, Pages:1539-1549.
89. STAMS A. 2006. *Syntrophism among prokaryotes*. Pages 6-7
90. STOKES R., NORRIS-JONES, BROOKS D., BEVERIDGE T., DOXSEE D., THORSON L.2004. The glycan- rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. Pages: 5676-86.
91. TAKAHASHI Y., SHIMOYAMA Y. and MONOYAMA K.1985. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. Isolated from diseased postlarvae of kuruma shrimp, *Penaeus japonicas* Bate. *Bull. Jpn. Soc.Sci. Fish.* 51, Pages :721-730.
92. TATSUYA NAKAYAMA, NAKAO NOMURA and MASATOSHI MATSUMURA, 2005. Analysis of the relationship between luminescence and

toxicity of *Vibrio carchariae* pathogenic to shrimp . Fisheries Science, Volume 71
Issue 6, 1236

93. TAYLOR HH, TAYLOR EW.1992. Gills and lungs: the exchange of gases
and ions. Pages: 203-293

94. THOMSON R., BERTRAM H.2001. Laboratory diagnosis of central nervous
system infections . Pages :1047-71

95. TUNG, et al. 1975. The anemia caused by aflatoxin. Poultry sci. 54 : 1962-
1969

96. VAN HEIJENOORT 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis
of bacterial peptidoglycan.

97. W. HASTINGS.1979. Induction of Luciferase Sythesis in *Benickea harveyu*
by other Marine Bacteria.

98. WHITMAN W., COLEMAN D., WIEBE W.1998. Prokaryotes : the unseen
majority. Pges :6578-83.

99. XY J. 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics.

100. YOUNG K.200+. The selective value of bacterial shape. Pages :660-703.

101. ZEHR J., JENKINSB., SHORT S., STEWARD G., 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure a cross-syste, comparison. Pages :539-54.
102. ZUMFT W. 1991. Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. Pages:544-51.
103. ZUMFT W. 197. Cell biology and molecular basis of denitrification. Biol Rev 61 (4) : Pages 533-616.

