

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

Factibilidad de aplicación de la fagoterapia para el control de bacterias patógenas en cultivo de larvas de camarón en Ecuador

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero en Acuicultura**

Presentado por:

Kívely Yajaira Lozano Torres

Carlos Javier Palacios Viteri

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

Año: 2020

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico a Dios por ser mi guía en todo momento. A mi madre, Silvia por todo su sacrificio y por ser mi mayor inspiración. A mi hermano, Eduardo por apoyarme siempre. A toda mi familia, tías, tíos, primos, quienes me han ayudado incondicionalmente. A mis grandes amigos con quienes compartí momentos inolvidables en esta etapa universitaria. Y, por último, una dedicatoria especial a mi papi Jorge y mi abuelita Kelly, quienes vivirán por siempre en mi corazón.

Carlos Palacios

## DEDICATORIA

Dedico este proyecto a su verdadero autor que es Dios y a María mi madre del cielo, sin ellos nada hubiese alcanzado. A Eduardo, mi fuerza, y a Carla, mi sensibilidad, gracias por empujarme a cumplir mis metas, a secarme las lágrimas cuando sentía que ya no podía. Sin ellos, no tendrían sentido mis logros. A Eduardito y a Joss, mi locura y mi nobleza, que ahora su vida ha sido más latente en la mía, porque sus dolores y fracasos me han hecho reflexionar y madurar. A Daniel, mi sonrisa, quien empezó por preguntarme si ya pasé varias variables y terminó ayudándome en ser más avispada, gracias porque sin ti siempre me fuera por las ramas. A mi hermana mayor Pamela por regalarme cuatro sobrinos que distraían mis noches sin dormir. A mi tía Gaby y mis primas por siempre estar pendientes. A mi mamita Inés que me ha demostrado su coraje para sobrellevar golpes duros, su oración ha sido oxígeno para nuestra familia. A mi mamina y mi papi Jorge, el hermoso cariño que me demuestran es inigualable. Gracias a toda mi familia por siempre estar atentos a mi bienestar físico y espiritual. Sin olvidarme de agradecer la presencia de mis amigos del colegio y universidad, gracias por las risas, las trasnochadas y las anécdotas. A mi negrita bella, que aun siendo una mascota me ha alegrado en mis amarguras. Gracias a LAM por ser ese instrumento de Dios que necesitaba desde el preuniversitario.

Dedico a ese sol que me hizo percatar con su partida cuánto me falta amar y a mi papi Guayo que ahora en el cielo sus recuerdos no son más que ejemplos de valentía para mi vida. Totus Tuus.

Kívely Lozano

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestro más sincero agradecimiento a Bonny Bayot, *Ph.D*, por aceptar ser nuestra tutora, su guía y confianza en nosotros fueron primordiales para el desarrollo de este proyecto. Al departamento de Microbiología de CENAIM, en especial a la Blga. Mrna. Martha Borbor, y al M.Sc. Ramiro Solórzano, por sus directrices para llevar a cabo con excelencia la fase experimental de este trabajo. A los productores de larvas de camarón, autoridades de la acuicultura ecuatoriana, profesionales e investigadores del sector acuícola, por permitirnos conocer las necesidades del país como la de contar con una alternativa natural antimicrobiana. A nuestras familias, por ser nuestro soporte en esta etapa universitaria. Y, por último, a la ESPOL, por inculcar en nosotros la excelencia en todos los ámbitos de la vida.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Kívely Yajaira Lozano Torres* y *Carlos Javier Palacios Viteri*, damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



---

Kívely Yajaira Lozano  
Torres



---

Carlos Javier Palacios  
Viteri

# EVALUADORES

VICTOR HUGO OSORIO  
CEVALLOS

Firmado digitalmente  
por VICTOR HUGO  
OSORIO CEVALLOS  
Fecha: 2021.02.12  
09:17:21 -05'00'

.....  
**Víctor Hugo Osorio Cevallos, Ph.D**

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:  
**BONNY NARCISA  
BAYOT ARROYO**

.....  
**Bonny Narcisa Bayot Arroyo, Ph.D.**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

El camarón es el primer producto no petrolero de exportación del país. Sin embargo, las enfermedades bacterianas provocan mortalidades masivas en el cultivo de larvas de camarón, ocasionando pérdidas económicas. Los antibióticos, una solución tradicional para controlar estas enfermedades, poseen importantes desventajas como la resistencia bacteriana. Por lo tanto, es imprescindible desarrollar alternativas naturales. Los bacteriófagos son virus que infectan y eliminan bacterias patógenas específicas, sin alterar la microbiota ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar la factibilidad técnica y ambiental de aplicar la fagoterapia en Ecuador para controlar enfermedades bacterianas en larviculturas de camarón. El análisis de factibilidad se basó principalmente en: revisión bibliográfica, experimentación, entrevistas y encuestas. Para demostrar que el aislamiento de bacteriófagos es factible se ejecutaron dos métodos de aislamiento con una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* como antagonista. El método con medio de cultivo TSB fue eficaz para obtener bacteriófagos líticos. Los productores evaluaron los criterios que consideraron más importantes para elegir un producto antimicrobiano. Investigadores con experiencia en desarrollo de probióticos calificaron los indicadores de antimicrobianos eficaces. Los bacteriófagos alcanzaron un valor de factibilidad del 76%, similar al obtenido por los probióticos (producto antimicrobiano efectivo y muy utilizado por los productores de larvas de camarón). Esto contrasta con el 29% obtenido por los antibióticos, que presentaron claras desventajas como antimicrobiano para cultivo de camarón. Los resultados sugieren que la fagoterapia es factible para controlar bacterias patógenas en cultivos de larvas de camarón y abre las puertas a más investigaciones en el campo acuícola local.

**Palabras clave:** bacteriófagos, productos antimicrobianos, enfermedades bacterianas, larvicultura, resistencia bacteriana

## **ABSTRACT**

*Shrimp is the country's first non-oil export product. However bacterial diseases are capable of causing impactful mortality rates in larvae, causing considerable economic loss. Antibiotics, which have been considered as a traditional solution to control these diseases, also come with many disadvantages such as development of bacterial resistance. Therefore, it's imperative to develop alternatives. Bacteriophages are viruses that infect specific pathogenic bacteria, without altering environmental microbiota. The objective of this study was to evaluate the technical and environmental feasibility of applying phage therapy in Ecuador, in order to control bacterial diseases in shrimp larviculture. The feasibility analysis was mainly based on: Bibliographical research, experimentation, interviews and polls. Two methods of isolation with a strain of *Vibrio parahaemolyticus* as an antagonist agent were made to show the efficacy of bacteriophage isolations. The TSB culture medium method was successful to obtain lytic bacteriophages. Producers evaluated the criteria they considered the most important in choosing an antimicrobial product. Researchers with experience in probiotic development rated the markers as effective antimicrobials. Bacteriophages reached a feasibility value of 76%, similar to that obtained by probiotics (an effective antimicrobial product widely used by shrimp larvae producers). This result contrasts with the 29% obtained by antibiotics, which had clear disadvantages as an antimicrobial for shrimp farming. The results suggest that phage therapy is feasible to control pathogenic bacteria in shrimp larval cultures and opens the door to further research in the local aquaculture field.*

*Keywords: Bacteriophages, antimicrobial products, bacterial diseases, larviculture, bacterial resistance.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción	9
1.1. Descripción del problema	10
1.2. Justificación del problema	10
1.3. Objetivos	11
1.3.1. Objetivo General	11
1.3.2. Objetivos Específicos	11
1.4. Marco teórico	11
1.4.1 Antibióticos	12
1.4.2 Probióticos	13
1.4.3 Ácidos orgánicos	14
1.4.4 Aceites esenciales	14
1.4.5 Bacteriófagos	15
1.4.5.1. Mecanismo de acción de los bacteriófagos	15
1.4.5.2 Comunicación viral <i>arbitrium</i>	18
CAPÍTULO 2	20
2. Metodología	20
2.1 Información disponible sobre los bacteriófagos a nivel mundial y local	21
2.1.1 Estudios aplicación de la fagoterapia en camarones peneidos	21
2.1.2 Métodos de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos	21
2.1.2.1 Método con agua de mar artificial	22
2.1.2.2 Método con medio TSB	22

2.1.3 Productos comerciales y patentes internacionales de bacteriófagos para cultivo de camarón	23
2.1.4. Entrevistas a autoridades gubernamentales de la industria acuícola	24
2.2. Análisis de factibilidad de la aplicación de fagoterapia	24
2.2.1. Identificación de criterios e indicadores cuantificables de efectividad y selección de productos antimicrobianos	24
2.2.2 Validación, ponderación de los criterios de efectividad y selección de productos antimicrobianos	27
2.2.3 Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos	28
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>29</b>
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	<b>29</b>
3.1 Información disponible sobre los bacteriófagos a nivel mundial y local	29
3.1.1. Estudios de aplicación de la fagoterapia en camarones peneidos	29
3.1.2 Métodos de detección, aislamiento y purificación de bacteriófagos	29
3.1.2.1 Método con agua de mar artificial	29
3.1.2.2 Método con medio TSB	31
3.1.3 Productos comerciales y patentes internacionales para cultivo de camarón	32
3.1.4 Entrevistas a autoridades gubernamentales de la industria acuícola	35
3.2. Análisis de factibilidad de la aplicación de fagoterapia	37
3.2.1 Validación y ponderación de los criterios de efectividad y selección de productos antimicrobianos	37
3.2.2 Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos	39
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>41</b>
<b>4. Conclusiones Y Recomendaciones</b>	<b>41</b>
4.1. Conclusiones	41
4.2. Recomendaciones	45
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>55</b>

## **ABREVIATURAS**

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
FCR	Factor de conversión alimenticia
AHPND	Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda
FDA	Food and Drug Administration
CVM	Centro de Medicina Veterinaria
EMA	Agencia de Medicinas Europea
ATP	Adenosín trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
TSA	Trypto-Casein Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
MOI	Multiplicidad de infección
MEB	Microscopía electrónica de barrido
VUE	Ventanilla Única Ecuatoriana
SENAE	Servicio Nacional de Aduana del Ecuador
COPCI	Código Orgánico de la Producción, Comercio e Inversiones

## SIMBOLOGÍA

mg	Miligramo
µm	Microgramo
µl	Microlitro
h	Hora
min	Minutos
pH	Potencial de Hidrógeno
°C	Temperatura en grados centígrados
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
rpm	Revoluciones por minuto

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Modos de acción de los antibióticos [20]._____	12
Figura 1.2. Mecanismo de acción de probióticos [24]._____	13
Figura 1.3. Mecanismo de acción microbiana de los ácidos orgánicos [81]_____	14
Figura 1.4. Mecanismo de acción de aceites esenciales [27]._____	15
Figura 1.5. Representación gráfica de los (A) Ciclos líticos y (B) Ciclos lisogénicos de bacteriófagos [33]._____	17
Figura 1.6. Bacteriófago específico T7 diseñado para sobre expresar enzimas dispersinas B (DspB) que degradan las biopelículas de Escherichia coli [38]._____	18
Figura 1.7. Dinámica de la comunicación “arbitrium” en infecciones por fagos [40]. _	19
Figura 3.1. Placas líticas de muestras de agua de los dos laboratorios de larva muestreados, obtenidas en la tercera purificación mediante el método de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos en medio TSB. A) Placas líticas de muestra de agua del laboratorio O. B) Placas líticas de muestras de agua del laboratorio B._____	32
Figura 3.2. Principales enfermedades y bacterias patógenas presentadas en laboratorios de larvas de camarón._____	37
Figura 3.3. Etapa del desarrollo larval más susceptible a contraer enfermedades bacterianas._____	38
Figura 3.4. Medidas físicas, químicas y biológicas mayormente aplicadas por los productores a los tanques de larvicultura cuando hay enfermedades bacterianas.____	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Descripción de los indicadores empleados para evaluar los criterios que debe tener un buen producto antimicrobiano.	26
Tabla 3.1. Resumen de aplicaciones de bacteriófagos en cultivos de camarones <i>Penaeus monodon</i> y <i>Penaeus vannamei</i> .	30
Tabla 3.2. Productos comerciales de bacteriófagos para el control de bacterias patógenas en cultivos de camarón.	33
Tabla 3.3. Patentes internacionales de bacteriófagos aplicados en camarón.	34
Tabla 3.4. Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos.	40

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

El camarón es el principal producto de exportación no petrolero del Ecuador [1]. Sin embargo, uno de los mayores problemas que enfrenta la industria acuícola son las enfermedades bacterianas, lo que causa pérdidas económicas millonarias [2]. El control de estos patógenos es especialmente primordial en la etapa de producción de larvas [3], ya que la falta de tratamiento a tiempo puede causar impactos considerables en la producción larval y en el medio ambiente [4]. Los antibióticos son utilizados comúnmente en la acuicultura para prevenir o controlar las enfermedades de etiología bacteriana [5]. No obstante, las bacterias patógenas pueden adquirir resistencia a estos químicos, reduciendo su efectividad [6]. Los bacteriófagos constituyen una de las alternativas más prometedoras a los antibióticos para controlar infecciones bacterianas en acuicultura [7] [8] [9]. En tal sentido, infecciones experimentales en bagre *Clarias batrachus* con *Flavobacterium columnare* han sido controladas exitosamente por bacteriófagos, provocando la ausencia de infección, patogenicidad y mortalidad [10]. En el caso del cultivo de camarones, la efectividad de los bacteriófagos ha sido comprobada pese a que los estudios aplicados son escasos. Los bacteriófagos son las partículas más abundantes en el medio marino [11], por lo que las probabilidades de identificación y aislamiento son grandes. Además, son altamente específicos, lo que permite diseñar estrategias de control direccionadas a bacterias patógenas específicas, sin alterar la microbiota ambiental. Tomando en cuenta que, el sector productor camaronero está ávido de encontrar tratamientos efectivos para combatir las enfermedades bacterianas, es importante evaluar si los bacteriófagos pueden ser una alternativa efectiva a los antibióticos para el control de enfermedades bacterianas en larvas de camarón [12]. El objetivo de este trabajo consiste en evaluar, en base al análisis de la literatura científica, la factibilidad técnica y ambiental de aplicar la fagoterapia en Ecuador, para el control de enfermedades bacterianas en larviculturas de camarón.

### **1.1. Descripción del problema**

Las enfermedades bacterianas como el síndrome de la Zoea II [13], enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda - AHPND [14], entre otros, son una problemática del sector productor de larvas de camarón. Los antibióticos son muy usados para controlar enfermedades bacterianas en acuicultura [15]. Sin embargo, estos químicos presentan importantes desventajas, principalmente la adquisición de farmacorresistencia por parte de las bacterias patógenas acuícolas y ambientales, lo que conlleva en corto plazo a la reducción del número de antibióticos efectivos, y por tanto al endurecimiento de regulaciones antimicrobianas. Además, la detección de antibióticos prohibidos en lotes de camarón exportados puede ocasionar problemas de rechazo por parte de los países importadores. Por tanto, es urgente el desarrollo de métodos naturales de control para las enfermedades bacterianas. Los bacteriófagos, son virus que atacan y destruyen bacterias en forma especie-específica, y aunque en acuicultura constituyen una alternativa natural al uso de antibióticos, al no poseer efectos colaterales en las microbiotas ambientales e intestinales, la terapia de fagos no está muy desarrollada. Una de las razones por las cuales la fagoterapia no ha sido aplicada a mayor escala radica en el desconocimiento de las ventajas y desventajas comparadas con otros métodos antimicrobianos disponibles para la acuicultura de camarón.

### **1.2. Justificación del problema**

El cultivo de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, generó 4 mil millones de dólares en 2019, convirtiéndose en el primer producto de exportación no petrolero de Ecuador [16]. Además, es el segundo exportador camaronero a nivel mundial [17]. Para que el país continúe exportando camarón de calidad es importante evitar pérdidas económicas por las enfermedades, principales limitantes para una buena producción.

La enfermedad bacteriana más emergente en la industria de producción de camarón nacional y mundial es AHPND. Recientemente han emergido nuevas enfermedades bacterianas, como la enfermedad de la post-larva translúcida (TDP), causada por una nueva cepa de *V. parahaemolyticus* [18], y nuevas enfermedades bacterianas de camarón continuarán emergiendo. Dado que, los antibióticos, poseen importantes

desventajas, es imprescindible desarrollar alternativas naturales para el control de las enfermedades bacterianas de camarón de cultivo.

Los bacteriófagos pueden ser una alternativa válida a los antibióticos para el control de infecciones bacterianas, sin embargo, no existen muchos estudios sobre su funcionamiento en acuicultura de camarón. Más aún, en Ecuador la fagoterapia es desconocida, por tanto, es necesario la ejecución de estudios para evaluar la factibilidad de aplicar este método de control de enfermedades bacterianas en cultivos larvarios locales.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar la factibilidad técnica y ambiental de la aplicación de la fagoterapia en Ecuador para controlar enfermedades bacterianas en larviculturas de camarón.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Analizar estudios de aplicación de la fagoterapia en la camaronicultura mundial.
- Determinar el grado de factibilidad de aplicar la fagoterapia en cultivos de larvas de camarón en Ecuador, utilizando criterios técnicos y ambientales.

### **1.4. Marco teórico**

En la acuicultura de camarón se usan varios agentes antimicrobianos para combatir enfermedades bacterianas, que se clasifican en productos químicos (antibióticos) y productos naturales o biológicos. Los agentes antimicrobianos naturales más usados en el cultivo de camarón son: probióticos, ácidos orgánicos y aceites esenciales, y aunque los bacteriófagos no son muy usados, constituye también otra alternativa natural a los antibióticos. A continuación, se describe un resumen del modo de acción de estos agentes antimicrobianos, con énfasis en los bacteriófagos, tema central de este trabajo.

### 1.4.1 Antibióticos

El mecanismo de acción de los antibióticos se presenta de dos formas (Figura 1.1). En el modo de acción bacteriostático, los antibióticos interfieren en los procesos celulares bacterianos de síntesis de proteínas y replicación del material genético, impidiendo que las bacterias se reproduzcan. Mientras que, según el modo de acción bactericida, los antibióticos obstruyen la formación de la pared celular bacteriana, derivando en la muerte de la bacteria [19].

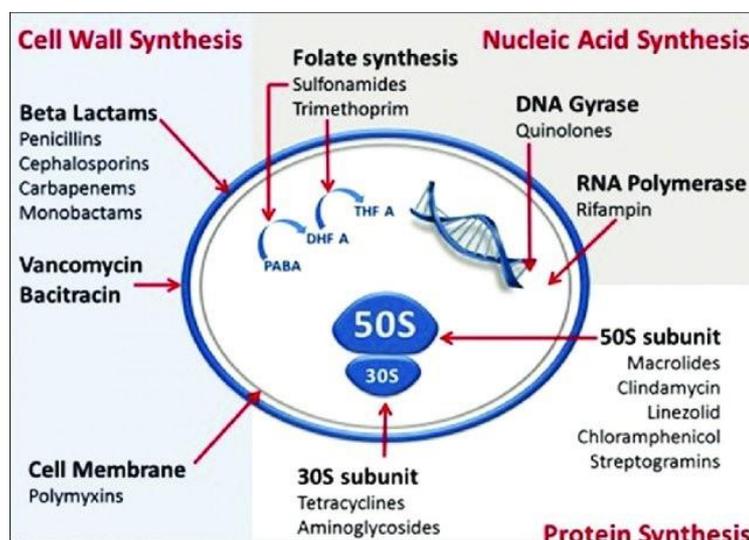


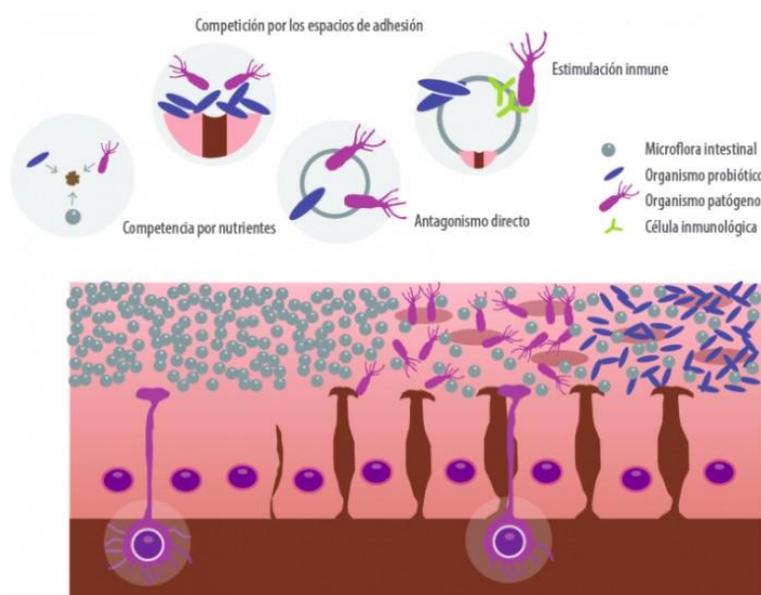
Figura 1.1. Modos de acción de los antibióticos [20].

El uso de antibióticos en acuicultura acarrea problemas adicionales al de la adquisición de farmacoresistencia por parte de las bacterias patógenas acuícolas y ambientales. Los antibióticos pueden generar residuos en los tejidos de los camarones [21], lo que puede generar toxicidad aguda o crónica, reacciones alérgicas, desórdenes en el desarrollo corporal, o en otros casos efectos mutagénicos y carcinogénicos en los consumidores [22]. En materia de exportación de camarón, el Ecuador se rige a las regulaciones de sus dos mercados más importantes: Estados Unidos y la Unión Europea. La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA), por medio del Centro de Medicina Veterinaria (CVM), controla la aprobación de drogas para uso acuícola en los Estados Unidos. Mientras que, en la Unión Europea, la Comisión de Salud y Seguridad Alimentaria se encarga de monitorear la implementación de leyes en seguridad alimentaria y de salud; y por su lado, la Agencia de Medicinas Europea (EMA) es la encargada de establecer los límites máximos de residuos para productos

veterinarios que se comercializan en la Unión Europea. La FDA ha autorizado los siguientes antibióticos en acuicultura: oxitetraciclina, florfenicol y sulfadimetoxina (ormetoprim). Sin embargo, la Unión Europea exige controles más estrictos para que todos los productos que se exportan a sus países tengan el mismo nivel de seguridad alimentaria que se maneja internamente, por lo que implementa controles de regulación en el uso de oxitetraciclina, florfenicol y ormetoprim [23].

### 1.4.2 Probióticos

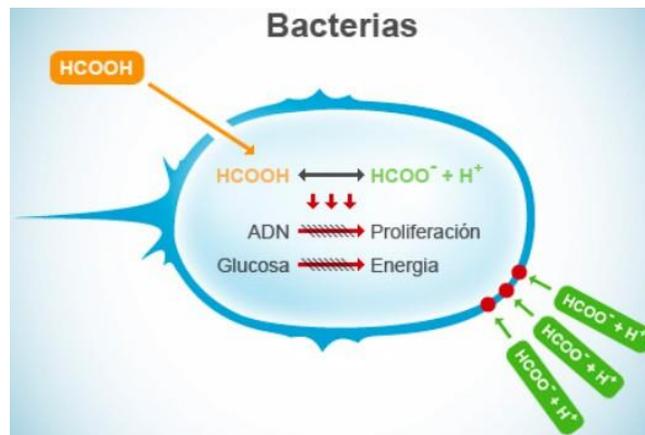
Los probióticos son microorganismos vivos administrados en dosis específicas, que benefician la salud del camarón principalmente a través de un mecanismo de exclusión competitiva contra las bacterias patógenas [19]. Además, los probióticos presentan otros mecanismos de acción como: colonización y adhesión de las bacterias probióticas en el intestino, mejoramiento de la calidad del medio de cultivo, generación de compuestos antimicrobianos que inhabilitan o eliminan los patógenos, estimulación de reacciones del sistema inmune innato, generación de compuestos antivirales en bacterias específicas y adecuada digestión de los alimentos, lo que a su vez redunda en un mejor crecimiento del camarón (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Mecanismo de acción de probióticos [24].

### 1.4.3 Ácidos orgánicos

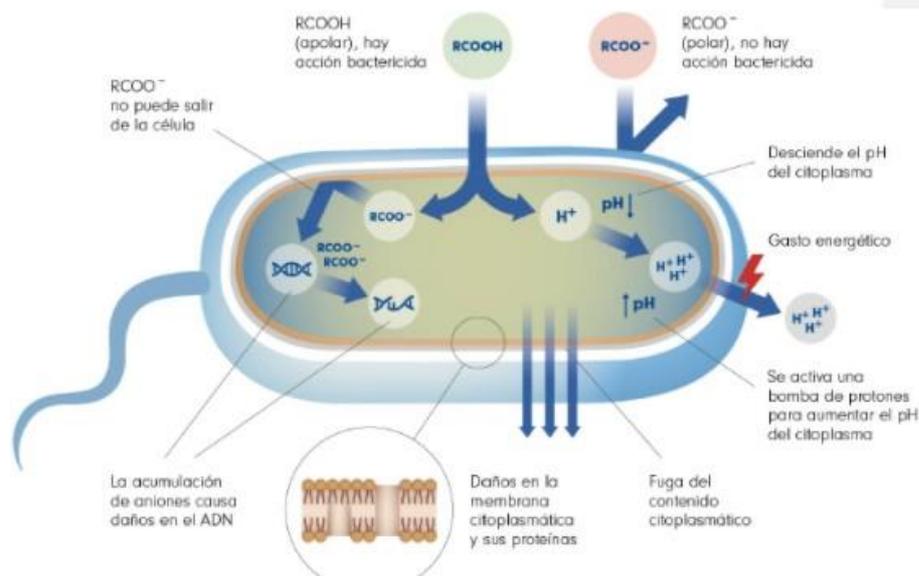
Los ácidos orgánicos usados en acuicultura son ácidos de cadena corta. La acción inhibitoria sobre las bacterias patógenas (Figura 1.3) empieza por su entrada a las células bacterianas y consecuente disociación de iones positivos y negativos dentro del citoplasma bacteriano, lo que altera la permeabilidad bacteriana por falta de minerales [25]. Posteriormente, ocurre una reducción de pH en el citoplasma bacteriano, lo que genera consumo del ATP celular y consecuente gasto energético, que inhibe los procesos enzimáticos necesarios para replicar el ADN bacteriano, impidiendo la multiplicación bacteriana.



**Figura 1.3.** Mecanismo de acción microbiana de los ácidos orgánicos [81]

### 1.4.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos naturales extraídos de plantas, con afinidad a las grasas y compuestos aromáticos volátiles, y con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anti-fúngicas. A concentraciones bajas interfieren en la comunicación bacteriana, conocida como *quorum sensing*, evitando que las bacterias segreguen señales de genes de virulencia. A altas concentraciones presentan varios mecanismos bactericidas (Figura 1.4), como incremento de la permeabilidad debido a la afinidad lipófila de los aceites a la pared bacteriana, alteración de la síntesis de proteínas, reducción del pH y enzimas bacterianas que generan ATP, afectando la transcripción del ADN bacteriano [26].



**Figura 1.4.** Mecanismo de acción de aceites esenciales [27].

### 1.4.5 Bacteriófagos

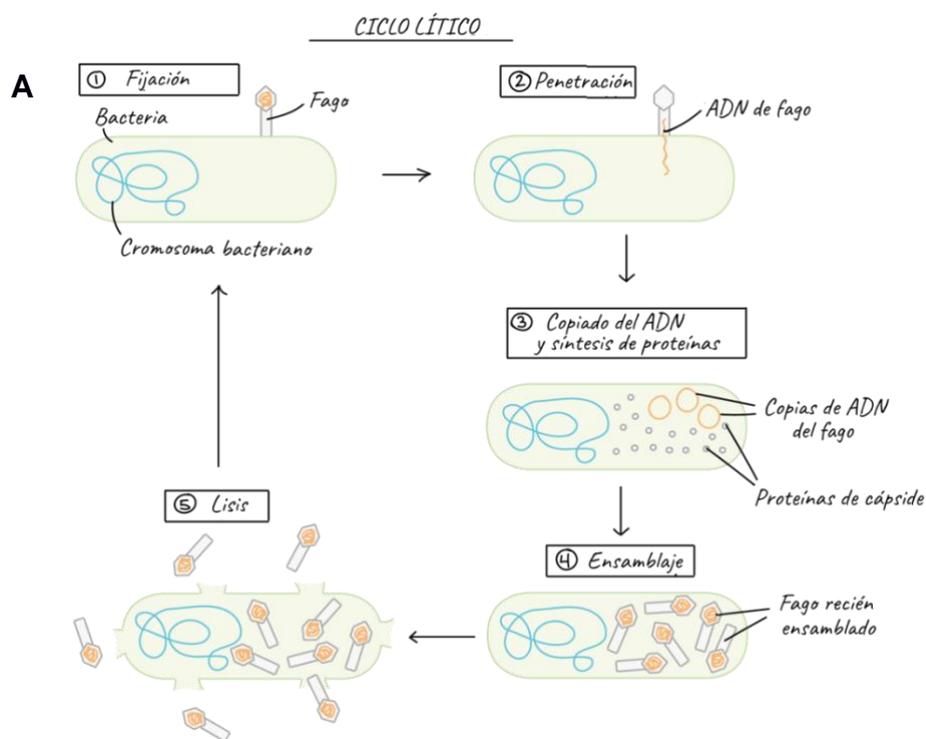
Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias en forma especie-específica [28] y se encuentran en abundancia en el agua de mar, en alrededor de  $1 \times 10^{30}$  bacteriófagos por litro de agua de mar [29]. El término bacteriófago proviene del griego “*baktrón*” que significa bacteria y “*phagos*” que hace referencia a ‘que se alimenta’, de tal forma que la unión de los dos términos hace alusión a que se alimentan de bacterias [30]. Los bacteriófagos también han sido aislados de sedimento terrestre [31]; por lo que son considerados como “la forma de vida más abundante y ubicua en la tierra” [32].

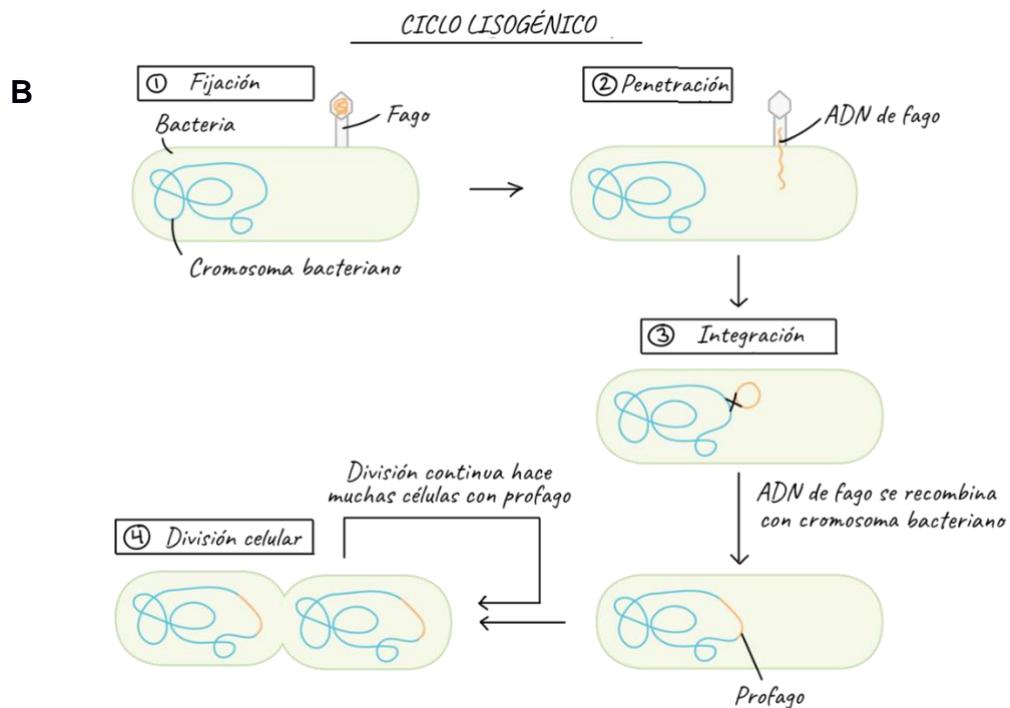
#### 1.4.5.1. Mecanismo de acción de los bacteriófagos

El mecanismo de acción puede variar de acuerdo con el ciclo de vida del bacteriófago, ya sea por un ciclo lítico o por un ciclo lisogénico. En el ciclo lítico, el bacteriófago funciona en forma virulenta, infectando a la bacteria (Figura 1.5A), replicando, provocando la lisis celular y liberando nuevos bacteriófagos. Este proceso ocurre luego de cumplirse una serie de etapas. La primera etapa es la fijación, donde las proteínas de la cola del bacteriófago se unen a un receptor específico de la superficie de la célula bacteriana. Luego se da la penetración, donde el bacteriófago inyecta su ADN bicatenario dentro del citoplasma de la bacteria. Posteriormente, ocurre la copia del ADN y síntesis

de proteínas estructurales, en la que se copia el ADN del bacteriófago y ocurre la expresión de los genes del bacteriófago para producir proteínas. Después ocurre el ensamblaje del nuevo bacteriófago, donde las cápsides se unen a partir de las proteínas de la cápside que infectó y se complementan con ADN para producir partículas de bacteriófagos. Finalmente, el bacteriófago expresa los genes que codifican para las lisinas. Estas proteínas forman agujeros en la pared celular y membrana plasmática de la bacteria, proceso mediante el cual la célula bacteriana se lisa, lo que permite que el agua ingrese a la célula bacteriana y consecutivamente estalle, liberando así nuevos bacteriófagos.

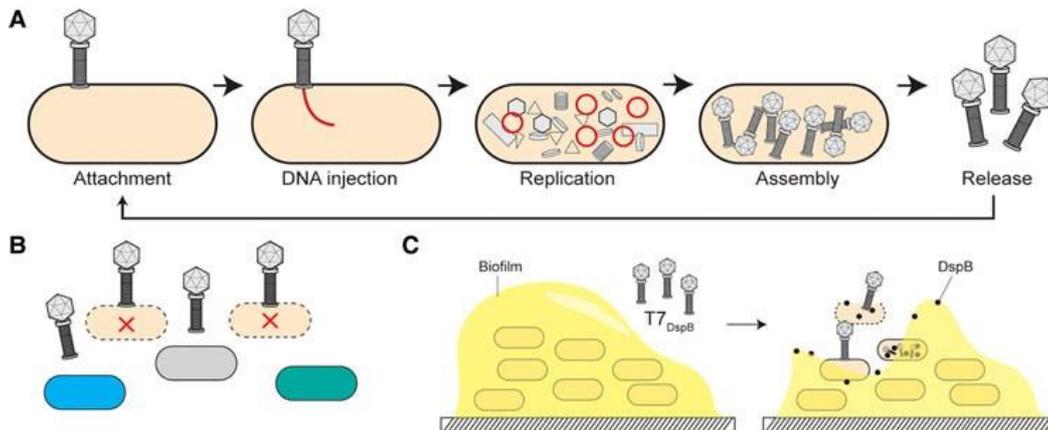
En el ciclo lisogénico, tanto la fijación como la inyección del ADN es igual que en el ciclo lítico (Figura 1.5B). No obstante, cuando el ADN del bacteriófago entra en la célula se recombina con una región del cromosoma bacteriano. El profago (fago con ADN integrado) no se expresa y no promueve la producción de nuevos bacteriófagos. Sin embargo, el ADN del bacteriófago se copia a la vez que se copia el ADN del hospedero. En condiciones favorables, el profago puede activarse y salir del cromosoma bacteriano, lo cual activa el copiado de ADN, síntesis de proteínas, ensamblado del bacteriófago y la lisis del ciclo lítico [33].





**Figura 1.5.** Representación gráfica de los (A) Ciclos líticos y (B) Ciclos lisogénicos de bacteriófagos [33].

Los bacteriófagos virulentos infectan sólo a bacterias específicas, sin infectar al microbioma circundante (Figura 1.6). Por lo tanto, para ampliar la cantidad de bacterias a ser combatidas se administra cocteles de bacteriófagos. Este procedimiento constituye además una vía de administración más segura, ya que, cuando se utiliza un único bacteriófago, la bacteria podría desarrollar resistencia. No obstante, esta resistencia aparece sobre todo a altas concentraciones de una sola cepa bacteriana, como en los cultivos puros, en comparación a medios con proliferación de diferentes bacterias. Sin embargo, por procesos de coevolución entre el hospedador y los bacteriófagos, el desarrollo de bacterias resistentes induce a la aparición de nuevos bacteriófagos específicos aptos para infectarlas [34] [35]. Esta característica marca una diferencia importante con respecto a los antibióticos, que se vuelven ineficaces por siempre actuar bajo el mismo principio. Por consiguiente, un coctel de bacteriófagos o bacteriófagos individuales en mutación, como modificaciones estructurales en las fibras de su cola para unirse al receptor de la bacteria resistente, evadiendo ruptura por las endonucleasas de los patógenos resistentes, resultan en un aumento de la eficiencia del tratamiento, comparado con los antibióticos [36] [37].



**Figura 1.6.** Bacteriófago específico T7 diseñado para sobre expresar enzimas dispersinas B (DspB) que degradan las biopelículas de *Escherichia coli* [38].

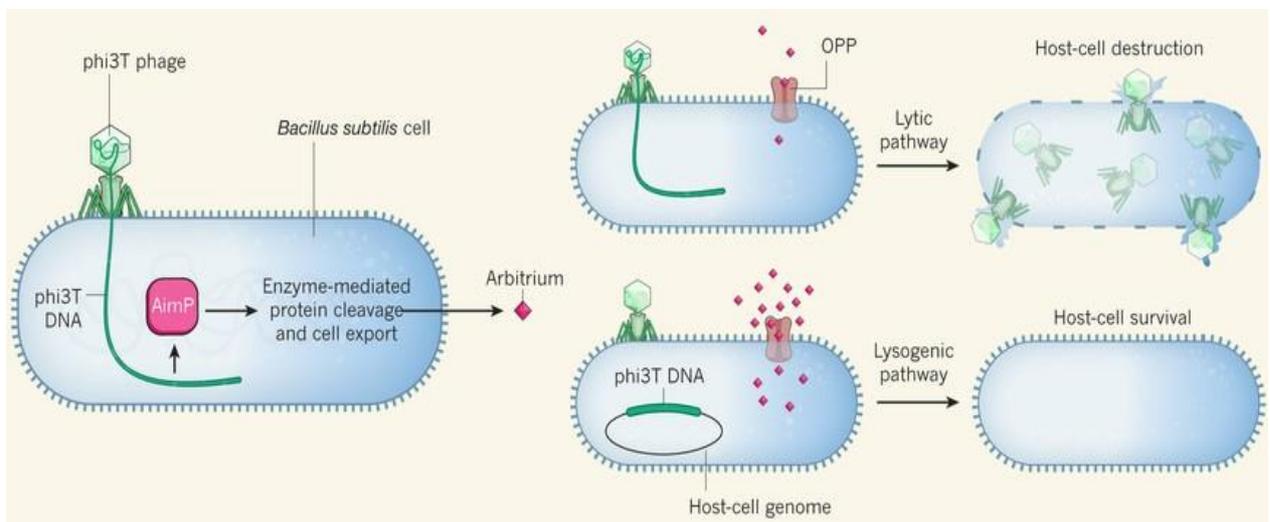
El “phage display” o despliegue de bacteriófagos es otra técnica empleada con bacteriófagos en camarones, que consiste en que se cargan bacteriófagos con péptidos o proteínas obtenidos del órgano linfoide y de esta forma, tratar enfermedades, como la enfermedad de la mancha blanca (WSD), causada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) [39].

#### 1.4.5.2 Comunicación viral *arbitrium*

Los bacteriófagos que infectan *Bacillus* secretan tres péptidos (*aimP*, *aimR* y *aimX*) mediadores de un tipo de comunicación viral denominado “*arbitrium*”, del latín “decisión” (Figura 1.7). Mediante esta comunicación, los bacteriófagos codifican tres moléculas para coordinar la decisión del ciclo lisis-lisogenia y preservar su existencia en función de la densidad viral. Los genes *aimP* codifican para péptidos (moléculas *arbitrium*) que son liberados al medio bacteriano. En tanto que, los genes *aimR* codifican para un péptido receptor *AimP* de estos péptidos que contabiliza la cantidad de bacteriófagos activos que codifican *aimP*. *AimR* a su vez activa la expresión de *aimX*, el regulador que bloquea la ruta de la lisogenia o promueve el ciclo lítico. De tal forma que, por mecanismos del regulador *aimX*, cuando la densidad viral es baja se activa el ciclo lísogénico, mientras que, a densidad virales altas se acumula las moléculas *arbitrium* y se activa el ciclo lítico pues si se eliminan todas las bacterias, las futuras generaciones se quedarán sin hospederos [40]. Resultando en una estrategia de supervivencia de los bacteriófagos para no extinguir a los hospederos bacterianos [41]. Además, las bacterias no presentan

lisis en presencia de un bacteriófago lítico cuando la bacteria ya ha sido previamente infectada por bacteriófagos lisogénicos, brindándole una “inmunidad” a una posterior infección de bacteriófagos de la misma especie [42] [40].

La diferencia de *arbitrium* con la comunicación “*quorum sensing*” de las bacterias patógenas es que el primero no es absoluto, pues, aunque exista gran cantidad de péptidos, sólo la mitad de las bacterias se lisogenizan, y la carencia de péptidos no obliga al bacteriófago a actuar como lítico [43].



**Figura 1.7.** Dinámica de la comunicación “*arbitrium*” en infecciones por fagos [40].

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

El análisis de factibilidad se realizó en dos etapas. En la primera etapa se colectó toda la información disponible sobre los bacteriófagos a nivel mundial y local, lo cual incluyó: a) investigación sobre los resultados de estudios aplicación de la fagoterapia en camarones peneidos, b) investigación sobre los métodos de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos, lo cual incluyó una corta experimentación para comprobar la facilidad de aislamiento de bacteriófagos líticos mencionada en la literatura, c) búsqueda de productos comerciales de bacteriófagos a nivel mundial y local, así como de patentes internacionales de bacteriófagos para el control de bacterias patógenas en cultivo de camarón y d) entrevistas a autoridades gubernamentales competentes sobre la industria acuícola, para conocer la situación actual con respecto a las medidas de control sanitarias aplicadas y la existencia de productos comerciales locales con permisos sanitarios.

La información colectada en la primera etapa sirvió para que finalmente en la segunda etapa se identificara los criterios de efectividad de productos antimicrobianos y se pudiera valorar la propuesta de aplicación de la fagoterapia en Ecuador, para lo cual se realizó los siguientes pasos secuenciales: a) identificación de los criterios, y respectivos indicadores cuantificables, que determinan la efectividad de productos antimicrobianos, b) validación de los criterios de efectividad de productos antimicrobianos, mediante una encuesta a técnicos que trabajan en la industria de cultivo de larvas de camarón, quienes además ponderaron los criterios en función de la importancia al momento de elegir un producto antimicrobiano y finalmente c) valoración de los criterios que determinan la efectividad y selección de productos antimicrobianos.

## **2.1 Información disponible sobre los bacteriófagos a nivel mundial y local**

### **2.1.1 Estudios aplicación de la fagoterapia en camarones peneidos**

La investigación se enfocó en los estudios de bacteriófagos aplicados para eliminar enfermedades a causa de *Vibrios* patógenos en camarones peneidos mediante mecanismos de acción lítico de los bacteriófagos. La información fue resumida en una tabla informativa donde se sintetiza la especie y estadio de camarón evaluados, patógeno y patología tratados, identificación del bacteriófago, tipo de experimentación y detalles del tratamiento de bacteriófagos, así como los principales resultados del estudio.

### **2.1.2 Métodos de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos**

Se investigó en la literatura sobre los métodos de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos y se seleccionó dos métodos específicos para la eliminación de bacterias del género *Vibrio*, por ser agentes bacterianos patógenos emergentes a nivel local. Los bacteriófagos fueron aislados de muestras colectadas en dos laboratorios de larvas de la provincia de Santa Elena, Ecuador (Laboratorios B y O). En cada uno de los laboratorios se muestreó agua de cuatro tanques de cultivo. Además, en uno de los laboratorios se colectó dos muestras de agua del canal de salida, para un total de diez muestras (Apéndice A). La fase experimental se realizó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas – CENAIM (San Pedro, Santa Elena, Ecuador). La cepa Ba94C2 de *V. parahaemolyticus*, causante de altas mortalidades por AHPND en juveniles [44] y larvas de camarón, fue utilizada como cepa bacteriana patógena para evaluar la presencia de fagos. Cada muestra fue evaluada por los dos métodos seleccionados de aislamiento, enriquecimiento y purificación, que son específicos para bacteriófagos que infectan bacterias del género *Vibrio* [45] [46], conocidos como vibriófagos. En cada caso, la cepa patógena fue activada en agar de tripticasa de soya (TSA, Difco) con NaCl al 2% durante 24 h a 30°C. Luego de la activación se tomó una colonia de la cepa patógena y se la diluyó en 50 mL de medio LB-Lennox (invitrogen), con adición de 2% de NaCl a 30°C por 4 h. Posteriormente, esta suspensión bacteriana fue ajustada a un OD<sub>600</sub> de 1.0, correspondiente a la escala 8 de la solución estándar de sulfato de Barium McFarland, y equivalente a una concentración bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC/mL.

### **2.1.2.1 Método con agua de mar artificial**

Las muestras de agua colectadas en los laboratorios de larvas fueron procesadas por un primer método de aislamiento y enriquecimiento de bacteriófagos en agua de mar artificial, siguiendo la metodología descrita en [45], desarrollada para el enriquecimiento de vibriófagos que lisan *V. alginolyticus*, con ligeras modificaciones implementadas en el presente estudio. Brevemente, cada muestra (100 mL) fue enriquecida con 10 mL de agua de mar artificial 10X (23.4 g/L NaCl, 24.7 g/L MgSO x 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g/L KCl y 1.43 g/L CaCl x 2H<sub>2</sub>O, pH 6.5) suplementada con 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, y 1 mL de suspensión bacteriana patógena a 28°C, siendo purificada dos veces. En la primera purificación, la suspensión enriquecida fue incubada a 28°C por 24 h y centrifugada a 4000 rpm. El sobrenadante fue filtrado (0.22 µm), y 20 µL del producto filtrado fue colocado en una caja Petri conteniendo Agar Marino al 1.5% de bactoagar, 10<sup>5</sup> UFC/mL de bacteria patógena y 100 mL de muestra. Luego de 12 h de incubación se procedió a la observación de ausencia o presencia de placas claras, considerando que la presencia de placas claras era una evidencia de bacteriófagos líticos. Las placas claras obtenidas en la primera purificación fueron cortadas en forma aséptica y procesadas para un segundo proceso de purificación en 10 mL de agua de mar artificial 1X con 100 µL del cultivo bacteriano patógeno, para llegar a una concentración de bacterias patógenas de 10<sup>6</sup> UFC/mL. La suspensión fue incubada por 24 h a 28°C, repitiendo el protocolo de centrifugado, filtrado y observación de ausencia o presencia de placas claras en cajas Petri. Todos los procedimientos fueron realizados por triplicado.

### **2.1.2.2 Método con medio TSB**

Las muestras de agua colectadas en los laboratorios de larvas fueron también procesadas por un segundo método de aislamiento y enriquecimiento de bacteriófagos en medio TSB, siguiendo el protocolo descrito en [46] desarrollado para vibriófagos que lisan *V. parahaemolyticus*, con ligeras modificaciones. Cada muestra (100 mL) fue enriquecida con 10 mL de medio de cultivo Tryptic Soy Broth (TSB) doblemente concentrado, suplementado al 2% de NaCl y 1 mL de suspensión bacteriana patógena. La suspensión fue incubada mediante baño María a 30°C por 18 h a 80 rpm. Posteriormente, se centrifugó por 30 min a 4000 rpm. El sobrenadante fue filtrado (0.22 µm), agregando cloroformo al 1% del volumen final (100 µL de cloroformo por cada 10

mL de muestra). Se incubó por 1 h a 80 rpm. En 100  $\mu$ L de césped bacteriano patógeno, se inoculó 30  $\mu$ L de ese producto en cajas Petri conteniendo medio de cultivo TSA suplementado con 2% de NaCl. Luego de 12 h de incubación a 28°C se procedió a la observación de ausencia o presencia de placas claras. Posteriormente, se realizó un proceso de purificación, donde las placas claras fueron cortadas en forma aséptica y procesadas en 10 mL de caldo TSB y 100  $\mu$ L de cloroformo. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se filtró el sobrenadante en membranas de 0.22  $\mu$ m. Se tomó 30  $\mu$ L del producto filtrado y se inoculó en cajas Petri conteniendo agar TSA con 100  $\mu$ L de cultivo bacteriano patógeno en la superficie para comprobar la presencia de placas claras. Este proceso de purificación se repitió tres veces. Se realizó el enriquecimiento del primer filtrado con 1 mL del sobrenadante junto con 200  $\mu$ L de bacteria en 5 mL de caldo TSB. Se incubó a 28°C por 24 horas y se volvió a filtrar (0,22  $\mu$ m) para inocular 30  $\mu$ L del sobrenadante en cajas Petri con agar TSA al 2% en 100  $\mu$ L de césped bacteriano por 12 horas. Todos los procedimientos fueron realizados por triplicado.

### **2.1.3 Productos comerciales y patentes internacionales de bacteriófagos para cultivo de camarón**

Se realizó una búsqueda de patentes de formulaciones con bacteriófagos para el cultivo de camarón, utilizando Google Patents como motor de búsqueda, con el objetivo de estimar el nivel de desarrollo de este agente antimicrobiano. La búsqueda incluyó las siguientes clases de patentes internacionales:

- C12N7/00: Virus, bacteriófagos, composiciones de estos, preparación o purificación de los mismos.
- C12N2795/00011: Bacteriófagos.
- C12N2795/00032: Uso de virus como agente terapéutico, distinto de la vacuna; por ejemplo, como agente citolítico.
- G01N2333/005: Ensayos que involucran materiales biológicos de organismos específicos de una naturaleza específica de virus.
- A23K50/80: Piensos especialmente adaptados para animales particulares para animales acuáticos.
- A61K35/76: Virus, partículas subvirales, bacteriófagos.

- C12N2795/10121: Virus como tales, por ejemplo, nuevos aislados, mutantes o sus secuencias genómicas.
- A01K61/00: Cultivo de animales acuáticos.
- A61P31/04: Agentes antibacterianos
- C12N2795/10251: Métodos de producción o purificación de material viral.
- A61K35/74: Bacteria

Para la búsqueda de los productos comerciales internacionales, se realizó un seguimiento bibliográfico a las patentes encontradas, bajo las mismas especificaciones descritas en la búsqueda de patentes. La búsqueda de productos comerciales nacionales se realizó en el listado de productos comerciales con Registro Sanitario Unificado publicado en la página del Web del Instituto Nacional de Pesca, actualizado hasta julio 2018 [47].

#### **2.1.4. Entrevistas a autoridades gubernamentales de la industria acuícola**

Se entrevistó a técnicos de la Subsecretaría de Acuicultura y de la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad, Autoridades Competentes en los temas de Regulación Acuícola y Sanidad, respectivamente. El objetivo de las entrevistas (Apéndice B) fue verificar la existencia local o no de productos comerciales elaborados con bacteriófagos para el control de bacterias patógenas o uso acuícola en general en el Ecuador, regulaciones del uso de antimicrobianos y procesos a seguir para que un producto de origen biológico pueda ser expandido en el país. Las entrevistas se realizaron mediante reuniones virtuales en la plataforma de Zoom.

## **2.2. Análisis de factibilidad de la aplicación de fagoterapia**

### **2.2.1. Identificación de criterios e indicadores cuantificables de efectividad y selección de productos antimicrobianos**

En base a la información analizada sobre los bacteriófagos a nivel mundial y local se identificó los siguientes criterios de efectividad antimicrobiana y los que podrían ser utilizados por los productores para seleccionar productos antimicrobianos, considerando que el criterio más importante para estos sería la efectividad antimicrobiana:

*Eficacia antimicrobiana.* Agrupando a los diferentes aspectos técnicos que tornan efectivo a un agente antimicrobiano, lo que incluye: principales modos de acción de los agentes antimicrobianos, espectro de patógenos que pueden ser tratados y protocolos de administración más eficientes para suplementar la menor cantidad de antimicrobiano posible.

*Impacto ambiental.* Refiriéndose a los aspectos adecuados que deberían tener los productos antimicrobianos amigables con el medio ambiente para garantizar la inocuidad del camarón cultivado y minimizar el riesgo de toxicidad, tanto al sistema de cultivo, como al ambiente fuera de las instalaciones comerciales.

*Disponibilidad de productos comerciales.* Representando la disponibilidad de productos comerciales, o en su defecto la facilidad para obtener registros sanitarios.

*Capacidad tecnológica local.* Refiriéndose a los aspectos técnicos necesarios que permitirían obtener productos antimicrobianos específicos para prevenir y o tratar patógenos locales.

*Costos, comercialización e interés por usar el producto.* Enfocando los aspectos económicos e interés por usar o comercializar los productos antimicrobianos.

Por su lado, los indicadores cuantificables de los criterios de efectividad y selección de antimicrobianos que se identificaron son resumidos y explicados en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Descripción de los indicadores empleados para evaluar los criterios que debe tener un buen producto antimicrobiano.

<b>Criterio de efectividad y selección</b>	<b>Indicadores cuantificables</b>	<b>Descripción del indicador</b>
<b>Eficacia antimicrobiana</b>	Alta plasticidad para prevenir y/o tratar un amplio rango de patógenos	Alta especificidad del producto para eliminar la bacteria objetivo y la posibilidad de ampliar su espectro a más bacterias definidas [48]
	Baja resistencia bacteriana	Posibilidad mínima de acción antimicrobiana deficiente a causa de bacterias resistentes.
	Efecto bactericida sobre patógenos	Elimina totalmente las bacterias que causan la enfermedad que presenta en el cultivo
	Efecto bacteriostático sobre patógenos	Inhibe el crecimiento de las bacterias que causan la enfermedad que presenta el cultivo
	Reducción de biopelículas bacterianas	Capacidad del producto antimicrobiano de romper la matriz extracelular de biopelículas bacterianas [49]
	Efectividad a dosis bajas	Eliminación de patógenos con cantidades no exuberantes del producto antimicrobiano
	Baja frecuencia de administración	No requiere administraciones continuas o tratamientos prolongados
	Administración directa al tanque de cultivo	El producto antimicrobiano es aplicado en los tanques de cultivo de forma inmediata sin necesidad de intermedios como bioencapsulación [50]
	A mayor concentración de patógeno aumenta la acción antimicrobiana.	Capacidad del producto de aumentar su número en presencia de su patógeno objetivo durante la acción antimicrobiana [51]
<b>Impacto ambiental</b>	Bajo riesgo de generar bacterias resistentes en el ambiente	Combate la multiresistencia bacteriana a través de mecanismos como mutación, evitando impactos ambientales negativos [52]
	Inocuidad	La especie tratada con el producto antimicrobiano no presenta daños futuros al ser ingerido por otros seres vivos [51]
	Sin residualidad en tejidos de especie de cultivo	La especie tratada puede ser cosechada independiente del tiempo en que fue aplicado el producto antimicrobiano. No posee un período de carencia [53]
	Conservación de la microbiota de la especie de cultivo	No afecta a las bacterias benéficas del medio natural de la especie cultivada y su ambiente
	Producto antimicrobiano natural	Productos antimicrobianos de origen totalmente natural
<b>Disponibilidad de productos comerciales</b>	Productos disponibles en el mercado	Productos antimicrobianos comerciales locales e internacionales
	Facilidad de obtener registros sanitarios	Existencia de procedimientos claros por parte del ente regulatorio correspondiente para obtener el registro sanitario de un producto antimicrobiano nacional e internacional [54] [55]
<b>Capacidad tecnológica local</b>	Abundancia y diversidad en medio natural para obtener antimicrobianos específicos	En los ecosistemas, medios acuáticos locales se encuentra en abundancia y diversidad el componente principal del producto antimicrobiano

<b>Criterio de efectividad y selección</b>	<b>Indicadores cuantificables</b>	<b>Descripción del indicador</b>
	Capacidad para producción local	Las empresas del medio local cuentan con infraestructura y equipos para llevar a cabo el proceso de elaboración de un producto antimicrobiano, desde pruebas <i>in vitro</i> hasta su comercialización
<b>Costos, comercialización e interés por usar el producto</b>	Costos de elaboración bajos para el productor de larvas	El costo de producción de una unidad de producto antimicrobiano es menor al de la competencia o en su defecto permite obtener un ingreso bruto mayor
	Aceptación/Interés de productores en utilizarlo	Acogida de los productores de larvas por el producto antimicrobiano
	Interés de compañías para producción y comercialización	Interés de empresas en elaborar un producto antimicrobiano que cubra las necesidades del medio local

## **2.2.2 Validación, ponderación de los criterios de efectividad y selección de productos antimicrobianos**

Los cinco criterios identificados en el paso anterior fueron validados mediante una encuesta a 17 técnicos que trabajan en la industria de cultivo de larvas de camarón (14 técnicos de laboratorios de larvas, 1 patólogo y 1 ejecutivo de ventas de insumos para acuicultura). Para lo cual, se pidió a cada técnico que puntuaran entre 0 a 5 la importancia de cada uno de los cinco criterios, en términos de efectividad antimicrobiana y criterios de selección para su uso en las instalaciones de producción. Esta puntuación fue luego promediada ( $n = 17$ ) y la suma de los cinco promedios fue llevada a 100%.

En las encuestas, además, se incluyó otras preguntas, con el objetivo de conocer los protocolos de control de enfermedades bacterianas utilizados en los cultivos larvarios, productos que utilizan para contrarrestar estos efectos, estadios larvarios de mayor susceptibilidad a enfermedades bacterianas y el conocimiento sobre la existencia de los bacteriófagos como estrategia potencial para controlar bacterias patógenas (Apéndice C). Las encuestas se realizaron mediante reuniones virtuales vía Zoom y Google Forms.

### **2.2.3 Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos**

Los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos fueron ponderados por 3 investigadores con experiencia en desarrollo de probióticos y por los autores, y posteriormente promediados ( $n = 4$ ). De tal forma que, la suma de las ponderaciones de cada grupo de indicadores de una determinada categoría totalizó el valor ponderado de la categoría, obtenido a través de las encuestas a los técnicos que trabajan en la industria de cultivo de larvas de camarón.

Posteriormente, cada una de las personas previamente mencionadas calificó la efectividad antimicrobiana de los bacteriófagos, usando los indicadores previamente identificados, con un valor entre 0, 1, 2 y 3. El valor 0 correspondió a casos en los que no se cumplía el indicador, mientras que 1, 2 y 3 correspondieron a un desempeño bajo, intermedio y alto del indicador para el respectivo antimicrobiano. Luego, se obtuvo un valor promedio de desempeño para indicador ( $n = 4$ ). La valoración también incluyó a los antibióticos, por ser el antimicrobiano tradicional que anteriormente se usaba, y a los probióticos por ser el más utilizado al momento.

Finalmente, para cada uno de los antimicrobianos se sumó los valores obtenidos en todos los indicadores.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Información disponible sobre los bacteriófagos a nivel mundial y local

#### 3.1.1. Estudios de aplicación de la fagoterapia en camarones peneidos

La mayoría de los estudios de bacteriófagos líticos han sido realizado para camarones *Penaeus monodon*, aunque existen algunos estudios ejecutados para camarones *P. vannamei* (Tabla 3.1). Las evaluaciones han sido realizadas principalmente para larvas de camarón, aunque también existen estudios aplicados en engorde. Los principales patógenos tratados son *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Contrariamente a lo esperado, no sólo se encontraron estudios *in vitro*, sino que varias de las investigaciones han sido aplicadas, probando bacteriófagos inclusive en instalaciones comerciales. Los resultados de los estudios muestran consistentemente que los bacteriófagos en general disminuyeron la infección y virulencia de los Vibrios tratados.

#### 3.1.2 Métodos de detección, aislamiento y purificación de bacteriófagos

##### 3.1.2.1 Método con agua de mar artificial

Se obtuvo placas lisogénicas desde la primera purificación del método de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos en agua de mar artificial. Estas placas se detectaron por la característica de mancha turbia, definida por Kunapuli et al. 2010 [56]. En la segunda purificación las mismas muestras presentaron características diferentes, con centros oscuros y halos turbios, definidas como indicadoras de difusión de polimerasas que rompen las cápsulas de los Vibrios, y por lo tanto causantes de la disminución de color del césped bacteriano [57]. Esta es una cualidad deseable para la fagoterapia, ya que se han descrito que las cápsulas bacterianas son un factor de virulencia que facilita la formación de las biopelículas [58]. Sin embargo, al realizar la tercera purificación, la capacidad de realizar este rompimiento fue casi nula, observándose solamente la presencia de profagos.

**Tabla 3.1. Resumen de aplicaciones de bacteriófagos en cultivos de camarones**

***Penaeus monodon* y *Penaeus vannamei*.**

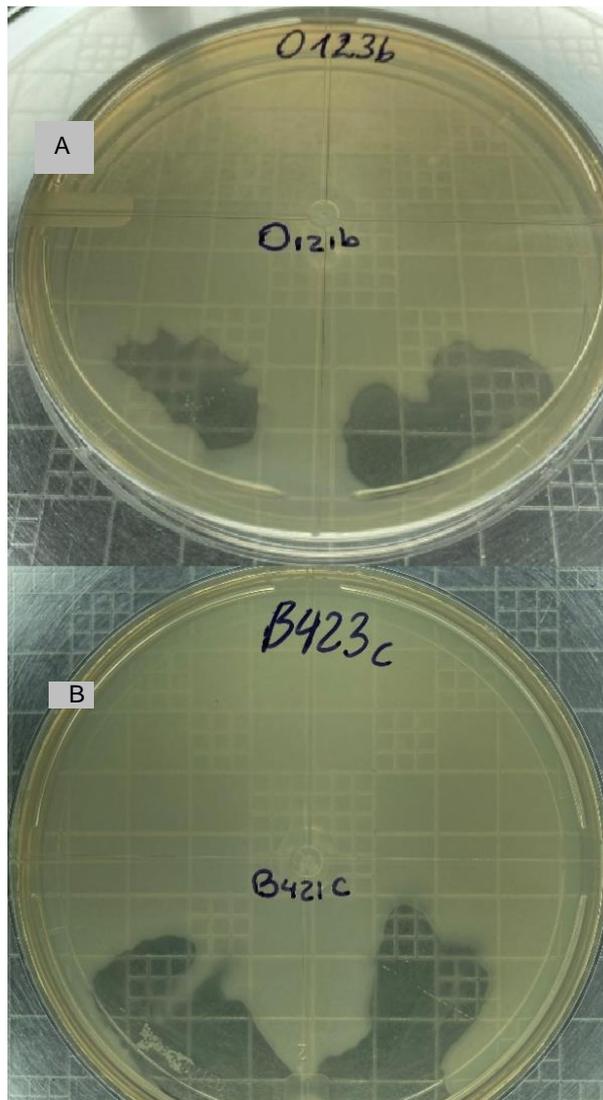
Patógeno	Patología	Especie evaluada	Estadio/ Peso	Tipo de aplicación y detalles del tratamiento	Resultado	Ref.
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vibriosis	<i>Penaeus vannamei</i>	Nauplio III	En campo 2 fagos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplicación 6 h antes de infección evitó mortalidad</li> <li>• Aplicación 6 h después de infección limitó mortalidad y disminuyó la infección.</li> </ul>	[59]
<i>V. alginolyticus</i> <i>V. harveyi</i> , <i>V. azureus</i> , <i>V. brasiliensis</i> , <i>V. proteolyticus</i> <i>V. natriegens</i>	Vibriosis	<i>Penaeus vannamei</i>	Desde Nauplio V	En campo 69 fagos aislados de larviculturas de camarón	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fagos presentes en todos los tanques y etapas larvianas</li> <li>• <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. harveyi</i> más susceptibles a 43 y 10 fagos, respectivamente.</li> <li>• Otros vibrios solo fueron infectados por un fago específico</li> <li>• Relación directa entre No. de fagos líticos e incidencia de vibrios</li> <li>• Decrecimiento de vibrios con diversidad de bacteriófagos</li> <li>• Fagos lisogénicos incidieron en virulencia del patógeno.</li> </ul>	[11]
<i>V. harveyi</i>	Vibriosis luminiscente	<i>Penaeus monodon</i>	PL 5	<i>In vitro</i> y en campo Fagos familia <i>Siphoviridae</i> Aislados de ostras y larvicultura de camarón	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>: Capacidad lítica del 70 y 68% de fagos aislados de ostras y larvicultura de camarón. En campo: 88% supervivencia larval con cóctel de fagos vs 65-68% supervivencia tratados con oxitetraciclina y kanamicina.</li> </ul>	[60]
**	Vibriosis sistémica	<i>Penaeus vannamei</i>	PL10	En campo Formulación de fagos, sin especificar especies	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estanques con fagos: 88% supervivencia, 1.6 FCR y rendimiento 4176 kg/ha vs Estanques con probióticos: 77% supervivencia, 1.8 FCR y 3678 kg/ha</li> </ul>	[61]
<i>V. harveyi</i>	Vibriosis luminiscente	<i>Penaeus monodon</i>	PL 18	En campo Fagos aislados de granjas camaroneras	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supervivencia: 86% y eliminación completa de patógenos con tratamiento de fagos vs 40% con antibióticos. Se volvió a detectar bacterias patógenas luego de 48 horas de aplicación del antibiótico</li> </ul>	[62]
<i>V. harveyi</i>	Vibriosis luminiscente	<i>Penaeus monodon</i>	Larvas (no específica)	<i>In vitro</i> Fagos de la familia Myoviridae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adición de mitomicina C estimuló la lisis bacteriana en posibles profagos presentes en la infección.</li> <li>• Ultracentrifugación, mejor método para concentrar y aislar bacteriófagos</li> </ul>	[63]
<i>V. harveyi</i>	Vibriosis luminiscente	**	Larvas (no específica)	<i>In vitro</i> 6 fagos familia <i>Siphoviridae</i> y 1 <i>Myoviridae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todos los bacteriófagos presentaron conducta lítica contra <i>V. harveyi</i>.</li> </ul>	[64]
<i>V. parahaemolyticus</i>	AHPND	<i>Penaeus vannamei</i>	Juveniles 1,02 g	En campo 1 fago	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 50% mortalidad de camarones tratados con el</li> </ul>	[65]

					fago vs mortalidades masivas del control	
<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. alginolyticus</i>	Vibriosis	<i>Penaeus monodon</i>	Postlarvas con 45 días de cultivo	En campo 1 fago familia <i>Myoviridae</i>	• 80 y 90% supervivencia con una sola aplicación y aplicación continua de 0,1 mL/día de fagos por 72 horas vs 31% supervivencia del control	[66]
<i>V. parahaemolyticus</i>	AHPND	**	20 g	Coctel de fagos anti-PirA y PirB	• Disminución de mortalidad	[67]
<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>V. harveyi</i>	Vibriosis sistémica	<i>Penaeus monodon</i>	Juveniles	<i>In vitro</i> 5 fagos familia <i>Myoviridae</i>	• Mejor especificidad de inhibición para todas las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> con un fago	[68]
<i>V. harveyi</i>	Vibriosis luminiscente	<i>Penaeus monodon</i>	**	<i>In vitro</i> 1 fago	• Amplia gama de hospedadores para infectar las 7 cepas probadas de <i>V. harveyi</i> . • Rangos amplios de temperaturas y pH, útiles para aplicarlos en distintos entornos.	[69]
<i>V. vulnificus</i>	Vibriosis	**	**	<i>In vitro</i> 4 fagos familia <i>Tectiviridae</i>	• 70-75% de inhibición de <i>V. vulnificus</i>	[70]

FCR: Factor de conversión alimenticia. \*\* No específica

### 3.1.2.2 Método con medio TSB

Para el método de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos en medio TSB, se obtuvieron resultados de formación de placas lisogénicas y líticas. Estas últimas fueron retiradas para la segunda purificación realizada con caldo TSB y cloroformo, teniendo como resultado la formación de placas atemperadas. Mientras que, en la tercera purificación se obtuvo para algunas muestras de ambos laboratorios de larvas placas totalmente líticas luego de 12 horas de incubación (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Placas líticas de muestras de agua de los dos laboratorios de larva muestreados, obtenidas en la tercera purificación mediante el método de aislamiento, enriquecimiento y purificación de bacteriófagos en medio TSB. A) Placas líticas de muestra de agua del laboratorio O. B) Placas líticas de muestras de agua del laboratorio B.

### **3.1.3 Productos comerciales y patentes internacionales para cultivo de camarón**

Durante la búsqueda bibliográfica solo se identificó 3 productos comerciales de bacteriófagos para camarón de cultivo, provenientes exclusivamente de la India (Tabla 3.2), y ningún producto comercializado en el Ecuador. Sin embargo, si se encontró varias patentes con formulaciones con bacteriófagos (Tabla 3.3).

**Tabla 3.2.** Productos comerciales de bacteriófagos para el control de bacterias patógenas en cultivos de camarón.

<b>Producto comercial</b>	<b>Empresa</b>	<b>Patógeno</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
Vibrioshield	Aristogene Biosciences PVT.LTD	<i>Vibrios sp.</i>	Bangalore, India	[71]
Elixir	Aristogene Biosciences PVT.LTD	<i>Vibrio harveyi</i>	Bangalore, India	[72]
LUMI-NIL MBL	Mangalore Biotech Laboratory	Bacterias luminiscentes (cepas de <i>V. harveyi</i> )	Mangalore, India	[73]

**Tabla 3.3.** Patentes internacionales de bacteriófagos aplicados en camarón.

<b>Código de patente</b>	<b>Descripción</b>	<b>Países licenciados</b>	<b>Ref.</b>
<b>ES2523316T3</b>	Bacteriófagos como agentes selectivos	España, Polonia, Canadá, Estados Unidos	[74]
<b>KR101329639B1</b>	Nuevo bacteriófago asp-1 y uso para prevención de proliferación de <i>Aeromonas salmonicida</i>	Corea del Sur	[75]
<b>US9504721B2</b>	Bacteriófago y su uso para prevenir la proliferación de bacterias patógenas	Estados Unidos	[76]
<b>CN109207440A</b>	Vibriófago, método de preparación y aplicación de composición bactericida	China	[77]
<b>CN105331587B</b>	Una especie de fago de <i>v.parahaemolyticus</i> , su método de preparación y aplicación.	China	[78]
<b>US10188121B2</b>	Tratamiento con bacteriófagos para reducir y prevenir la contaminación bacteriana en un producto alimenticio cárnico	Estados Unidos	[79]

### 3.1.4 Entrevistas a autoridades gubernamentales de la industria acuícola

Las autoridades del área acuícola informaron que no existen productos basados en bacteriófagos comercializados en Ecuador, pero sí es posible obtener respectivos registros sanitarios, ya que no hay una prohibición para distribuir ese tipo de agente antimicrobiano. A continuación, se detalla los principales resultados del análisis de las entrevistas.

- Para que un nuevo producto antimicrobiano o procedimiento pueda ser aplicado debe cumplir con dos fases: una fase investigativa-experimental, cuya normativa la proporciona la Ley Orgánica para el Desarrollo de Pesca y Acuicultura, y es canalizada por la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad y el Instituto Nacional de Pesca. La segunda fase es la de registro del producto por parte de la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad.
- Como medida para el control de antibióticos en laboratorios y camaroneras está el Plan Nacional de Control [80], a través del cual se hacen verificaciones *in situ*, y dentro de estas verificaciones hay un apartado sobre el uso de insumos acuícolas. Los parámetros de mínimos y máximos residuales son establecidos por la Subsecretaria de Calidad e Inocuidad. Cuando se detecta que la cantidad de antibióticos está sobre los máximos residuales, el establecimiento recibe una sanción, que puede llevar a una “no conformidad” del establecimiento, esto quiere decir que no puede comercializar su producto. No es muy común que ocurra esto, debido a que el camarón es de exportación, por lo que los análisis no sólo se realizan en Ecuador, sino que el país de destino también los efectúa. Cuando hay un problema con el uso de antibióticos, se canaliza a través de las autoridades oficiales de origen. Cuando hay una alerta, se comunica al país (en este caso Ecuador) y quién recibe la notificación es la Subsecretaria de Calidad e Inocuidad y esta toma las acciones correctivas correspondientes.
- La Subsecretaria de Acuicultura autoriza a las personas naturales y jurídicas para que puedan importar insumos para la industria acuícola; mientras que, la Subsecretaria de Calidad e Inocuidad es la institución que certifica a través de un registro, el uso, movilidad y tenencia de todos los productos de uso acuícola.

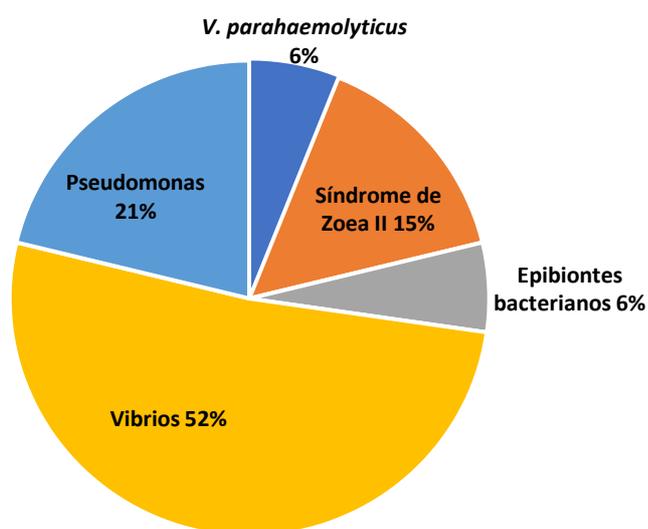
- Para la obtención del registro sanitario unificado de insumos y productos veterinarios de uso pesquero y acuícola elaborados en el país se debe ingresar al portal de Ecuapass, Ventanilla Única Ecuatoriana (VUE), formulario 130-016. Entre los requisitos más importantes se tiene que presentar un análisis bromatológico, físico, químico, organoléptico y microbiológico del producto terminado, realizado por un laboratorio acreditado bajo la Norma ISO/EC/17025/ y de ser necesario se harán análisis de nitrofuranos, cloranfenicol, aflatoxinas totales, melanina, verde malaquita, leucoverde malaquita y otros. También debe ser consignado en un protocolo y diagrama de flujo de producción que corrobore el cumplimiento de todos los controles y especificaciones del tipo de producto [54].
- En el caso de las importaciones, se debe ingresar a través de Ecuapass, VUE, formulario 130-016, presentar los análisis anteriormente descritos. Además, presentar el dictamen emitido por SENA E de la consulta de clasificación arancelaria de la mercancía, reglamento al COPCI, Libro V, Art. 89-91. Registro oficial 452 de 19 de mayo de 2011, para conocer la sub-partida arancelaria de la mercancía. Se debe presentar la autorización del fabricante para registrar y poder comercializar el producto a nivel nacional con la composición declarada del producto [55].
- Además de estos requisitos se debe cumplir con el Acuerdo 412, donde se exige tener un Acuerdo Ministerial para desarrollar actividades conexas en el ámbito acuícola, y la presentación del proceso de fabricación y flujograma de acuerdo con lo establecido en el Acuerdo Ministerial 008A-2017.

### 3.2. Análisis de factibilidad de la aplicación de fagoterapia

#### 3.2.1 Validación y ponderación de los criterios de efectividad y selección de productos antimicrobianos

Los cinco criterios de efectividad y selección de productos antimicrobianos validados por los técnicos que trabajan en la industria de cultivo de larvas de camarón alcanzaron las siguientes ponderaciones: Eficacia antimicrobiana: 25%, impacto ambiental: 20%, disponibilidad de productos comerciales: 15%. Capacidad tecnológica local: 20% y, costos, comercialización e interés por usar el producto antimicrobiano: 20%.

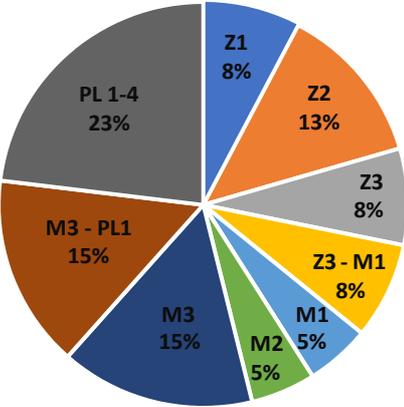
Por otro lado, los resultados de las encuestas mostraron que las bacterias patógenas que generalmente afectan a los cultivos larvarios son *Vibrios spp.* (52%), especialmente *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Al momento están presentando problemas causados por una mezcla de *Vibrios* (52%) y *Pseudomonas* (21%) (Figura 3.2).



**Figura 3.2. Principales enfermedades y bacterias patógenas presentadas en laboratorios de larvas de camarón.**

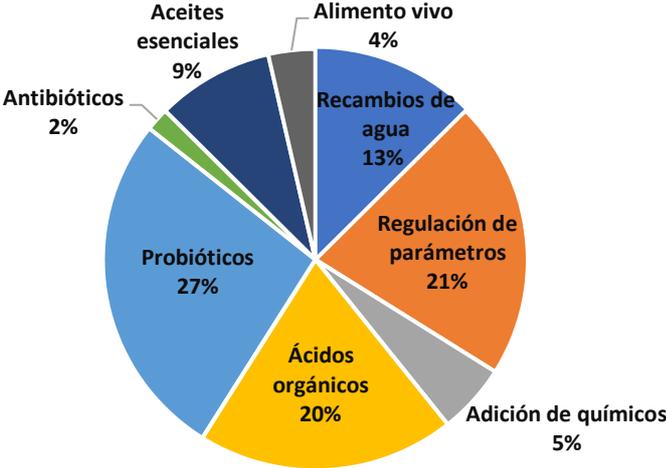
Las etapas del ciclo larvario que consideran más críticas para contraer enfermedades bacterianas son las consideradas “transiciones fuertes” (Figura 3.3). Estas transiciones son Mysis III (15%); Mysis III a Postlarva (15%), y de Postlarva 1 a 4 (23%). Se consideran críticas porque son las etapas donde la larva necesita focalizar su energía en

realizar los cambios fisiológicos que necesita, ocasionando que la alimentación del animal sea mermada y, por ende, la probabilidad de mortalidad aumente.



**Figura 3.3.** Etapa del desarrollo larval más susceptible a contraer enfermedades bacterianas.

Los principales antimicrobianos son los probióticos (27%) (Figura 3.4). También se mencionó como otras medidas utilizadas a: regulación de parámetros (21%), ácidos orgánicos (20%), recambio de agua (13%), aceites esenciales (9%), adición de químicos (5%) como hipoclorito de sodio y vitamina C en una menor proporción. Un 2% de los productores encuestados mencionó utilizar antibióticos.



**Figura 3.4.** Medidas físicas, químicas y biológicas mayormente aplicadas por los productores a los tanques de larvicultura cuando hay enfermedades bacterianas.

El 94% de los encuestados no ha aplicado un tratamiento con formulación de bacteriófagos en sus cultivos. Sin embargo, el 82% de ellos estarían dispuestos a probarlos en sus instalaciones.

### **3.2.2 Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos**

El análisis comparativo entre productos antimicrobianos dio como resultado que, los bacteriófagos alcanzaron un valor de factibilidad de aplicación del 76%, similar al obtenido por los probióticos (74%), en contraste con el 29% obtenido por los antibióticos, que presentaron claras desventajas como producto antimicrobiano para cultivo de camarón (Tabla 3.4). Los indicadores de factibilidad con mejor puntuación para los bacteriófagos fueron: baja resistencia bacteriana, abundancia y diversidad en el medio natural, capacidad para producción local y costos de elaboración bajos.

Los productos antimicrobianos evaluados son: BL = bacteriófagos líticos, A = Antibióticos y P = Probióticos. Cada uno de los valores en las tres columnas de productos antimicrobianos representa el promedio de 4 calificaciones (3 investigadores con experiencia en desarrollo de probióticos y los autores), que calificaron entre 0, 1, 2 y 3. Donde, el valor 0 correspondió a casos en los que no se cumplió el indicador, mientras que 1, 2 y 3 correspondieron a un desempeño bajo, intermedio y alto del indicador. Las columnas de valor ponderado corresponden a los valores llevados al valor ponderado de cada indicador.

**Tabla 3.4.** Valoración de los indicadores de efectividad y selección de productos antimicrobianos.

Criterio de efectividad y selección	Indicadores cuantificables	Ponderación (%)	Producto Antimicrobiano			Valor ponderado (%)		
			BL	A	P	BL	A	P
<b>Eficacia antimicrobiana (25%)</b>	Alta plasticidad para prevenir y/o tratar un amplio rango de patógenos	0.83	2.75	1.25	1.50	0.76	0.35	0.42
	Baja resistencia bacteriana	12.50	3.00	0.75	0.00	12.50	3.13	0.00
	Efecto bactericida sobre patógenos	0.83	2.50	2.00	0.50	0.69	0.55	0.14
	Efecto bacteriostático sobre patógenos	0.83	2.00	3.00	2.00	0.55	0.83	0.55
	Reducción de biopelículas bacterianas	7.50	1.25	0.00	1.75	3.13	0.00	4.38
	Efectividad a dosis bajas	0.25	2.50	0.00	1.75	0.21	0.00	0.15
	Baja frecuencia de administración	0.25	2.50	0.25	0.75	0.21	0.02	0.06
	Administración directa al tanque de cultivo	0.25	3.00	1.75	2.00	0.25	0.15	0.17
	A mayor concentración de patógeno aumenta la acción antimicrobiana	1.75	3.00	0.00	1.00	1.75	0.00	0.58
<b>Impacto ambiental (20%)</b>	Bajo riesgo de generar bacterias resistentes en el ambiente	8.00	3.00	0.00	2.50	8.00	0.00	6.67
	Inocuidad	3.87	3.00	0.25	2.75	3.87	0.32	3.55
	Sin residualidad en tejidos de especie de cultivo	3.87	3.00	0.25	2.75	3.87	0.32	3.55
	Conservación de la microbiota de la especie de cultivo	3.87	3.00	0.25	3.00	3.87	0.32	3.87
	Producto antimicrobiano natural	0.40	3.00	0.00	3.00	0.40	0.00	0.40
<b>Disponibilidad de productos comerciales (15%)</b>	Productos disponibles en el mercado	10.50	1.00	1.50	3.00	3.50	5.25	10.50
	Facilidad de obtener registros sanitarios locales	4.50	1.00	3.00	3.00	1.50	4.50	4.50
<b>Capacidad tecnológica local (20%)</b>	Abundancia y diversidad en medio natural para obtener antimicrobianos específicos	10.00	3.00	0.75	2.50	10.00	2.50	8.33
	Capacidad para producción local	10.00	2.00	1.25	2.00	6.67	4.17	6.67
<b>Costos, comercialización e interés por usar el producto (20%)</b>	Costos de elaboración bajos para el productor de larvas	6.67	3.00	2.00	3.00	6.67	4.45	6.67
	Aceptación/Interés de productores en utilizarlo	6.67	2.00	1.00	3.00	4.45	2.22	6.67
	Interés de compañías para producción y comercialización	6.67	1.25	0.00	3.00	2.78	0.00	6.67
<b>Ponderación total de indicadores</b>		<b>100</b>	<b>Total de valores ponderados</b>			<b>75.62</b>	<b>29.08</b>	<b>74.48</b>

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

Se logró evaluar la factibilidad técnica y ambiental de la aplicación de la fagoterapia para el control de bacterias patógenas en cultivo de larvas de camarón. Este estudio tiene como finalidad que los protagonistas de la industria camaronera del país consideren que se puede trabajar en nuevas alternativas naturales frente a los productos antimicrobianos convencionales. Para elaborar el estudio de factibilidad, se hizo una revisión bibliográfica acerca de los productos antimicrobianos más usados, los bacteriófagos y sus mecanismos de acción. Se destaca que, los bacteriófagos son virus altamente específicos, es decir que no infectan el microbioma circundante mediante la característica lítica. Los bacteriófagos infectan la bacteria patógena, se replican provocando la lisis celular y de esta forma liberan nuevos bacteriófagos. Los estudios de aplicación revisados y reunidos en una tabla informativa demuestran porcentajes altos de supervivencia, tales como 86%, en tratamientos a base de bacteriófagos, que en su mayoría pertenecían a la familia *Siphoviridae* y *Myoviridae* (Apéndice D). En comparación a controles como antibióticos y probióticos en desafíos *in vitro* y en campo teniendo como antagonista común a bacterias del género *Vibrio*.

Como segunda fase, se realizó un ensayo para evaluar dos mecanismos de detección y aislamiento de bacteriófagos. El primer método utilizó como medio de cultivo agua de mar artificial y se obtuvo placas lisogénicas, las cuales al estar en una fase quiescente que no lisa la célula objetivo, no son ideales como producto antimicrobiano. A pesar de que, presentaron halos turbios alrededor de la infección, sinónimo de acción de enzimas que degradan las cápsulas bacterianas, no es recomendable para la fagoterapia, ya que algunos estudios los evalúan como posibles factores de virulencia. Por el contrario, el segundo método, donde se usó TSB como medio, y cloroformo para eliminar residuos bacterianos, presentó placas líticas, ideales para la terapia de bacteriófagos por su acción bactericida, donde las bacterias son lisadas y no vuelven a ser viables. Calidad que supera a los probióticos y a algunos antibióticos que actúan inhibiendo el crecimiento.

Uno de los factores importantes en un estudio de factibilidad es conocer la existencia de productos comerciales y patentes de bacteriófagos. Dentro de esta indagación se encontró como principal impulsor y productor de bacteriófagos como antimicrobianos a la India, con productos como Vibrioshield y Elixir para tratar *Vibrios sp.* y *V. harveyi* respectivamente. Además de LUMI-NIL MBL para tratar bacterias luminiscentes (cepas de *V. harveyi*). Entre las patentes que se destacan se tiene: US9504721B2, la cual es originaria de Estados Unidos y patenta un bacteriófago y su uso para prevenir la proliferación de bacterias patógenas. Por otro lado, CN109207440A es una patente de China para un vibriófago, método de preparación y aplicación de composición bactericida. Otro ejemplo es la patente CN105331587B de China, la cual respalda una especie de bacteriófago de *V. parahaemolyticus*, su método de preparación y aplicación. Esto demuestra que algunos países productores de camarón están haciendo ensayos para finalmente elaborar productos antimicrobianos con bacteriófagos, o en su defecto patentando procedimientos de aplicación de estos.

Es importante conocer la realidad que enfrentan los productores de larvas del litoral ecuatoriano cuando ocurren eventos de enfermedades bacterianas. Por lo que se realizó una encuesta y se obtuvo como resultados más importantes que la bacteria patógena que más afecta a este sector es de género *Vibrio spp.* (52%) especialmente por *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, además de presentar *Pseudomonas* (21%), sumado a la particularidad mencionada en algunos casos que presentan una enfermedad no identificada por la mezcla de ambos patógenos, la cual está siendo analizada por investigadores del área. Asimismo, los productores mencionaron que las etapas larvales más susceptibles a enfermedades bacterianas de acuerdo con sus experiencias son de PL 1 a 4 (23%), debido a que son etapas donde la larva realiza cambios fisiológicos y canaliza su energía hacia estos, provocando que la alimentación sea mermada y de esta forma aumenta la probabilidad de mortalidad. Como principales medidas para contrarrestar los efectos de las bacterias patógenas se tiene: suministro de probióticos (27%), regulación de parámetros (21%) y uso de ácidos orgánicos (20%). Al consultarle a los productores si han aplicado fagoterapia en sus cultivos, el 94% afirmó que no. Sin embargo, luego de explicarles su potencial uso como producto antimicrobiano, el 82% estaría dispuesto a realizar una experimentación en sus cultivos. Esto último remarca

que los productores locales están interesados en alternativas naturales de productos antimicrobianos.

La evaluación de factibilidad para utilizar bacteriófagos como producto antimicrobiano para controlar bacterias patógenas se llevó a cabo junto a la valoración de antibióticos como producto tradicional, y probióticos como producto mayormente utilizado en la actualidad. Los criterios considerados para evaluar la factibilidad fueron: eficacia antimicrobiana (25%), impacto ambiental (20%), disponibilidad de productos comerciales (15%), capacidad tecnológica local (20%) y costos, comercialización e interés por usar el producto (20%). Las ponderaciones de los criterios se obtuvieron con la información de las encuestas realizadas.

El análisis comparativo entre productos antimicrobianos dio como resultado que, los bacteriófagos alcanzaron un valor de factibilidad de aplicación del 76%, similar al obtenido por los probióticos (74%), en contraste con el 29% obtenido por los antibióticos, que presentaron claras desventajas como producto antimicrobiano para cultivo de camarón. Los indicadores de factibilidad con mejor puntuación para los bacteriófagos fueron: baja resistencia bacteriana, abundancia y diversidad en el medio natural, capacidad para producción local y costos de elaboración bajos. A esto se debe adicionar, el comportamiento muy específico de los bacteriófagos para infectar un solo tipo de bacteria, descartando problemas de eliminación de la microbiota del animal. Pero a su vez, si se requiere tratar eventos que impliquen la participación de más de una cepa o especies bacterianas patógenas, se puede elaborar mezclas o también llamados cóctel de bacteriófagos. La efectividad a dosis bajas y el tipo de administración del producto son indicadores muy discutidos, pues en contraste con los antibióticos que, si se los usa a dosis mínimas y con una administración directa, son más propensos a crear multiresistencia bacteriana. Los bacteriófagos son aplicados de manera directa al tanque de cultivo sin afectar al medio, ya que es un producto natural, y son efectivos a dosis bajas por la capacidad de replicarse a igual proporción que los patógenos en el medio. Estas cualidades se asimilan a los probióticos, pero con desventajas, puesto que su crecimiento tiene una tendencia exponencial más lenta que la de las bacterias patógenas, además su efecto competitivo y de inhibición dependen mucho de la regulación de los parámetros y los recambios de agua. Si la administración de los

probióticos no es continua, también ocasiona desequilibrio en el medio y sin efectos positivos.

Otro de los criterios evaluados fue la disponibilidad de productos comerciales, donde primó tanto el stock de productos locales como internacionales. Aunque en el país no existen productos comerciales de bacteriófagos para camarón de cultivo, la existencia de patentes y productos antimicrobianos con formulación de bacteriófagos en otros países, indica una importante potencialidad. Es por esto que fue importante conocer el proceso de registro sanitario de productos de importación y las autoridades que regulan el ingreso de estos productos, en este caso, la Subsecretaría de Acuicultura y Subsecretaría de Calidad e Inocuidad.

En cuanto a la capacidad tecnológica local para elaborar un producto antimicrobiano, las empresas del medio local cuentan con infraestructura para desarrollar productos antimicrobianos, y mediante la fase experimental, se pudo comprobar de que se puede aislar bacteriófagos con elementos que normalmente cuentan los laboratorios de microbiología locales. Sin embargo, para el almacenamiento de suspensiones de bacteriófagos o aislamientos bacterianos se necesitan equipos más tecnificados. Por esta razón, el indicador relacionado tuvo una calificación media. Pese a ello, como existe el interés de los productores a probar nuevas alternativas, esto puede llamar la atención de empresas en financiar las investigaciones locales hacia los bacteriófagos y en un futuro su comercialización.

Todo productor de larvas de camarón desea optimizar costos, y a su vez mantener un buen rendimiento y una producción rápida. De los estudios hechos en India se determina que las producciones tratadas con bacteriófagos podrían incrementar los ingresos brutos en un 25% aproximadamente, debido a mejoras en cuanto al índice de supervivencia, FCR y kilogramos producidos por hectárea. Por lo que puede servir de referencia para desarrollar tratamientos con bacteriófagos en los laboratorios locales.

Finalmente, se considera que la aplicación de la fagoterapia es posible para controlar bacterias patógenas en cultivos de larvas de camarón en Ecuador, tomando como puntos claves: los buenos resultados de las experimentaciones a nivel mundial, compañías en

el mundo que se encuentran desarrollando productos antimicrobianos con esta formulación, la facilidad de su aislamiento demostrada en la fase experimental y el interés de los productores por disponer de una alternativa natural, reflejándose en el porcentaje de factibilidad alto obtenido al finalizar el análisis.

#### **4.2. Recomendaciones**

El resultado de la factibilidad de aplicar bacteriófagos como control para bacterias patógenas en larvas de camarón en este estudio es del 76%. No obstante, esto es sólo un valor referencial obtenido luego de la revisión bibliográfica, experimentación y encuestas. Por lo tanto, se recomienda profundizar en todos los ámbitos que pueden impulsar al uso de esta nueva alternativa natural, para lo cual se sugiere realizar:

- Investigaciones *in vitro* calculando la multiplicidad de infección (MOI) para conocer el número de bacteriófagos que infectan por bacteria e identificar así los bacteriófagos más efectivos.
- Caracterización de bacteriófagos de muestras de agua de laboratorios de larvas de camarón locales con microscopía electrónica de barrido (MEB) para definir su taxonomía.
- Estudios *in vivo* y en campo con larvas de camarón infectadas con el patógeno bacteriano de mayor prevalencia en el momento teniendo como tratamiento a los bacteriófagos y medidas de control fisicoquímicas y biológicas comunes.
- Proyectos de evaluación económica usando bacteriófagos para comprobar una posible optimización de costos y rendimiento.
- Apertura de las autoridades regulatorias en especificar los requerimientos técnicos para la obtención del registro sanitario de productos antimicrobianos con formulación de bacteriófagos importados, tal como ya lo específica para el caso de los probióticos.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] Banco Central del Ecuador, «Boletín de estadísticas del sector externo (IEM-311),» Banco Central del Ecuador, 2020.
- [2] T. Flegel, «Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand,» Elsevier, Thailand, 2006.
- [3] M. H. M. Le Groumellec, «Cell culture from tropical shrimps,» *J. Aquacult Tropic*, pp. 10:277-286, 1995.
- [4] J. Otero, «Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y sus métodos de control,» Universidad Técnica de Machala, Machala, 2018.
- [5] D. Moriarty, «Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds,» *Aquaculture*, pp. 351-358, 1998.
- [6] Sahu, M. Kumar, N. Swarnakumar, K. Sivakumar, T. Thangaradjou y L. Kannan, «Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives,» Springer, Tamil Nadu, 2008.
- [7] T. Nakai, R. Sugimoto, K. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka y K. Maruyama, «Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail,» *Diseases of Aquatic Organisms*, pp. Vol. 37: 33-41, 1999.
- [8] S. Park, I. Shimamura, M. Fukunaga, K. Mori y T. Nakai, «Isolation of Bacteriophages Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control,» *Applied and Environmental Microbiology*, pp. Vol. 66, No. 4: 1416-1422, 2000.
- [9] G. & G. Culot, «Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review,» *Aquaculture*, 2019.
- [10] Y. Prasad, Arpana, D. Kumar y A. Sharma, «Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease,» Triveni Enterprises, Vikas Nagar, 2011.

- [11] R. Makarov, «Vibriófagos en el cultivo larvario del camarón y su relación con la incidencia y virulencia de Vibrio,» CICIMAR-IPN, La Paz, 2011.
- [12] C. V. M. & L. R. Ronda, «Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura,» *AquaTIC*, pp. 3-10, 2003.
- [13] J. Vandenbergue, L. Verdonck, R. Robles-Arozarena, G. Rivera, A. Bolland, M. Balladares, B. Gomez-Gil, J. Calderón, P. Sorgeloos y J. Swings, «Vibrios Associated with Litopenaeus vannamei Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics,» *American Society for Microbiology*, pp. 2592-2597, Junio 1999.
- [14] N. R. M. P. F. & L. Tran, «Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp,» *Diseases of Aquatic Organisms*, pp. 45-55, 2013.
- [15] F. Cabello, «Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment,» *Environmental Microbiology*, pp. 1137-1144, 2006.
- [16] Agencia EFE, «Las exportaciones no petroleras de Ecuador terminarán 2019 con un alza de más de 4 %,» 27 diciembre 2019. [En línea]. Available: <https://www.efe.com/efe/america/economia/las-exportaciones-no-petroleras-de-ecuador-terminaran-2019-con-un-alza-mas-4/20000011-4140181>.
- [17] P. Alvarado, «El camarón alcanzó cifra récord en el 2019 en el Ecuador,» 8 enero 2020. [En línea]. Available: <https://www.elcomercio.com/actualidad/camaron-record-ecuador-exportacion-economia.html>.
- [18] Y. Zou, G. Xie, T. Jia, T. Xu, C. Wang, X. Wan, Y. Li, K. Luo, X. B. 1, X. Wang, J. Kong y Q. Zhang, «Determination of the Infectious Agent of Translucent Post-Larva Disease (TPD) in Penaeus vannamei,» 10 septiembre 2020. [En línea]. Available: [www.mdpi.com/journal/pathogens](http://www.mdpi.com/journal/pathogens).
- [19] J. Romero, C. G. Feijoó y P. Navarrete, «Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives,» de *Health and Environment in Aquaculture*, Rijeka, Croatia, InTech, 2012, pp. 159-198.
- [20] Revista de Farmacología Clínica de Anestesiología , «Mecanismos de acción y resistencia de los antibióticos: una guía para médicos,» junio 2017. [En línea].

Available:

[https://www.researchgate.net/publication/319625887\\_Action\\_and\\_resistance\\_mechanisms\\_of\\_antibiotics\\_A\\_guide\\_for\\_clinicians](https://www.researchgate.net/publication/319625887_Action_and_resistance_mechanisms_of_antibiotics_A_guide_for_clinicians).

- [21] N. Montoya, «Residuos de antibióticos en camarones: Límites residuales y detección de fenicoles,» CENAIM, San Pedro, 2002.
- [22] M. Doyle, «Veterinary Drug Residues in Processed Meats - Potential Health Risk,» Food Research Institute, Madison, Wisconsin, 2006.
- [23] FAO, «Temas de interés para los pescadores y acuicultores,» 2011. [En línea]. Available: <http://www.fao.org/3/y7300s/y7300s06a.htm>.
- [24] NutriNews, «Pre y próbióticos influyen en el rendimiento y bienestar animal,» 27 agosto 2018. [En línea]. Available: <https://nutricionanimal.info/prebioticos-probioticos-nutricion-salud-animal/>.
- [25] T. Defoirdt, N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete y P. Bossier, «Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production,» 2009. [En línea]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000779>.
- [26] M. K. Swamy, M. S. Akhtar y U. R. Sinniah, «Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review,» Hindawi Publishing Corporation, Malaysia, 2016.
- [27] NutriNews, «Aceites esenciales como conservantes y potenciadores productivos,» 27 septiembre 2019. [En línea]. Available: <https://nutricionanimal.info/aceites-esenciales-como-conservantes-y-potenciadores-productivos/>.
- [28] N. Segundo, B. E. Hernández, V. O. López y A. O. Torres, «Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia),» 9 septiembre 2010. [En línea]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916078003>.
- [29] Mann, N., «The third age of phage,» *Plos Biology*, pp. Volume 3, Issue 5, e182, 2005.
- [30] Webster's New World College Dictionary, de *Webster's New World College Dictionary*, Associated Press, 2004, p. 105.

- [31] B. Weber-Dabrowska, M. Mulczyk y A. Gòrski, «Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience,» *Archivum Immunologiae Therapy Experimentals*, pp. 547-551, 2000.
- [32] S. Nechaev y K. Severinov, «The elusive object of desire - Interactions of bacteriophages and their hosts,» *Current Opinion in Microbiology*, pp. 186-193, 2008.
- [33] Khan Academy, «Bacteriófagos,» 2017. [En línea]. Available: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/bacteriophages>.
- [34] D. I. R. M. L. E. M. D. & U. H. Montag, «Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. Constant and hypervariable regions and an unusual case of evolution.,» *J Mol Biol*, Tubingen, 1987.
- [35] K. D. J. H. I. M. B. & H. U. Drexler, «Single mutations in a gene for a tail fiber component of an Escherichia coli phage can cause an extension from a protein to a carbohydrate as a receptor,» *J Mol Biol*, Tubingen, 1991.
- [36] R. M. Carlton, «Phage Therapy: Past History and Future Prospects,» *Exponential Biotherapies, Inc.*, New York, 1999.
- [37] P. C. Prada, M. A. V. Holguín, B. A. F. Gonzáles y F. M. J. Vives, «Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia,» *Universitas Scientiarum*, pp. 44-59, 11 agosto 2014.
- [38] R. Dy, L. Rigano y P. Fineran, «Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture,» *Biochemical Society Transactions*, pp. 1605-1613, 2018.
- [39] G. Q. J. W. Z. & Q. Y. Yi, «A phage displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp,» *Journal of general virology*, pp. 84(9), 2545-2553, 2003.
- [40] Zohar Erez, da Steinberger-Levy, Maya Shamir, Shany Doron, Avigail Stokar-Avihail, Yoav Peleg, Sarah Melamed, Azita Leavitt, Alon Savidor, Shira Albeck, Gil Amitai y Rotem Sorek, «Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions,» *Nature*, p. 491, 26 enero 2017.

- [41] Brüssow, H. y Hendrix, R. W, «Genómica de los fagos: lo pequeño es hermoso,» Cell Press, 2002, pp. 13-16.
- [42] N. J. Dimmock, A. J. Easton y K. N. Leppard, «Virus particles with head-tail morphology,» de *Introduction to modern virology*, Blackwell Publishing, 2016.
- [43] J. Borrego, «¿Se comunican los virus?,» Encuentros en la biología, Málaga, 2019.
- [44] L. Restrepo, B. Bayot, S. Arciniegas, L. Bajaña, I. Betancourt, F. Panchana y A. R. Muñoz, «PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade,» *Scientific Reports* , vol. 8, nº 13080 , 30 Agosto 2018.
- [45] C. Kokkari, E. Sarropoulou, R. Bastias, M. Mandalakis y P. Katharios, «Isolation and characterization of a novel bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*,» Springer, Germany, 2018.
- [46] L. C.-C. P. Yolanda J. Silva, C. Mateus, Â. Cunha, R. Calado, N. C. M. Gomes, M. A. Pardo, I. Hernandez y A. Almeida, «Phage Therapy as an Approach to Prevent *Vibrio anguillarum* Infections in Fish Larvae Production,» Plos One, 2 diciembre 2014. [En línea]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114197>.
- [47] Ministerio de Acuacultura y Pesca, «Informe de los Certificados de Registro Sanitario Unificado RSU 2018 VIGENTES,» 16 Julio 2018. [En línea]. Available: <http://www.acuaculturaypesca.gob.ec/wp-content/uploads/2018/07/RSU-Web-16Julio2018.pdf>. [Último acceso: 27 Diciembre 2020].
- [48] S. F. Martínez, «La Fagoterapia provee tratamiento contra bacterias específicas,» *Global Aquaculture Advocate*, 2010.
- [49] J. N. C, «Biofilms bacterianos,» *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, vol. 67, pp. 61-72, 2007.
- [50] A. Toledo, N. M. Castillo, O. Carrillo y A. Arenal, «Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones.,» Universidad de Camagüey, La Habana, 2018.
- [51] D. Jorquera, N. Galarce y C. Borie, «El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica,» *Revista Chilena de Infectología*, vol. 32, nº 6, 2015.

- [52] R. Carlon, «Phage therapy: past history and future prospects.,» *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 47, pp. 267-274, 1999.
- [53] «Desarrollo e implementación de un tratamiento por fagoterapia para el control del patógeno de salmones *Piscirickettsia salmonis*,» Programa para la gestión sanitaria en la acuicultura, 2018.
- [54] Ministerio de Acuicultura y Pesca, «Requisitos para la obtención del registro sanitario unificado de insumos y productos veterinarios de uso pesquero y acuícola elaborados en el país,» [En línea]. Available: <http://acuaculturaypesca.gob.ec/wp-content/uploads/2018/11/NACIONAL.pdf>. [Último acceso: 23 Diciembre 2020].
- [55] Ministerio de Acuicultura y Pesca, «Requisitos para la obtención del registro sanitario unificado de insumos y productos veterinarios de uso pesquero y acuícola importados,» [En línea]. Available: <http://acuaculturaypesca.gob.ec/wp-content/uploads/2018/11/IMPORTADOS.pdf>. [Último acceso: 23 Diciembre 2020].
- [56] P. C. Kunapuli, «Analysis og the clear plaque phenotype of the bacteriophage HK75,» Western Kentucky University, Kentucky, 2010.
- [57] C. Dini, «Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA),» Universidad Nacional de La Plata , La Plata, 2011.
- [58] M. E. Cárdenas-Perea, O. R. C. y. López, J. L. Gándara-Ramírez y M. A. Pérez-Hernández, «Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias,» *Elementos*, vol. 94, pp. 35-43, 2014.
- [59] C. O. Lomelí-Ortega y S. F. Martínez-Díaz, «Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae,» 2014.
- [60] I. Karunasagar, M. Shivu, S. Girisha, G. Krohne y I. Karunasagar, «Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages,» El Sevier, Mangalore, 2007.
- [61] C. Subhashini y J. Kumar, «Evaluación del impacto de bacteriófagos para el control de Vibrios en *Litopenaeus vannamei*,» *Aquacultura*, nº 137, pp. 27-29, 2020.
- [62] M. V. M. Vinod, M. Shivu, K.R.Umesha, B. Rajeeva, G. Krohne, I. Karunasagar y I. Karunasagar, «Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for

biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments,» Science Direct, Mangalore, 2006.

- [63] H. Oakey y L. Owens, «A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia,» James Cook University, Australia, 2000.
- [64] M. M. Shivu, B. C. Rajeeva, S. K. Girisha, I. Karunasagar, G. Krohne y I. Karunasagar, «Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophage isolated from aquaculture environments long the coast of India,» Environmental Microbiology , Mangalore, 2007.
- [65] J. E. Han, DVM, K. F. Tang y A. Corbin, «Posibles aplicaciones de bacteriófagos para el control de AHPND,» 5 marzo 2018. [En línea]. Available: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/posibles-aplicaciones-de-bacteriofagos-para-el-control-de-ahpnd/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs>.
- [66] N. Stalin y P. Srinivasan, «Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in Palk Strait, South East coast of India,» Elsevier, Tamilnadu, 2016.
- [67] E. A. T. García, «Neutralización de la toxinas PirA y PirB de *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos,» Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, 2016.
- [68] K. M. Alagappan, B. Deivasigamani, S. T. Somasundaram y S. Kumaran, «Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Specific Phages from Shrimp Ponds in East Coast of India,» Springer, Tamil Nadu, 2010.
- [69] P. Phumkhachorn y P. Rattanachaikunsopon, «Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*,» African Journal of Microbiology Research, Thailand, 2010.
- [70] P. Srinivasan y P. Ramasamy, «Morphological characterization and biocontrol effects of *Vibrio vulnificus* phages against Vibriosis in the shrimp aquaculture environment,» Microbial Pathogenesis, Tamil Nadu, 2017.

- [71] Aristogene Bioscience, «Aristogene,» Business Online Bangalore, [En línea]. Available: <http://www.aristogene.com/vibrioshield.html>. [Último acceso: 22 Diciembre 2020].
- [72] Aristogene Biosciences, «Aristogene,» Business Online Bangalore, [En línea]. Available: <http://www.aristogene.com/elixir.html>. [Último acceso: 22 Diciembre 2020].
- [73] Mangalore Biotech Laboratory, «Mangalore Biotech Laboratory,» Sal Unique Solutions, [En línea]. Available: <http://magicfingers.co.in/mangalorebiotech.com/products.html>. [Último acceso: 22 Diciembre 2020].
- [74] J. W. Stave y G. B. Teaney, «Bacteriófagos como agentes selectivos». España Patente ES2523316T3, 31 Octubre 2005.
- [75] 최. 김. 성기홍, «Nuevo bacteriófago asp-1 y uso para prevención de proliferación de *Aeromonas salmonicida*». Corea del Sur Patente KR101329639B1, 4 Junio 2012.
- [76] D.-K. C. J.-h. K. Ki-Hong Sung, «Bacteriófago y su uso para prevenir la proliferación de bacterias patógenas». Estados Unidos de América Patente US9504721B2, 29 Noviembre 2016.
- [77] E. ¾. . , «Vibriófago, método de preparación y aplicación de composición bactericida». China Patente CN109207440A, 15 Enero 2019.
- [78] No. E. , «Una especie de fago de *v.parahaemolyticus*, su método de preparación y aplicación.». China Patente CN105331587B, 29 Mayo 2018.
- [79] T. A. G. B. R. C. Scott L. Burnett, «Tratamiento con bacteriófagos para reducir y prevenir la contaminación bacteriana en un producto alimenticio cárnico». Estados Unidos de América Patente US10188121B2, 29 Enero 2019.
- [80] Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, «Instituto de Pesca,» 2017. [En línea]. Available: [http://institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2017/07/Plan-Nacional-de-Control-2015\\_227.pdf](http://institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2017/07/Plan-Nacional-de-Control-2015_227.pdf).

[81] BASF Española , «Introducción al uso de ácidos orgánicos en porcino,» 14 marzo 2015. [En línea]. Available: <https://porcino.info/introduccion-al-uso-de-acidos-organicos-en-porcino/>.

# APÉNDICES

## APÉNDICE A

Laboratorio B		Laboratorio O	
B11	B12	O11	O12
B21	B22	O21	O22
B31	B32	O31	O32
B41	B42	O41	O42
Canal de Salida 1		C11	C12
Canal de Salida 2		C21	C22

**Codificación de muestras de acuerdo con la metodología empleada**

## **APÉNDICE B**

### **Entrevista dirigida a Autoridades Gubernamentales de la Industria Acuicola Factibilidad de la aplicación de la fagoterapia para el control de bacterias patogenas en el cultivo de larvas de camarón en Ecuador**

Nombre:

Cargo:

Institución a la que pertenece:

- 1. ¿Cuál es el ente regulatorio encargado de administrar el uso de sustancias químicas como antibióticos y antimicrobianos para fines veterinarios?**
- 2. En la actualidad, ¿Cuál es la posición del Ecuador respecto al uso de antibióticos en el área acuícola?**
  - Restringidos en algunos casos
  - Permitido en todos los casos
  - Con permisos especiales
  - Otros
- 3. ¿Qué metodología de aplicación (uso tópico u oral) es permitida y efectiva en la camaronicultura?**
- 4. ¿Cuáles son los antibióticos vetados y aceptados para el área acuícola? ¿Límites permitidos de residuales en los alimentos?**
- 5. ¿Los antibióticos aceptados son importados o se los elabora en el mismo país?**
- 6. ¿Qué medidas se toman para el control de antibióticos en laboratorios y camaroneras?**
- 7. ¿Conoce la terapia de fagos como biocontrol para bacterias patógenas?**
- 8. ¿Existen productos comerciales basados en bacteriófagos que sean comercializados para el control de bacterias patógenas?**
- 9. ¿Si es así, cuál es el estado de bacteriófagos en su uso dentro del Ecuador?**
- 10. Si no hay un uso permitido actualmente, ¿Cómo sería el proceso de legalización de esta alternativa natural (bacteriófagos) a los antibióticos?**

## APÉNDICE C

### **Encuesta para el estudio de factibilidad de la aplicación de la fagoterapia para controlar bacterias patógenas en cultivos de larvas de camarón**

*Encuesta dirigida a técnicos de laboratorios de larvas. Esta encuesta tiene como objetivo conocer los principales problemas bacterianos, métodos de control y el conocimiento de la terapia de fagos.*

*\*La información proporcionada es anónima y confidencial*

- 1. Cargo en la empresa:**
- 2. ¿Cuáles son las principales enfermedades bacterianas o bacterias patógenas que se han presentado en su cultivo de larvas?**
  - V. parahaemolyticus*
  - Síndrome de Zoea II
  - Epibiontes bacterianos
  - Vibrios
  - Pseudomonas
  - Otros: \_\_\_\_\_
- 3. ¿Cuáles son los signos clínicos comunes con los que identifica dichas enfermedades?**
- 4. ¿Cuál es la etapa de larvicultura que usted considera más crítica en la que el cultivo es propenso a contraer enfermedades bacterianas?**
  - Zoea I
  - Zoea II
  - Zoea III
  - Transición de Zoea III a Mysis I
  - Mysis I
  - Mysis II
  - Mysis III
  - Transición de Mysis III a Postlarva
  - Postlarva 1 – 4
  - Otros: \_\_\_\_\_
- 5. ¿Qué medidas físicas, químicas y/o biológicas aplican en los tanques de larvicultura cuando se presentan estas enfermedades?**
  - Recambios de aguaZoea II
  - Regulación de parámetros (temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad)

- Adición de químicos
- Ácidos orgánicos
- Probióticos
- Antibióticos
- Aceites esenciales
- Bacteriófagos (fagos)
- Alimento vivo
- Alimento balanceado
- Otros: \_\_\_\_\_

**6. ¿Sabía usted que existen virus que atacan y degradan bacterias de manera natural llamados bacteriófagos?**

- Si
- No

**7. ¿Usted ha aplicado algún tratamiento de bacteriófagos en sus instalaciones?**

- Si
- No

**8. ¿Usted estaría dispuesto a probar en sus instalaciones algún tratamiento formulado con bacteriófagos?**

- Si
- No

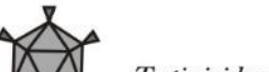
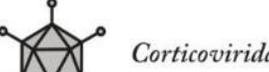
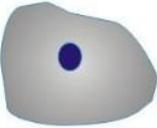
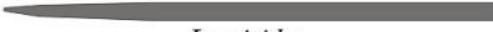
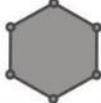
***Los principales criterios para un producto antibacteriano son: eficacia antimicrobiana, impacto ambiental, disponibilidad de productos comerciales, capacidad tecnológica local, costos, potencialidad de producción de nuevos productos.***

**9. Pondere según su criterio al momento de comprar un producto como bactericida:**

0= Ninguna importancia      5= Más importante

Criterio	0	1	2	3	4	5
Eficacia antimicrobiana (producto antimicrobiano que destruye o inhibe el patógeno de manera eficaz)						
Impacto ambiental (producto antimicrobiano con bajo o nulo impacto ambiental)						
Disponibilidad de productos comerciales (tipo de antimicrobiano con gran variedad de productos comerciales)						
Capacidad tecnológica local (facilidad de producir localmente el producto antimicrobiano, de tal forma que esté diseñado para los patógenos locales)						
Costos (producción económica y de gran interés en el mercado)						
Otro:						

## APÉNDICE D

Familias de bacteriófagos		
ADN bicatenario. Sin envoltura		ADN bicatenario Con envoltura
 <i>Myoviridae</i>	 <i>Siphoviridae</i>	 <i>Podoviridae</i>
	 <i>Rudiviridae</i>	 <i>Fuselloviridae</i>
	 <i>Tectiviridae</i>	 <i>Corticoviridae</i>
		 <i>Plasmaviridae</i>
		 <i>Lipothrixviridae</i>
ADN monocatenario		ARN
		Monocatenario
 <i>Inoviridae</i>	 <i>Microviridae</i>	 <i>Leviviridae</i>
		Bicatenario
		 <i>Cystoviridae</i>

Familias de bacteriófagos [11]