

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Determinación *in vitro* de dosis óptimas de 3 productos experimentales para inhibir crecimiento en una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND

Proyecto Integrador

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Saray Elizabeth Consuegra Villao

Yumi Ariana Medina Lam

Guayaquil – Ecuador

2023

Dedicatoria

El presente proyecto se lo dedico a Dios,
quien me ha sostenido hasta el día de hoy,
quien con su infinito amor y misericordia me
ha permitido disfrutar de este logro, quien me
ha alentado cada día con su santa palabra,
motivándome a esforzarme y ser valiente
cada día, y a no desmayar en el proceso,
prometiéndome que él estará conmigo a
dondequiera que vaya.

A mi familia, a quienes amo y estoy
perpetuamente agradecida, quienes han sido
mi inspiración en cada logro de mis metas.

Saray Consuegra Villao

Dedicatoria

Con gran amor...

A Dios, por permitirme terminar con éxito mi carrera, darme salud y fortaleza en todo momento.

A mis padres, Christian y Yumi, por su amor, sacrificio y por enseñarme a ser constante y nunca rendirme frente a los obstáculos de la vida.

A mis hermanos, abuelos y demás familia, por el apoyo incondicional y por siempre impulsarme a ser mejor.

A mi novio Ariel, por estar conmigo en todo este proceso, motivándome, ayudándome y celebrando mis victorias. Te amo

A mis amigos, futuros colegas y demás

Por último, en honor a la memoria de Daniel, su amor, su legado y su espíritu viven en mi corazón y me impulsan hacia delante.

Yumi Ariana Medina Lam

Agradecimientos

Agradezco a Dios quien es y será mi fortaleza, a mi amada familia quienes en todo momento estuvieron apoyándome, a todos los docentes que contribuyeron en mi formación universitaria, a nuestros tutores el Dr. Jorge Cuéllar- Anjel y Dr. Jerry Landívar, por su tiempo y guía en este proyecto integrador, a mi coordinador de carrera MSc. Patricia Urdiales, quien nos brindó amablemente su apoyo y aliento en todo el proceso de nuestro proyecto, de igual manera a MSc. Sonnia Guartatanga por su ayuda y guía en la parte experimental en el presente proyecto integrador.

Saray Consuegra Villao

Agradecimientos

Mi agradecimiento sincero...

A Dios, por brindarme fortaleza, sabiduría y
su inmenso amor en todo momento

A toda mi familia, por siempre apoyarme,
sostenerme e impulsarme a lograr mis metas

A mi compañera de tesis, Saray, por ser parte
de este proyecto, por su paciencia y su ayuda

A nuestros tutores, Dr. Jorge Cuéllar-Anjel y
Dr. Jerry Landívar por su orientación, apoyo
y paciencia.

A mis maestros quienes aportaron en la
realización de este proyecto, Dra. Calles,
MSc. Urdiales, Dr. Osorio y MSc.
Guartatanga.

A mi alma mater ESPOL, por su compromiso
continuo en mi formación como profesional

Yumi Ariana Medina Lam

Declaración Expresa

Nosotros, Saray Elizabeth Consuegra Villao y Yumi Ariana Medina Lam acordamos y reconocemos que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso. En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 7 de febrero del 2023.



Saray Elizabeth Consuegra Villao



Yumi Ariana Medina Lam

Evaluadores

Dr. Jerry Landívar Z

Profesor de Materia



Dr. Jorge Cuéllar-Anjel

Tutor de proyecto

Resumen

Este proyecto se centra en la determinación *in vitro* de las dosis óptimas de 3 productos experimentales para inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*, agente causante de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), en camarones *Penaeus vannamei*. La investigación se desarrolló en dos fases: *in vitro* e *in vivo*. En la fase *in vitro*, se utilizaron pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y pruebas de competencia bacteriana para establecer las mejores dosis de los productos, que son una proteína de plasma bovino, una lisozima de origen animal y un simbiótico. Los resultados indicaron concentraciones óptimas para cada producto lo que proporciona información valiosa para el desarrollo de medidas preventivas y de control contra AHPND. Las concentraciones efectivas para inhibir el crecimiento fueron: lisozima 1000 y 2000 ppm, proteína de plasma bovino 3000 ppm y el simbiótico 800000 ppm. En la fase *in vivo*, se llevó un bioensayo con camarones para evaluar la eficacia de los tratamientos mediante la ganancia de peso. Los animales fueron alimentados con balanceados fabricados adaptando un protocolo de molienda y reconstitución de pellets donde incorporamos los productos experimentales en base a las dosis obtenidas *in vitro*. La conclusión principal es que todos los productos inhibieron el desarrollo del *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, el tratamiento con proteína de plasma bovino mostró mejores resultados en términos de crecimiento en comparación con los otros tratamientos, sugiriendo una alternativa prometedora al uso de antibióticos y abriendo nuevas posibilidades para la industria acuícola. Esta investigación contribuye a la búsqueda de soluciones sostenibles y sentará las bases para futuras investigaciones en la optimización de procesos de producción.

Palabras clave: AHPND, lisozima, *in vitro*, *in vivo*, proteína de plasma bovino, simbiótico, *Penaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Abstract

This project focuses on determining the *in vitro* optimal doses of 3 experimental products to inhibit the growth of *Vibrio parahaemolyticus*, the agent causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps. The research was developed in two phases: *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* phase, Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) tests and bacterial competition tests were used to establish the best doses of the products, which include a bovine plasma protein, an animal origin lysosome, and symbiotic. The results indicated specific optimal concentrations for each product, providing valuable information for the development of preventive and control measures against AHPND. The effective concentrations to inhibit growth were, for the lysosome, 1000 and 2000 ppm; for the bovine plasma protein, 3000 ppm; and for the symbiotic, 800000 ppm. In the *in vivo* phase, a bioassay with shrimps was carried out to evaluate the efficacy of the treatments through weight gain. The animals were fed with formulated feeds, adapting a milling and pellet reconstitution protocol where we incorporated the experimental products based on the *in vitro* obtained doses. The main conclusion is that all products inhibited the development of *V. parahaemolyticus*. However, the treatment with bovine plasma protein showed better results in terms of growth compared to the other treatments, suggesting a promising alternative to the use of antibiotics, and opening new possibilities for the aquaculture industry. This research contributes to the search for sustainable solutions and lays the groundwork for future research in the optimization of production processes.

Keywords: AHPND, lysozyme, *in vitro*, *in vivo*, bovine plasma protein, symbiotic, *Penaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Índice general

Resumen.....	VIII
<i>Abstract</i>	IX
Índice general.....	X
Abreviaturas.....	XIII
Simbología	XIV
Índice de ilustraciones.....	XV
Índice de tablas	XVIII
Capítulo 1	1
1. Introducción	2
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Justificación del problema	4
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Marco teórico	5
1.4.1. Acuicultura mundial.....	5
1.4.2. Acuicultura de <i>Penaeus vannamei</i> en Ecuador	6
1.4.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> como agente patógeno causante de AHPND	7
1.4.4. Sistema inmunológico en camarones <i>P. vannamei</i>	8

1.4.5.	Principios activos sometidos contra el <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
Capítulo 2.....		15
2.	Metodología	16
2.1	Pruebas <i>in vitro</i>	16
2.1.1	Reactivación de la bacteria	16
2.1.2	Crecimiento de la bacteria	18
2.1.3	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	18
2.1.4	Pruebas de antagonismo.....	24
2.2	Bioensayo.....	28
2.2.1	Montaje del sistema para las pruebas de crecimiento	28
2.2.2	Preparación de dietas experimentales	32
2.2.3	Origen y aclimatación de camarones	37
2.2.4	Fase de alimentación con tratamientos experimentales	38
2.2.5	Registro de peso	38
2.2.6	Análisis de resultados de pruebas <i>in vitro</i> y de crecimiento	39
Capítulo 3.....		40
3.	Resultados y análisis	41
3.1	Pruebas <i>in vitro</i>	41
3.1.1	Lisozima.....	41
3.1.2	Plasma bovino	46

3.1.3	Enzimas	49
3.1.4	Simbiótico	51
3.1.5	Suero de leche	52
3.2	Bioensayo.....	54
3.2.1	Parámetros fisicoquímicos	54
3.2.2	Pruebas de crecimiento	65
3.2.3	Alimentación.....	69
3.2.4	Pruebas físicas del alimento.....	70
Capítulo 4		72
4.	Conclusiones y recomendaciones	73
4.1.	Conclusiones	73
4.2.	Recomendaciones	74
5.	Referencias.....	75

Abreviaturas

AHPND	Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas
ANOVA	Análisis de la varianza
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
EMS	Síndrome de mortalidad temprana
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
IHHNV	Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética
LB	Medio Luria-Bertani
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Radiación ultravioleta
vs.	Versus
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
µL	Microlitros

Simbología

mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
m	Metro

Índice de ilustraciones

Figura 1. Siembra de bacteria patógena de <i>V. parahaemolyticus</i> en agar LB empleando técnica de siembra por agotamiento	17
Figura 2. Incubación de bacteria patógena de <i>V. parahaemolyticus</i> en agar LB a 35°C	17
Figura 3. Preparación de las concentraciones de lisozima que se utilizó en el MIC	19
Figura 4. Preparación del Florfenicol (antibiótico) que se usó como tratamiento control en los MIC	20
Figura 5. Incubación de la microplaca de ELISA previos a la lectura de estas	20
Figura 6. Lectura de las microplacas ELISA en el lector de microplacas	21
Figura 7. Llenado de la microplaca de ELISA con las diferentes concentraciones del tratamiento, un blanco (medio líquido LB puro) y un control (antibiótico)	22
Figura 8. Microplaca de ELISA con enzimas a diferentes concentraciones antes de realizar la primera lectura	23
Figura 9. Siembra de bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> con hisopos esterilizados aplicando la técnica de siembra por barrido	25
Figura 10. Perforación del agar en 4 pocillos para colocar las diferentes concentraciones a probar del simbiótico	26
Figura 11. Introducción de las distintas concentraciones de simbiótico	27
Figura 12. Elaboración de pruebas de sensibilidad para suero de leche	28
Figura 13. Limpieza y desinfección de las peceras previo al montaje del bioensayo	29
Figura 14. Montaje del bioensayo para las pruebas de crecimiento	30
Figura 15. Preparación del agua a utilizar en las pruebas de crecimiento	31

Figura 16. Llenado de las peceras para las pruebas de crecimiento con 4 tratamientos y 1 control	31
Figura 17. Esterilización del balanceado comercial triturado.....	33
Figura 18. Pesaje del alimento triturado y previamente esterilizado	33
Figura 19. Hidratación del pellet con agua destilada.....	34
Figura 20. Proceso de reconstitución del alimento balanceado	35
Figura 21. Proceso de horneado del balanceado por tratamiento experimental	36
Figura 22. Producto final del balanceado con proteína de plasma bovino	36
Figura 23. Pesaje de los camarones por pecera de tratamiento.....	37
Figura 24. Alimentación de camarones por tratamiento experimental	38
Figura 25. Concentración vs Absorbancia del producto experimental Lisozima en 4 h de incubación.	41
Figura 26. Concentración vs Absorbancia del producto experimental Lisozima en 4 h de incubación a diferentes concentraciones y en ausencia de producto experimental.	43
Figura 27. Concentración vs Absorbancia de la proteína de plasma bovino en 5 h de incubación	46
Figura 28. Comparación concentración vs Absorbancia de la proteína de plasma bovino en 5 h de incubación a diferentes concentraciones y con un grupo de control.	47
Figura 29. Crecimiento bacteriano en 3 concentraciones de Plasma bovino en función de la absorbancia.	48
Figura 30. Comparación de concentración vs Absorbancia de Enzimas en 4 h de incubación, a diferentes concentraciones y con un grupo de control.....	49

Figura 31. Crecimiento bacteriano en 3 concentraciones de Enzimas en función de la absorbancia.	51
Figura 32. Efecto de la concentración de simbiótico en la longitud de halo (promedio $\pm$ desviación estándar).	52
Figura 33. Efecto de la concentración de simbiótico en la longitud de halo (promedio $\pm$ desviación estándar).	53
Figura 34. Cantidad de oxígeno disuelto (mg/L) en cada uno de los tratamientos experimentales.	54
Figura 35. Temperatura ($^{\circ}$ C) en cada uno de los tratamientos experimentales.	57
Figura 36. Medición de pH en cada uno de los tratamientos por semana experimentación.	59
Figura 37. Medición de Amonio en cada uno de los tratamientos por semana experimentación.	61
Figura 38. Medición de nitrito en cada uno de los tratamientos por semana experimentación. ...	62
Figura 39. Medición de nitrato en cada uno de los tratamientos por semana experimentación. ..	63
Figura 40. Peso semanal de los tratamientos experimentales en los 34 días de experimentación.	65
Figura 41. Crecimiento semanal de los tratamientos experimentales en los 34 días de experimentación.	66
Figura 42.	68
Figura 43. Dosis de alimentación semanal para cada uno de los tratamientos experimentales en 5 semanas.	69
Figura 44. Tiempo de respuesta en camarones entre los tratamientos experimentales y el control.	70

Índice de tablas

Tabla 1. Concentración vs. Absorbancia del producto experimental Lisozima en 4 h de incubación a diferentes concentraciones y en ausencia de producto experimental.	42
--	----

Capítulo 1

1. Introducción

El cultivo de camarones es una actividad económica importante para varias regiones del mundo debido a su alta demanda en el mercado global. A nivel mundial, el camarón es cultivado en más de 50 países desde hace varias décadas, la mayor concentración se encuentra en dos regiones principales: Asia y América latina (Jory, 2018). La mayor parte del suministro producido va dirigido a consumidores de altos ingresos en países como Estados Unidos, Japón, China y la Unión Europea, principalmente.

Con el tiempo, las exportaciones de camarones han aumentado de forma imparable, ocupando una proporción creciente en el mercado de exportaciones de productos acuáticos del mundo. En 1976, el valor por exportaciones de camarones rodeaba los 1200 millones de dólares (USD), lo que representaba el 15,4% del valor de las exportaciones mundiales de productos acuáticos. Mientras que, en 2020, esta cifra alcanzó los 24.700 millones de dólares (USD), representando el 16,4% del total (FAO, 2022).

El camarón blanco del pacífico (*Penaeus vannamei*) es la especie de camarón comercial más importante en el mundo, representando más del 76% de todos los camarones cultivados y más del 45% de todos los camarones producidos, incluyendo la acuicultura y la pesca (Jory, 2018).

Ecuador es uno de los principales productores de *P. vannamei* en el mundo y esta industria es una importante fuente de ingresos y empleo para el país. Se estima que la camaronicultura genera 180 mil plazas de empleo, directo e indirecto y, en conjunto con la pesca, representan el 5% de las plazas de trabajo en el país (Ávila et al., 2021).

Pese a la importancia que tiene este sector en la economía del país, la producción de camarones ha enfrentado varios desafíos. Entre estos se destaca la aparición de enfermedades de

origen viral como: la Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), el Virus del Síndrome de Taura (TSV), Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) y las enfermedades de origen bacteriano como: el Síndrome de la Gaviota y la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2023). Esta última ha causado un impacto devastador en la economía de la industria acuícola del mundo, con cifras que alcanzan los 12 mil millones de dólares (USD) (Aranguren et al., 2020).

En este contexto, la investigación y el desarrollo de productos comerciales para el control de vibrios se han convertido en un tema de gran interés para la industria camaronera en Ecuador y el mundo. Debido a esto, se propone una metodología para la determinación in vitro de dosis óptimas de 3 productos experimentales para inhibir crecimiento en una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND. Al mismo tiempo, la metodología propuesta incluye la realización de pruebas de crecimiento experimentales en condiciones controladas, utilizando un grupo de control y un tratamiento por cada producto experimental evaluado.

Se espera que los resultados de este trabajo contribuyan al desarrollo de productos comerciales más eficaces y seguros para el control de AHPND en el cultivo de camarones en Ecuador. De esta manera, se busca mejorar la producción y la rentabilidad de esta importante industria para el país.

1.1. Descripción del problema

En Ecuador, la producción de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) se ve frecuentemente afectada por enfermedades bacterianas como la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND), causada por una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* (Tran et al., 2013^a). Esta enfermedad puede resultar en tasas de mortalidad de hasta el 100% en los primeros 10 - 30 días de cultivo después de la siembra (Cuéllar-Anjel, 2013), traduciéndose en grandes

pérdidas para la industria del camarón, que desde enero del presente año (2023) es reconocida como la principal fuente de ingreso por exportaciones superando por primera vez al petróleo crudo (El Comercio, 2023).

Actualmente, los métodos convencionales para el control de AHPND, como desinfectantes y antibióticos, han demostrado poca eficiencia. Además, estos últimos pueden generar resistencia antimicrobiana y aportar residuos a los cuerpos de agua de descarga. Por lo anterior, se buscó que los productos experimentales que se evaluaron en este estudio fueran alternativas a los antibióticos para el control de AHPND.

1.2. Justificación del problema

El sector de la acuicultura en Ecuador ha experimentado un crecimiento acelerado en los últimos años, gracias a la implementación de políticas públicas que han impulsado el desarrollo de la industria y a la adopción de tecnologías de producción avanzadas. Sin embargo, la producción de camarones también enfrenta desafíos, como la presencia de enfermedades y la necesidad de utilizar técnicas de manejo ambientalmente sostenibles. Con estos antecedentes, es importante seguir investigando y desarrollando estrategias innovadoras para mejorar la producción de camarones, asegurando su calidad y sostenibilidad en el tiempo (Jory, 2018).

La evaluación de productos comerciales para controlar vibrios en camarones es una iniciativa relevante que contribuye a la mejora de la producción y a la protección del medio ambiente, al reemplazar la utilización de los antibióticos en toda la cadena productiva. Los productos pueden llegar a reducir mortalidades y mejorar las supervivencias de camarón en las piscinas productoras, luego de infecciones naturales con cepas patógenas de vibrios, consiguiendo aumentar las ganancias económicas de los camaroneros ecuatorianos.

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo general*

- Determinar la dosis óptima de 3 productos experimentales mediante pruebas *in vitro* para inhibir el crecimiento de una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND

1.3.2. *Objetivos específicos*

- Determinar la dosificación óptima de 3 productos experimentales para inhibir el crecimiento de una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en camarones *P. vannamei*
- Adaptar un protocolo de molienda, mezclado y reconstitución de pellets comerciales para camarones, incorporando 3 productos experimentales y sometiénolos a pruebas físicas de calidad
- Evaluar la tasa de crecimiento en camarones juveniles *P. vannamei* sometidos a 3 tratamientos experimentales

1.4. Marco teórico

1.4.1. *Acuicultura mundial*

La acuicultura se define como todo conjunto de actividades, técnicas y conocimientos del cultivo de especies acuáticas (vegetales y animales) de interés acuícola desde peces hasta crustáceos, moluscos y algas, para fines comerciales y de repoblación (Rueda, 2011). La acuicultura proporciona proteínas de alta calidad, ácidos grasos esenciales y nutrientes clave, por lo que la seguridad alimenticia y la nutrición a nivel mundial son complementadas por esta actividad y el consumo de alimentos acuáticos ha ido aumentando a un ritmo anual del 3% desde 1961 hasta la actualidad. De la producción total de especies acuáticas, más del 89% (157 millones) es destinado al consumo humano (FAO, 2022).

La producción acuícola ha experimentado crecimientos significativos durante las últimas décadas, convirtiéndose en una de las principales fuerzas en la producción mundial de alimento. Tanto así, que la producción de especies acuícolas en 2020 fue superior en 30% a la media producida durante la década de los 2000 y 60% mayor a la media de la década de los 90 (FAO, 2022). Sin embargo, la creciente expansión de esta industria se ha visto obstaculizada por diversos factores como las repercusiones de la enfermedad COVID-19 (2019 – 2021), nuevos brotes de enfermedades virales y bacterianas, y cuestiones políticas, ambientales y sociales.

1.4.2. Acuicultura de *Penaeus vannamei* en Ecuador

La producción de camarón blanco *P. vannamei* en Ecuador tuvo sus inicios hace más de cinco décadas en el cantón de Santa Rosa, provincia de El Oro. Desde entonces, se han desarrollado cerca de 220 mil hectáreas de piscinas de producción (Piedrahita, 2018). Inicialmente los cultivos se realizaban de manera extensiva (densidades de 8-10 camarones/m²) y alcanzaban un máximo de dos ciclos por año. En cambio, en la actualidad se realiza mayormente cultivos semi-intensivos (densidades de 12-25 camarones/m²) y se alcanza hasta 3 ciclos de producción al año.

Para la economía interna del Ecuador, la industria camaronera es considerada una base sustancial para el desarrollo económico debido a que el camarón se convirtió en el principal producto de exportación superando al petróleo. El cultivo de camarón blanco se convirtió en la principal fuente de ingresos por exportaciones del país con 4.396 millones de dólares (USD), superando por primera vez al petróleo crudo que consiguió un valor de 4.082 millones de dólares (USD) en el periodo de enero a julio del presente año (El Universo, 2023).

La acuicultura ecuatoriana debe gran parte de su éxito a las condiciones climáticas del país, que favorece el desarrollo del camarón y a la implementación de nuevas tecnologías que

optimizan la producción de este crustáceo. Además, el camarón ecuatoriano es considerado como un producto destacado de consumo gracias a sus altos estándares de calidad y trazabilidad (Ávila et al., 2021).

1.4.3. *Vibrio parahaemolyticus* como agente patógeno causante de AHPND

A inicios del año 2009, el cultivo de camarón al sureste de China era considerada la industria camaronera más productiva del mundo. Sin embargo, una enfermedad emergente conocida como el Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS) causó altas pérdidas en la producción de este sector. Actualmente, esta enfermedad fue renombrada como la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) ya que se demostró que esta enfermedad afecta principalmente las células epiteliales de hepatopáncreas (Cuéllar-Anjel et al., 2012; Varela & Peña, 2014).

Para el 2012, el AHPND se había expandido a países como Vietnam, Malasia y Tailandia. Al inicio, la etiología de esta enfermedad era desconocida. Después de varios estudios realizados por Lightner et al. en el 2012, se demostró que la naturaleza de esta enfermedad está mediada por toxinas.

En otros estudios, se consiguió determinar que el AHPND se origina tras la colonización del tracto digestivo del camarón por una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* que libera las toxinas PirA y PirB mediante genes que codifican para éstas, las cuales afectan el hepatopáncreas (Cuéllar-Anjel et al., 2012; Tran et al., 2013); González-Gómez et al., 2023. Por su lado, Cuéllar-Anjel y Brock (2018) propusieron una nueva hipótesis sobre la patogénesis de esta enfermedad. Estos investigadores sugieren que partículas orgánicas en suspensión y en el fondo de reservorios y piscinas de cultivo de camarón, son colonizadas por cepas bacterianas patógenas causantes de AHPND, las cuales liberan toxinas mediante el proceso de *quorum sensing* e impregnan la

partícula orgánica con altas cantidades de toxinas. El camarón ingiere estas partículas cargadas de toxinas y se enferma muy rápidamente, especialmente si está en estadio de postlarva.

Los signos clínicos que aparecen con esta enfermedad son: hepatopáncreas pálido a blanco y atrofiado, nadado errático, crecimiento reducido en un 50%, textura blanda del exoesqueleto, anorexia y contenido intestinal interrumpido (Varela & Peña, 2014).

Durante el desarrollo de la enfermedad se presentan tres fases: aguda, intermedia y terminal. Mediante cortes histopatológicos podemos describir las características que diferencian las fases. En la fase aguda, se observan anomalías que producen pérdidas en el funcionamiento de las células epiteliales de almacenamiento y digestión de los túbulos del hepatopáncreas. Además, se detiene la división de las células germinales y existe un gran desprendimiento de las células hacia el intestino, lo que causa la atrofia del hepatopáncreas. En la fase intermedia, se empiezan a presentar túbulos melanizados por necrosis en zonas proximales y avanzando hacia zonas distales mientras continúa el desprendimiento celular. Por último, durante la fase terminal de la enfermedad, se alcanza la destrucción del hepatopáncreas por acción bacteriana primaria y secundaria. Existe una fuerte infiltración hemocítica intra y extra tubular en conjunto con melanosis y necrosis severa (Lightner et al., 2012).

Esta enfermedad aparece en los criaderos de postlarva en los primeros 20 a 30 días de cultivo. Las mortalidades pueden alcanzar el 100% en estanques severamente afectados (Cuéllar-Anjel, 2013).

1.4.4. Sistema inmunológico en camarones *P. vannamei*

El sistema inmune tiene como función principal preservar la individualidad biológica, pues diferencia y elimina todo material o cuerpo no identificado en los tejidos del animal por medio

de la conjugación de los efectores celulares y humorales, los crustáceos como los camarones poseen un sistema inmune muy diferente a los de los vertebrados, esto se debe a que en ellos hay una ausencia tanto de células linfoides como de inmunoglobulinas (Rendón & Balcázar, 2003).

El sistema inmune del camarón está conformado por las barreras físicas y por las células humorales, y aunque no tengan respuestas inmunes específicas para identificar agentes infecciosos, su sistema inespecífico es muy desarrollado. Este es un sistema que está basado en hemocitos, enzimas antioxidantes y varias células proteicas antimicrobianas que sirven de defensa (Moreno et al., 2013; Morales y Cuéllar-Anjel, 2014).

Por otra parte, existen factores que pueden repercutir a este sistema inmune, estos factores pueden ser tanto de carácter ambiental, que involucra los factores bióticos y abióticos, nutricionales y energéticos. Específicamente los abióticos son los que más influyen al camarón para resistir las enfermedades dentro de un estanque acuícola, entre estos factores se encuentran: la salinidad, la temperatura, el oxígeno, el pH, y los compuestos nitrogenados (Martín et al., 1985).

Para evaluar la respuesta inmune del camarón se realiza una medición de parámetros inmunológicos, recuento total de hemocitos (hemograma), actividad fagocítica, actividad bactericida, actividad lisozimática y la actividad superóxido dismutasa, todas estas mediciones se realizan mediante la toma de muestra de la hemolinfa del camarón (Luna-González et al., 2013).

1.4.5. Principios activos sometidos contra el *Vibrio parahaemolyticus*

1.4.5.1. Lisoizima. Es una enzima presente en diversos organismos, incluyendo animales y plantas, que tiene actividad antimicrobiana. La lisoizima recombinante del camarón tigre japonés y del camarón blanco ha mostrado actividad lítica contra varios tipos de bacterias patógenas en sistemas acuícolas, incluyendo especies de *Vibrio* (Hikima et al., 2003). Además, se ha demostrado que su aplicación en combinación con bacteriófagos puede mejorar la actividad *in vitro* del fago y potenciar su uso en sistemas acuícolas. También se ha investigado el efecto de la lisoizima en la salud y productividad del camarón blanco del Pacífico, mostrando una mejora en la tasa de crecimiento, capacidad antioxidante y parámetros inmunes de la hemolinfa (Javahery et al., 2019). Además, se ha planteado la hipótesis de que la suplementación con lisoizima reduce el número de vibrios y promueve la expresión de genes relacionados con actividad inmune y antioxidante, lo que resulta en resistencia a la infección con vibrios y brotes del Síndrome de Heces Blancas (Woraprayote et al., 2020). La actividad enzimática a nivel gastrointestinal, el incremento en los niveles de lisoizima en la hemolinfa y la mejora en la actividad de las enzimas digestivas sugieren que la lisoizima estimula la expresión de genes en el borde de cepillo del tracto gastrointestinal del camarón, mejorando la utilización de nutrientes de la ración y promoviendo una mejor salud del tracto gastrointestinal (Javahery et al., 2019). De esta manera se cree que la lisoizima puede ser un compuesto con un gran potencial de aplicación en sistemas acuícolas principalmente como medida para el control de patógenos y la mejora de la salud y productividad de los camarones.

1.4.5.2. Simbiótico El simbiótico hace referencia a la combinación de un probiótico y un prebiótico. El término simbiótico hace referencia a un suplemento dietético conformado tanto por prebióticos y por probióticos. Los prebióticos son suplementos que ayudan al crecimiento y supervivencia de los probióticos dentro del tracto intestinal del huésped, alterando la comunidad de bacterias que se encuentran presentes en el intestino (Mondal et al., 2017). Para la conformación de un simbiótico es importante considerar la capacidad que poseen estos compuestos. En el caso particular del probiótico, su elección depende de la capacidad que posee el mismo para promover el crecimiento de bacterias beneficiosas en el huésped (Kolida & Gibson, 2011). Mientras que, en los prebióticos la elección se basa en la capacidad que tienen los mismos para optimar el crecimiento de los probióticos. Pese a esto, la composición de un simbiótico depende netamente del mecanismo de acción del prebiótico en la especie huésped (Mazzola et al., 2015). Es por esto por lo que los prebióticos más aptos para formar parte de los simbióticos son los que poseen un bajo grado de polimerización, puesto a que hidrolizan cepas beneficiosas y producen metabolitos que pueden ser provechosos para el huésped (Grimoud et al., 2010). La administración de simbióticos en camarones ha resultado en gran manera efectiva en comparación de los probióticos o prebióticos suministrados individualmente, mejorando la supervivencia y calidad de agua (Merrifield et al., 2010; Sekhon & Jairath, 2010; Zubaidah et al., 2015). Además, ha mejorado la eficiencia de las bacterias probióticas, y proliferado varios parámetros inmunológicos que aumentan la capacidad de competitividad contra infecciones de origen bacteriano y viral (Huynh et al., 2018; Nurhayati et al., 2014).

1.4.5.3 Bacteriófago. También conocidos como “fagos”, son virus predadores naturales específicos de bacterias, se auto limitan y se autorepican en una célula hospedera y se pueden adaptar a cualquier bacteria resistente (Subhashini & Kumar, 2020). La terapia con bacteriófagos es considerada como una de las alternativas más viables a los antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas en los sistemas de acuicultura. El uso de bacteriófagos para controlar infecciones bacterianas en producción de alimento acuático tiene gran potencial para combatir dos problemas: las infecciones bacterianas y la contaminación por residuos.

La aplicación de fagos en la acuicultura ha demostrado tener buenos avances por sobre el uso de antibióticos. El uso de fagos para el control biológico de patógenos en camarones cultivados ha generado un creciente interés en los últimos años, ya que, no existen residuos de antibióticos o toxicidad asociadas con esta terapia. Su modo de accionar implica unirse a la bacteria hospedera específica y matar por replicación interna y posterior lisis bacteriológica.

1.4.5.4 Proteína suero de leche. Es un producto de origen orgánico que está compuesto por bacterias ácido-lácticas enriquecidas con nutrientes importantes como nitrógeno, calcio, proteínas y carbohidratos (Nindalگو & Grupograndes, 2023). Estas bacterias tienen la capacidad de transformar azúcares en ácido láctico, controlar patógenos y enfermedades, solubilizar el fósforo en la tierra y modificar el pH en el área que se aplica. Asimismo, activa los mecanismos de defensa de la planta y mejora las condiciones para el desarrollo del cultivo, promoviendo la formación de clorofila, el metabolismo de la planta y la división celular. En adición a esto, mejora la estructura física de los suelos, aumenta la utilización de nutrientes y la calidad del cultivo,

retiene el agua, aumenta la fertilidad y permeabilidad del suelo y promueve el crecimiento robusto de las plantas (Nindalgo & Grupograndes, 2023).

1.4.5.5 Proteína de plasma bovino. Es un producto alimenticio funcional obtenido a partir de la fracción plasmática de la sangre bovina. Este producto en polvo seco por atomización se compone principalmente de proteínas y cuenta con un alto porcentaje de digestibilidad. Además, su contenido de ceniza, humedad y grasa es bajo, lo que lo hace ideal para su uso en la alimentación de animales. Incluye varias proteínas de alto índice de digestibilidad y valor nutricional, principalmente albúmina e inmunoglobulina, obtenidas a través de un proceso tecnológico que asegura la preservación de sus características bioquímicas originales, en conjunto con la seguridad alimentaria a lo largo del proceso de trazabilidad integral (Chuchird et al., 2021). El uso de este producto se da principalmente como método de prevención de vibrios. Su inclusión en la dieta de los animales ha demostrado reducir la mortalidad y prevenir la infección intestinal por bacterias patógenas. Este producto es utilizado como alimento para acuicultura, alimento para mascotas, alimento para cerdos y alimento para aves de corral. Su uso ha demostrado mejorar la conversión alimenticia, aumentar el incremento diario de peso de los animales y reducir el uso de antibióticos en los animales jóvenes.

1.4.5.6 Enzimas. En el campo de la acuicultura, son utilizadas para mejorar la calidad de agua y el suelo en los estanques acuícolas, pues estas cumplen con un papel catalizador, apresurando las reacciones bioquímicas que se dan tanto en el agua como

en el suelo, degradando cada uno de los compuestos orgánicos en la superficie o en el lugar donde se disperse (Santos, 2020). Cada enzima posee un modo de acción individual y es muy específica al realizar las reacciones químicas catalíticas. Las enzimas son producidas por diversos microorganismos entre los más populares se encuentran las especies de los *Bacillus*, los cuales producen enzimas extracelulares dadas por la fermentación aeróbica tales como la proteasa, la amilasa y la celulasa, que aceleran tanto la descomposición de la materia orgánica como la degradación del amoníaco, el cual es un compuesto tóxico presente en los tanques acuícolas (Mayer, 2016).

Capítulo 2

2. Metodología

Dentro de este capítulo se describirán la realización de pruebas *in vitro* que permitirán determinar la concentración óptima de cada producto que inhiba el crecimiento del *V. parahaemolyticus* entre las pruebas realizadas se encuentran MIC, y pruebas de sensibilidad. Por otra parte, también se describen el proceso de montaje, ejecución y toma de datos del bioensayo y de la elaboración del balanceado.

2.1 Pruebas *in vitro*

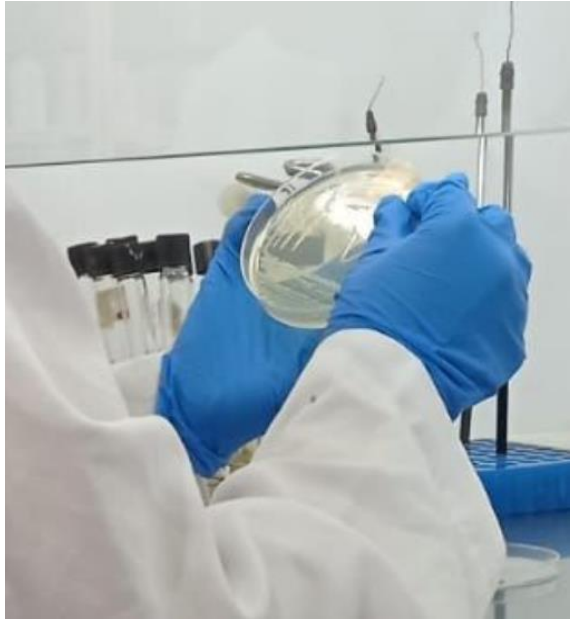
Las pruebas *in vitro* se realizaron para determinar las mejores dosis de los productos para inhibir el crecimiento de *V. parahaemolyticus* en camarones. A pesar de que el título del proyecto aclara que se trabajara con 3 productos, al final pudimos obtener resultados con 5 productos: lisozima, proteína de plasma bovino, enzimas, simbiótico y suero de leche.

2.1.1 Reactivación de la bacteria

Se obtuvo a través de una fuente de la ESPOL, una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* que estaba almacenada a una temperatura de -80°C, la cual fue cuidadosamente reactivada protegiendo su patogenicidad, con el fin de ser utilizada en este estudio. El proceso implicó cultivo en agar LB (Luria-Bertani), el cual proporcionó condiciones adecuadas para su recuperación, utilizando una técnica de siembra por agotamiento. La incubación se realizó bajo una temperatura controlada de 35°C durante un periodo de 24 horas, lo que permitió un buen crecimiento bacteriano. La bacteria fue repicada diariamente en medio LB durante una semana de acuerdo con los análisis *in vitro* planificados para mantener la cepa.

Figura 1.

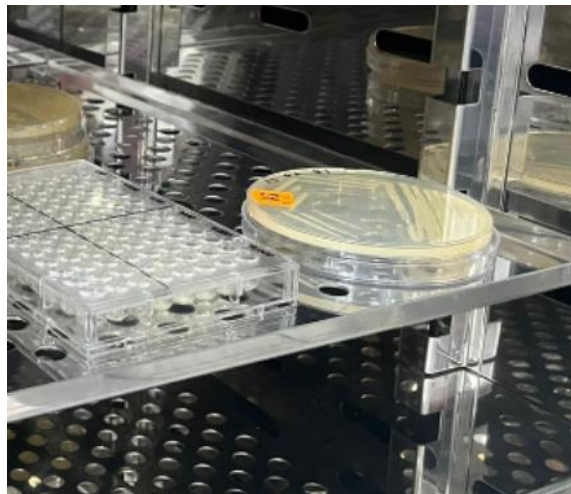
*Siembra de bacteria patógena de *V. parahaemolyticus* en agar LB empleando técnica de siembra por agotamiento*



Nota. En la figura se observa el proceso de siembra de bacteria patógena que es primordial para la reactivación de esta, haciéndola apta para usarse en pruebas *in vitro*.

Figura 2.

*Incubación de bacteria patógena de *V. parahaemolyticus* en agar LB a 35°C*



Nota. En la figura se observa la bacteria patógena sembrada en agar e incubada durante 24 horas a una temperatura de 35°C con el fin de promover el crecimiento bacteriano.

2.1.2 Crecimiento de la bacteria

Para el crecimiento de la bacteria se emplearon tubos de ensayo estériles de 20 ml, los cuales fueron llenados con 9 ml de medio líquido LB. En cada tubo se inoculó una colonia de bacterias de la cepa patógena de *V. parahaemolyticus*. Posteriormente estos tubos fueron colocados en el Shaker dentro de la incubadora por un periodo de 2 horas. De cada tubo de ensayo se llenaron 3 pozos de una microplaca de ELISA (se trabajó por triplicado) poniendo en cada uno 200 µL de medio LB con bacterias. Se midió concentración bacteriana de cada tubo empleando un lector de microplacas de ELISA (SYNERGY HTX) con una longitud de onda de 600 nm, con el fin de confirmar que se obtuvo una concentración de 1×10^8 ($1.0 \text{E}+08$) UFC/ml. Finalmente, se realizaron varias diluciones de las bacterias con el objetivo de obtener las concentraciones ideales para las pruebas *in vitro* que se realizaron posteriormente.

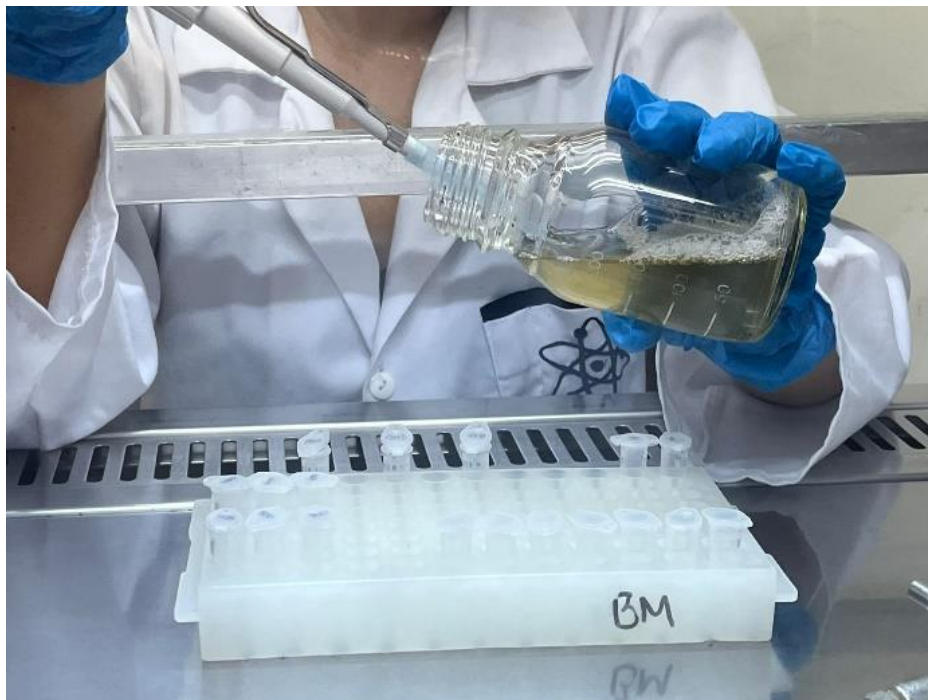
2.1.3 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Esta prueba se realizó con lisozima, enzimas y proteína de plasma bovino. Partiendo de una colonia bacteriana de *V. parahaemolyticus* cultivada por 24 horas a 34°C en medio LB, se inoculó en medio líquido LB y se dejó creciendo por 2 horas a 30°C. Simultáneamente, se prepararon los productos experimentales a las concentraciones seleccionadas para este estudio en microtubos de 2 ml, que fueron las siguientes: lisozima: 500, 1000 y 2000 ppm; enzimas: 10%, 20%, 40%, 50%, 70% y 100% y proteína de plasma bovino: 3000, 6000 y 10000 ppm. Asimismo, se preparó el antibiótico Florfenicol a 300 ppm y se realizaron diluciones con solución salina al 2%, con el fin de obtener una concentración de 50 ppm, la cual fue utilizada como control. En una microplaca de ELISA, se probaron las diferentes concentraciones del

producto frente a una concentración de bacteria de 1×10^5 (1.0×10^5). Una vez llenos los pozos de la microplaca, esta fue incubada a 35°C durante 6 horas con lecturas cada hora, con el fin de monitorear inhibición del crecimiento bacteriano en función del tiempo.

Figura 3

Preparación de las concentraciones de lisozima que se utilizó en el MIC



Nota. En el proceso se muestra cómo se realizó la dilución del producto (previamente pesado y colocado en los microtubos de $2000\ \mu\text{L}$) con medio líquido LB.

Figura 4

Preparación del Florfenicol (antibiótico) que se usó como tratamiento control en los MIC



Nota. La imagen muestra la preparación del antibiótico que tuvo que ser disuelto con etanol al 99% y luego con solución salina al 2% para que llegue a la concentración deseada.

Figura 5

Incubación de la microplaca de ELISA previos a la lectura de las mismas



Nota. Se realizó la incubación a 35°C, por un tiempo de 24 a 48 h.

Figura 6

Lectura de las microplacas ELISA en el lector de microplacas



Nota. El lector fue desinfectado antes y después de cada lectura.

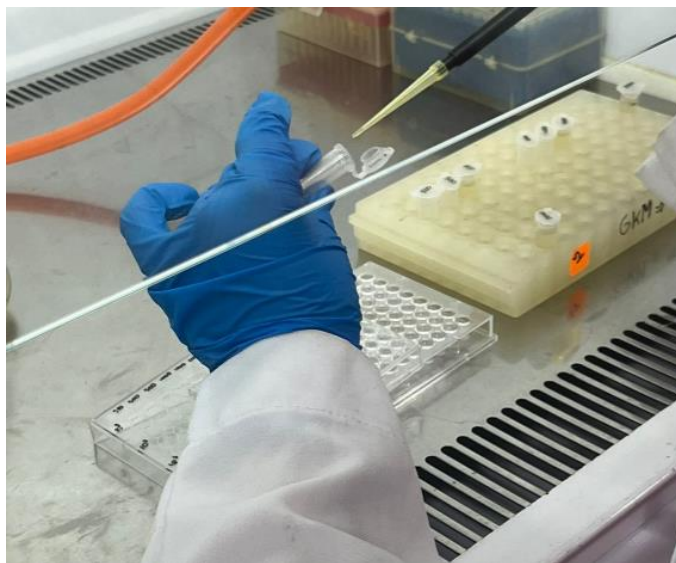
2.1.3.1 Lisozima

En este proceso, se partió de una solución inicial de medio LB + lisozima con una concentración de 10000 ppm, de donde se obtuvieron las dosis a evaluarse de 500, 1000 y 2000 ppm. Cada dosis tuvo 10 réplicas, en donde se colocó 180 uL de las dosis experimentales + 0.20 uL de bacteria con una concentración de 1×10^5 UFC/ml (1.0×10^5).

Además, se tuvo un control de 180 uL de medio + 0.20 uL de bacteria y un segundo control donde se aplicó 180 uL florfenicol a 50 ppm + 20 uL de la misma bacteria, un blanco, en donde se colocó 200 uL de medio puro LB. Una vez llena la placa ELISA, se realizó la lectura inicial y se colocó en la incubadora a 35 °C. Se realizaron las lecturas cada hora durante 6 horas.

Figura 7

Llenado de la microplaca de ELISA con las diferentes concentraciones del tratamiento, un blanco (medio líquido LB puro) y un control (antibiótico)



Nota. Todas las diluciones fueron realizadas con solución salina al 2% y esta solución abarco 10 réplicas para cada concentración.

2.1.3.2 Enzimas

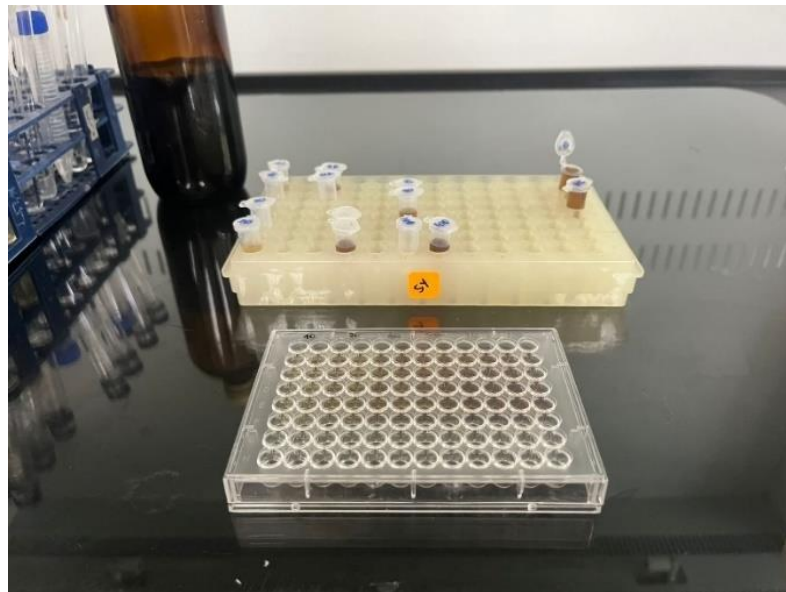
En este proceso, se utiliza una metodología muy similar a la descrita previamente, con concentraciones distintas en los tratamientos. De la misma manera, se partió de una solución inicial de medio LB + enzimas. Para las enzimas se utilizó el 10%, 20%, 40%, 50%, 70% y el 90% de concentración. Cada tratamiento tuvo 10 réplicas en dónde se colocó 180 uL del tratamiento + 20 uL de bacteria con una concentración de 1×10^5 UFC/ml ($1.0E+05$).

Además, se utilizó un control con 180 uL de medio líquido LB + 20 uL de bacteria a la misma concentración y un segundo control de 180 uL florfenicol a 50 ppm + 20 uL de la misma bacteria. Por último, se empleó un blanco con 200 uL de medio líquido LB puro. Una vez llena la

microplaca ELISA, se realizó la lectura inicial y se colocó en la incubadora a 35°C. Se realizaron las lecturas cada hora durante 5 horas.

Figura 8

Microplaca de ELISA con enzimas a diferentes concentraciones antes de realizar la primera lectura.



Nota. Las lecturas se realizaron cada dos horas para observar el comportamiento enzimático

2.1.3.3 Proteína de plasma bovino

En esta prueba se probaron 3 dosis distintas, 3000, 6000 y 10000 ppm. Siguiendo la metodología mencionada anteriormente, cada dosis evaluada tuvo 10 réplicas, en donde se colocó 180 uL de las dosis experimentales + 0.20 uL de la bacteria con una concentración de 1×10^5 UFC/ml (1.0×10^5). También, se usó un control de 180 uL de medio LB + 20 uL de la bacteria y un segundo control donde se usó 180 uL de florfenicol a 50 ppm + 20 uL de la misma bacteria, un blanco, en donde se colocó 200 uL de medio LB puro y se utilizó florfenicol a 50

ppm. Una vez llena la placa, se realizó la lectura inicial y se colocó en la incubadora a 35°C. Se realizaron las lecturas cada hora durante 6 horas

2.1.4 Pruebas de antagonismo

Esta prueba se realizó para el simbiótico y el suero de leche. Partiendo de una colonia bacteriana de *V. parahaemolyticus* cultivada por 24 horas a 35°C en medio LB, se inoculó en medio líquido LB y se dejó creciendo por 2 horas a 32°C en el Shaker. Simultáneamente, se prepararon los productos experimentales a las concentraciones seleccionadas para este estudio en microtubos de 2 ml, que fueron las siguientes: simbiótico 150000 ppm, 250000 ppm y 800000 ppm; suero de leche: 10000 ppm, 20000 ppm y 30000 ppm.

Anteriormente, se prepararon cajas de agar Mueller Hinton, en las cajas se sembró la bacteria con una técnica de barrido a una concentración de 1×10^6 UFC (1.0×10^6). Posterior a esto, se realizaron 4 perforaciones en el agar para introducir 200 µL de las diferentes concentraciones de los productos experimentales a probar, en este caso 4 para cada producto, frente al control (Florfenicol a 50 ppm).

Una vez llenas, las cajas Petri fueron encubadas durante 24 horas a una temperatura constante de 35°C. Ya cumplido el tiempo de incubación se procedió a medir los halos de inhibición alrededor de las perforaciones. Esto permitió determinar cuál fue la concentración más efectiva para inhibir el crecimiento de la bacteria patógena.

Para avalar la precisión y reproducibilidad de esta prueba se efectuaron 3 réplicas, evaluando la efectividad de estas concentraciones frente a la bacteria.

Figura 9

Siembra de bacteria patógena V. parahaemolyticus con hisopos esterilizados aplicando la técnica de siembra por barrido



Nota. El crecimiento de bacterias se observó 24 horas después de la siembra.

Figura 10

Perforación del agar en 4 pocillos para colocar las diferentes concentraciones a probar del simbiótico



Nota. Las puntas fueron esterilizadas en autoclave antes de ser usadas en los procesos.

2.1.4.1 Simbiótico

En esta prueba se testearon 3 concentraciones distintas: 150000 ppm, 250000 ppm y 800000 ppm, contra la bacteria patógena a una concentración de 1×10^6 UFC ($1.0E+06$). Esta fue sembrada por barrido con hisopos esterilizados por calor. Posterior a esto, con el reverso de puntas estériles de micropipetas, se realizaron los agujeros (4) en donde se introdujo el producto experimental. El producto fue pesado y diluido en solución salina al 2%, para luego ser introducido con ayuda de la micropipeta hasta llenar el agujero hasta el ras. Se utilizó un control de antibiótico con florfenicol a una concentración de 150 ppm. Cada producto tuvo 4 réplicas.

Figura 11

Introducción de las distintas concentraciones de simbiótico



Nota. Los agujeros eran llenados hasta el ras con aproximadamente 200 μ L.

2.1.4.2 Suero de leche

En esta prueba se probaron 3 concentraciones distintas: 10000 ppm, 20000 ppm y 30000 ppm, contra la bacteria patógena a una concentración de 1×10^6 UFC (1.0×10^6). Misma que fue sembrada por barrido con hisopos esterilizados por calor. Posterior a esto, con el reverso de puntas estériles de micropipetas, se realizaron los agujeros (4) en donde se introdujo el producto experimental. El producto fue pesado y diluido en solución salina al 2%, para luego ser introducido con ayuda de la micropipeta hasta llenar el agujero hasta el ras. Se utilizó un control de antibiótico con florfenicol a una concentración de 150 ppm. Cada producto tuvo 4 réplicas.

Figura 12

Elaboración de pruebas de sensibilidad para simbiótico y suero de leche.



Nota. Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24 horas para posteriormente medir halos de inhibición bacteriana.

2.2 Bioensayo

2.2.1 Montaje del sistema para las pruebas de crecimiento

Para comenzar el bioensayo se limpiaron, desinfectaron y llenaron las peceras con 20 L de agua a una salinidad de 30 ppt y se proporcionó aireación a cada una de ellas, a fin de medir la eficiencia del sistema. El agua que se utilizó fue proporcionada por el Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM), ubicado en San Pedro, Santa Elena. El agua tenía una salinidad inicial de 35 ppt y con el fin de disminuir la salinidad se diluyó con agua potable previamente decolorada. Adicionalmente, se colocaron termostatos para subir la temperatura en

las peceras y que todas estuvieran en un promedio de 28 °C. El diseño incluía a los 5 tratamientos (lisozima, proteína de plasma bovino, simbiótico, bacteriófago y el control), cada uno contó con 3 réplicas. Cada pecera tenía aireación por una bomba de aire (JAC®) y un termostato (JAC®).

Figura 13

Limpieza y desinfección de las peceras previo al montaje del bioensayo



Nota. Las peceras fueron desinfectadas con etanol 70% y cloro al 2%, luego se ventilaron por 48 horas.

Figura 14

Montaje del bioensayo para las pruebas de crecimiento



Nota. Cada uno de los tratamientos fueron llevados a las mismas condiciones, teniendo 3 réplicas por cada tratamiento.

Dado esto, se efectuaron pruebas iniciales en todas las peceras para medir pH, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, así como también amonio, nitritos y nitratos. Se determinó que todos los parámetros estaban dentro de los rangos óptimos para el inicio de las pruebas.

Figura 15.

Preparación del agua a utilizar en las pruebas de crecimiento



Nota. La imagen presenta el proceso de filtración del agua preparada para la experimentación.

Tomado por Yumi Medina, 2023

Figura 16.

Llenado de las peceras para las pruebas de crecimiento con 4 tratamientos y 1 control



Nota. La imagen presenta el diseño experimental fijado para las pruebas de cada tratamiento experimental tuvo 3 réplicas. Tomado por Yumi Medina, 2023.

2.2.2 Preparación de dietas experimentales

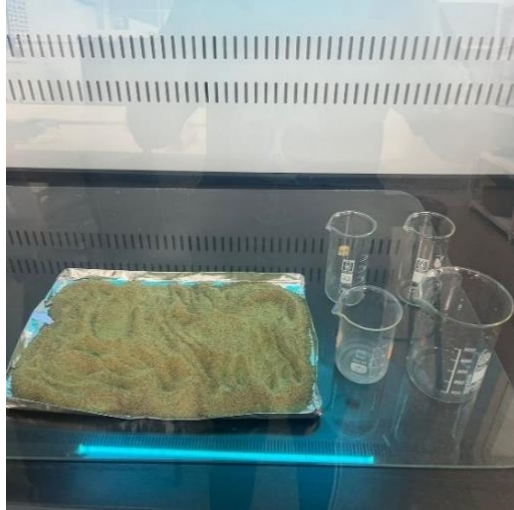
Para la preparación de los tratamientos experimentales se utilizó un balanceado peletizado de 2 mm de diámetro y 27% de proteína marca Agripac®. En total, se prepararon 4 dietas experimentales, cada una representaba un tratamiento con el producto experimental, lo que permitió la comparación entre diversos tratamientos y el grupo control.

La preparación de las dietas implicó un proceso cuidadoso que permitió garantizar la eficacia de la dieta experimental. Se empleó 250 g de balanceado sin aditivo, que fue esterilizado y expuesto a rayos UV para eliminar contaminantes durante el proceso de elaboración. Una vez esterilizado, el balanceado fue triturado con ayuda de un procesador.

Por cada 50 g de balanceado se utilizaron 50 mL de agua destilada, teniendo una relación 1:1. Para la reconstrucción de los pellets, se utilizó una moladora manual. Para el tiempo de secado, se utilizó un horno con rejillas (ISUZU) y temperatura modificable según se requirió. Por otro lado, se suministró un control, que consistía en el balanceado sin aditivos. Este proceso fue realizado 3 veces para garantizar el suministro de alimento en buen estado.

Figura 17

Esterilización del balanceado comercial triturado



Nota. La imagen presenta el proceso de esterilización mediante rayos UV en una cámara de flujo laminar. Tomado por Yumi Medina, 2023.

Figura 18

Pesaje del alimento triturado y previamente esterilizado



Nota. El balanceado utilizado, fue previamente esterilizado por rayos UV, y fue almacenado correctamente para no perder cualidades físicas del mismo.

Figura 19

Hidratación del pellet con agua destilada



Nota. Se utilizaron vasos de precipitación que se cubrieron con aluminio y reposó durante aproximadamente 1 hora hasta que el pellet absorbió el agua.

2.2.2.1 Bacteriófagos. Para este tratamiento, 50 g del balanceado triturado fueron hidratados con 50 ml de agua destilada y 0.5 g del bacteriófago. Esta mezcla fue moldeada y reconstituida para su posterior secado a 30° C durante 4 h con el objetivo de no inactivar el agente biológico del producto. El balanceado tenía una concentración de 10 g de bacteriófagos por kg de alimento.

2.2.2.2 Lisozimas. Para la dieta con la lisozima, se utilizaron 50 g de alimento esterilizado y molido, el cual fue hidratado con 50 mL de agua destilada y 0.5 g de lisozima, para posteriormente ser reconstruido. Luego de la reconstrucción, este fue secado a 30°C en un horno por un lapso de 4 h. El balanceado tenía una concentración de 10 g de lisozima por kg de alimento.

2.2.2.3 Simbiótico. Para el simbiótico, se utilizaron 50 g de alimento esterilizado y triturado, hidratado con 50 ml de agua destilada y 7.5 g de simbiótico y luego fue reconstruido para posteriormente ser secado en el horno a 50 °C em 2 horas. En el caso del simbiótico se utilizó una dosis de 150 g de simbiótico por kilogramo de alimento.

2.2.2.4 Proteína de plasma bovino. Por último, en la proteína de plasma bovino se empleó la misma metodología, 50 g de alimento estéril y triturado con 50 mL de agua destilada. Se añadieron 1.5 g de la proteína. Luego se secó en el horno a 50°C en un tiempo de 2 horas. La concentración final del alimento fue de 30 g de proteína de plasma bovino por kg de alimento.

Figura 20

Proceso de reconstitución del alimento balanceado



Nota. Se utilizó un molino manual y el alimento era procesado y esparcido en una bandeja de aluminio.

Figura 21

Proceso de horneado del balanceado por tratamiento experimental



Nota. Cada uno de los balanceados fue horneado de acuerdo con la temperatura a soportar de cada producto, a fin de no descomponer (y dañar) los principios activos (biológicos) de cada uno (ver numerales 2.2.2.1 a 2.2.2.4 para ver las temperaturas por producto).

Figura 22

Producto final del balanceado con proteína de plasma bovino



Nota. Todos los balanceados fueron correctamente almacenados según su producto biológico.

2.2.3 Origen y aclimatación de camarones

Los camarones utilizados en el bioensayo se obtuvieron del laboratorio de Cultivo de Plancton ubicado en ESPOL. Se tomaron los parámetros iniciales de temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad. Después, se empezó la aclimatación de los animales, se hizo biometría inicial de los camarones y se registraron los pesos con ayuda de una balanza digital. Los camarones fueron pesados en grupos de 10 animales por muestra.

Figura 23

Pesaje de los camarones por pecera de tratamiento



Nota. Se realizó desinfección de cada uno de los materiales utilizados para el pesaje y se procuró pesar en un tiempo mínimo a fin de que los camarones se estresen lo más mínimo posible.

2.2.4 Fase de alimentación con tratamientos experimentales

La fase de alimentación con tratamientos experimentales tuvo una duración de 34 días. En el transcurso de este tiempo, los camarones fueron alimentados 2 veces al día con una tasa de alimentación del 10% de su biomasa, además diariamente se realizó sifoneo del alimento no consumido y materia fecal presente en las peceras antes de la alimentación, adicional, se midieron parámetros físicos de temperatura y oxígeno disuelto diariamente en cada una de las peceras. Parámetros químicos como amonio, nitritos y nitratos fueron medidos semanalmente.

Figura 24

Alimentación de camarones por tratamiento experimental



Nota. Se alimentó a los camarones con un porcentaje del 10% de su biomasa semanal

2.2.5 Registro de peso

Se registraron los pesos de los animales por tratamientos a la mitad de cada semana (cada miércoles), se registraron los valores a fin de comprobar una mejoría en el crecimiento debido a los diferentes tratamientos. Cabe recalcar que los camarones fueron pesados en “pull”, es decir, 10 animales por muestra.

2.2.6 *Análisis de resultados de pruebas in vitro y de crecimiento*

Se llevó a cabo un análisis de los resultados obtenidos mediante un estudio que evaluó el crecimiento de 4 tratamientos experimentales frente a un grupo control. Para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) a una vía, considerando las diferencias como significativas cuando la probabilidad de error “*P*” fue menor o igual a 0.05 ($P \leq 0.05$). Para el análisis, se comprobó inicialmente si los datos cumplían con normalidad y homogeneidad de varianzas. Para la variable “crecimiento” en el bioensayo, hicieron transformaciones con Log X, para el cumplimiento del ANOVA. Esta prueba se empleó para identificar cualquier variación en la supervivencia entre los tratamientos. Para los análisis *in vitro*, también se realizó una ANOVA entre las concentraciones probadas frente a un control (bacteria + medio) a fin de observar la dosis óptima de cada uno de los productos biológicos. Estos análisis estadísticos fueron interpretados utilizando el software de programación RStudio.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

Dentro de este proyecto integrador se presentan 3 tipos de resultados, resultados concernientes a las pruebas *in vitro*, a las pruebas *in vivo* o bioensayos y la elaboración y constitución del alimento. A continuación, se presentan los resultados de las pruebas *in vitro*. Dentro estas pruebas se encuentran los MIC y las pruebas de sensibilidad.

3.1 Pruebas *in vitro*

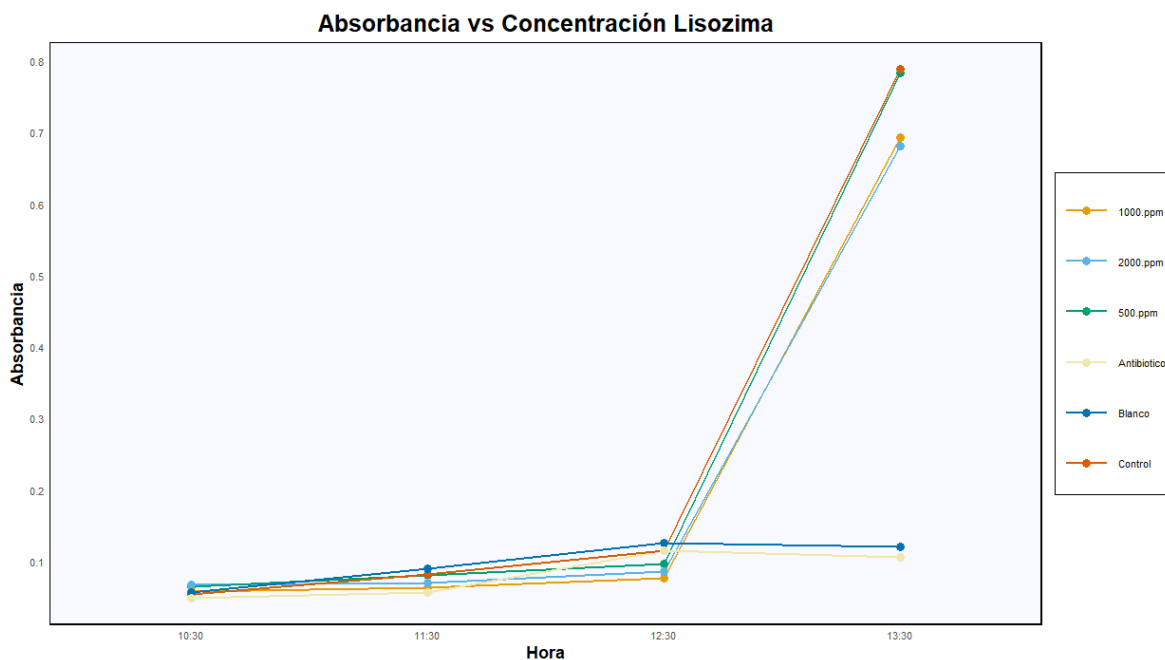
En el caso del MIC este fue realizado con la lisozima, el plasma y las enzimas.

3.1.1 Lisozima

Para la lisozima se probaron 3 diferentes concentraciones: 500, 1000 y 2000 ppm, las mismas que fueron comparadas con un grupo de control constituido por medio y bacterias.

Figura 25.

Concentración vs Absorbancia del producto experimental Lisozima en 4 h de incubación con los controles y antibiótico.



Nota. El gráfico presenta el comportamiento inhibitorio que otorga el producto utilizado (Lisozima) a distintas concentraciones, comparado a dos controles (Control + y Control -) y a un antibiótico comercial.

El gráfico de la figura 27 presenta las diferentes concentraciones utilizadas en el MIC en conjunto con el control positivo (bacteria + medio LB), el control negativo (medio LB puro) y el control de antibiótico (florfenicol 50 ppm + bacteria).

En la gráfica anterior, se observa el comportamiento típico de crecimiento bacteriano en un medio de cultivo, según se ha descrito en la literatura. Para este caso, se presentó una fase de adaptación de 2 horas, luego de lo cual se observó una fase de crecimiento exponencial entre la hora 2 y la hora 3 de cultivo.

Los resultados muestran que a las 2 horas de incubación todos los tratamientos actuaron de manera similar con respecto al antibiótico. Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos y el control se realizó un análisis de ANOVA. Los resultados fueron los siguientes.

Tabla 1.

Concentración vs Absorbancia (promedio $\pm$ desviación estándar) del producto experimental Lisozima en 4 h de incubación a diferentes concentraciones y en ausencia de producto experimental.

Concentración	Absorbancia 1h	Absorbancia 2h	Absorbancia 3h	Absorbancia 4h	Absorbancia 5h
1000 ppm	0.0634 $\pm$	0.0773 $\pm$	0.0773 $\pm$	0.3425 $\pm$	0.693 $\pm$
	0.0082 ^a	0.0165 ^a	0.0165 ^a	0.0195 ^a	0.040 ^a

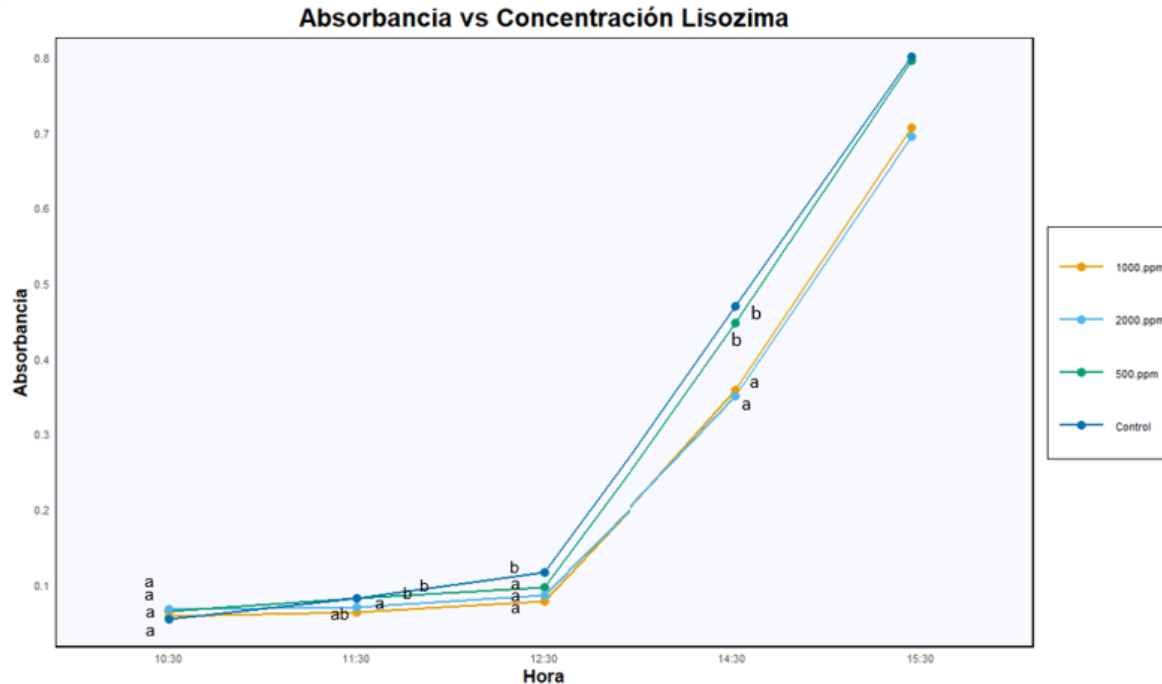
2000 ppm	0.0699 ±	0.0854 ±	0.0854 ±	0.3342 ±	0.681 ±
	0.0110 ^{ab}	0.0224 ^a	0.0224 ^a	0.0179 ^a	0.024 ^a
500 ppm	0.0812 ±	0.0967 ±	0.0967 ±	0.4324 ±	0.784 ±
	0.0242 ^b	0.0250 ^a	0.0250 ^a	0.0426 ^b	0.041 ^b
CONTROL	0.0814 ±	0.1156 ±	0.1156 ±	0.4548 ±	0.789 ±
	0.0090 ^b	0.0063 ^b	0.0063 ^b	0.0322 ^b	0.042 ^b

Nota. Para cada una de las concentraciones se utilizó 10 réplicas, letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos. Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

Figura 26

Concentración vs Absorbancia (promedio ± desviación estándar) del producto experimental

Lisozima en 5 h de incubación a diferentes concentraciones y en ausencia de producto



experimental.

Nota. Letras (a, b) diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos.

Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

En la primera hora de incubación (10:30 a.m.) se halló que no hay diferencias significativas en ninguno de los tratamientos frente al control, ni diferencias entre tratamientos.

En la segunda hora de incubación (11:30 a.m.) tampoco se muestran diferencias significativas entre las concentraciones 1000 ppm y 2000 ppm, sin embargo, sí las hay con el tratamiento de control y con la concentración 500 ppm. Adicionalmente, no se presentan diferencias significativas entre las otras concentraciones frente al control.

A las 12:30 a.m. no se revelaron diferencias significativas en la concentración 1000 ppm con respecto a las otras concentraciones (2000 ppm, 500 ppm), pese a esto sí hay diferencias significativas en las concentraciones 1000 ppm y 2000 ppm con respecto a la de control.

A las 14:30 no se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones 1000 ppm y 2000 ppm, pero sí hay diferencias entre la concentración de 1000 ppm en relación con el control y la concentración 500 ppm. Esto mismo se presenta para la concentración 2000 ppm, por otro lado, tampoco hay diferencia significativa entre el control y la concentración 500 ppm.

Por último, a las 15:30 no hay diferencias significativas entre las concentraciones 1000 ppm y 2000 ppm, pero sí hay diferencias entre la concentración de 1000 ppm en relación con el control y la concentración 500 ppm. Esto mismo se presenta para la concentración 2000 ppm, además, tampoco hay diferencias significativas entre el control y la concentración 500 ppm.

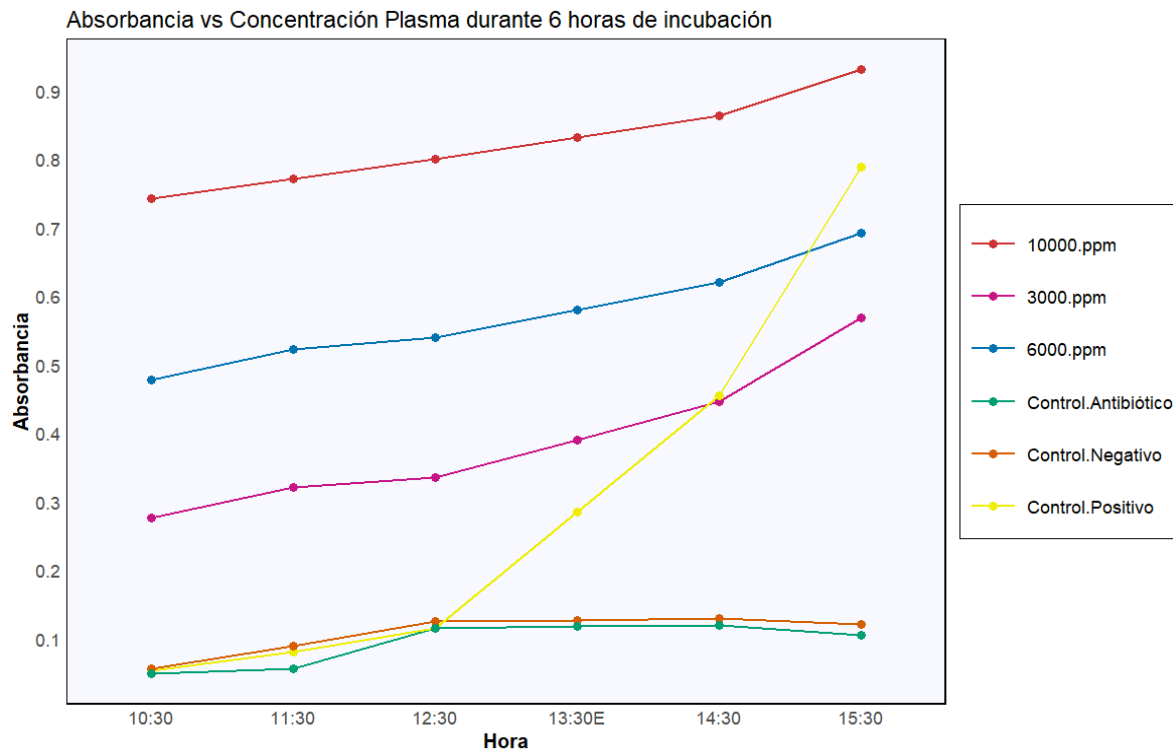
En esta prueba se buscó evaluar la eficacia de la lisozima en la inhibición de la bacteria *V. parahaemolyticus*. Se utilizaron 3 diferentes concentraciones de lisozima: 500, 1000, 2000 ppm, las mismas que fueron comparadas a un grupo de control (medio + bacteria). Las concentraciones 1000 ppm y 2000 ppm fueron las que mostraron una menor absorbancia a lo largo del tiempo inhibiendo el crecimiento de la bacteria en los intervalos muestreados.

3.1.2 Plasma bovino

Para el caso del plasma bovino también se probó 3 concentraciones que fueron de 10000 ppm, 3000 ppm y 6000 ppm juntamente con un grupo de control.

Figura 27

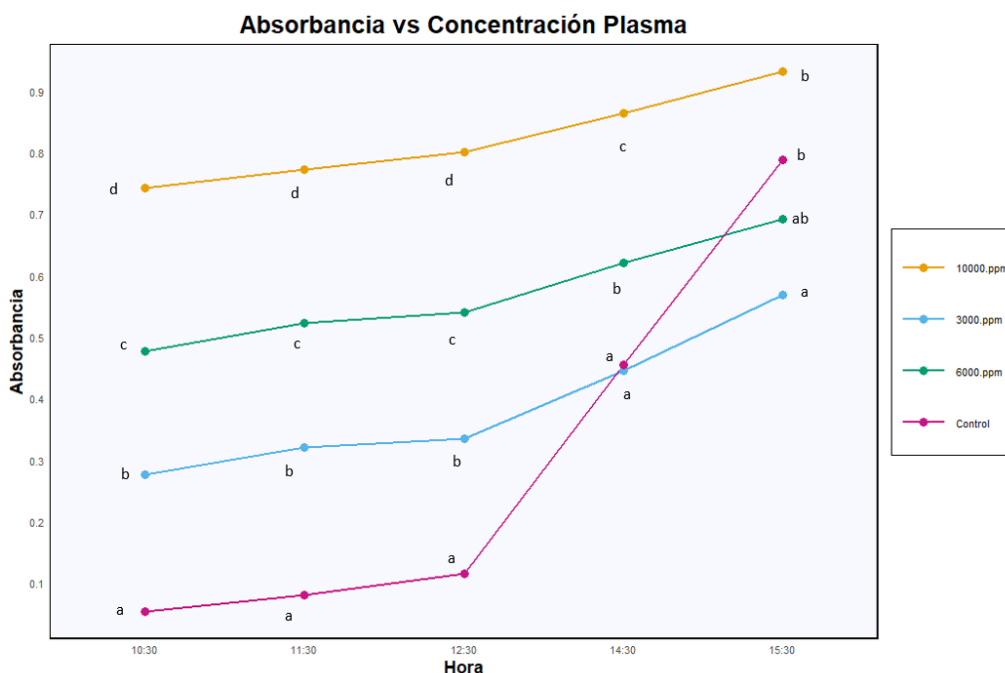
Concentración vs Absorbancia de la proteína de plasma bovino en 5 h de incubación.



Nota. La imagen presenta el desempeño de cada una de las concentraciones contra el crecimiento del plasma bovino, las cuales fueron comparadas con sus respectivos controles y un antibiótico comercial.

Figura 28

Comparación concentración vs. absorbancia de la proteína de plasma bovino en 5 h de incubación, a diferentes concentraciones y con un grupo de control.



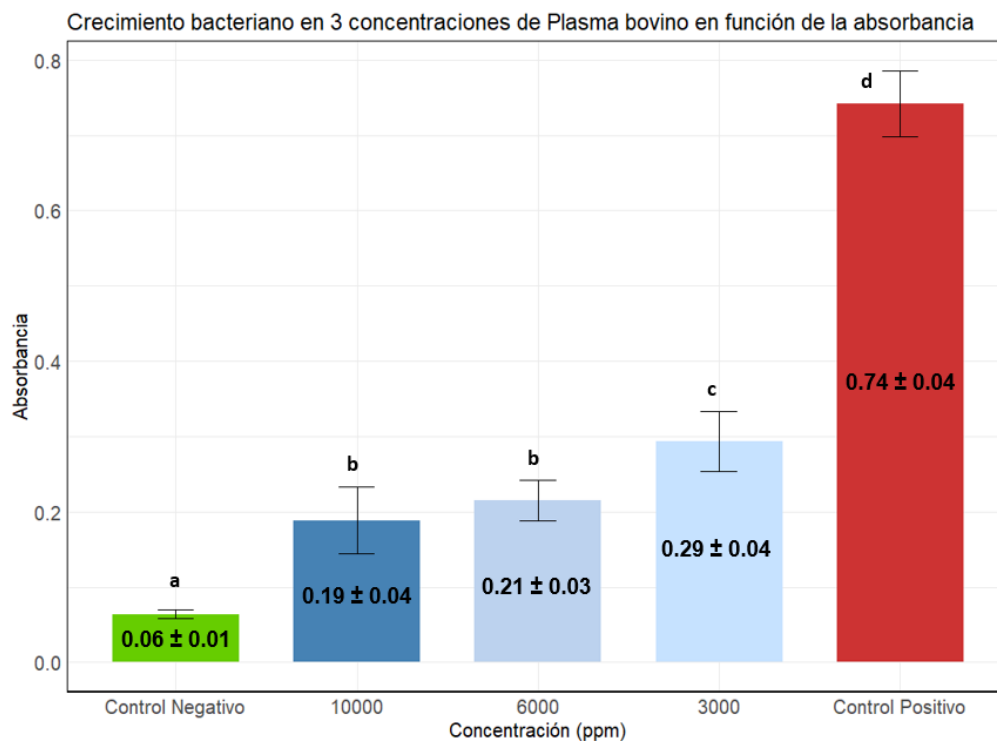
Nota. Letras (a, b, c, d) diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos. Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

El presente gráfico muestra el rendimiento alcanzado por las concentraciones fijadas para el plasma a lo largo de un periodo de 6 horas de incubación. Pese a esto, se llevó a cabo una diferencia entre la absorbancia de la primera hora y la sexta hora, con el propósito de identificar la concentración más idónea dentro de esta prueba. Esta consideración fue ejecutada debido a la presencia de turbidez en el producto probado, y se buscó asegurar que todas las concentraciones se encuentren en condiciones homogéneas para efectuar cálculos estadísticos precisos. Como

resultado de estas modificaciones, se presenta a continuación el gráfico del desempeño de las concentraciones dentro de las 6 horas de incubación.

Figura 29

Crecimiento bacteriano en 3 concentraciones de Plasma bovino en función de la absorbancia.



Nota. Letras (a, b, c, d) diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos. Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

El gráfico de la figura 29 muestra que el control negativo presentó diferencias significativas con respecto al control positivo y a las concentraciones de 3000 ppm, 6000 ppm y 10000 ppm, además las concentraciones de 1,0000 y 6000 ppm presentaron diferencias significativas con los controles y con la concentración de 3000 ppm, pero no presentaron diferencias significativas entre ellas, por otro lado, la concentración de 3000 ppm presentó diferencias con respecto a las concentraciones de 10000 ppm, 6000 ppm y los controles.

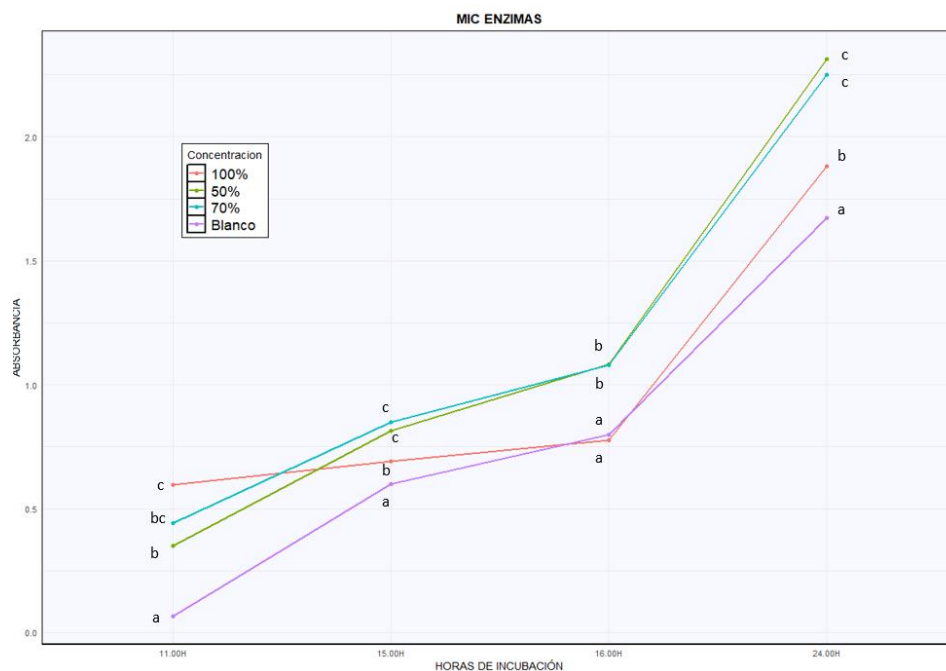
Asimismo, el gráfico revela que las concentraciones de 10000 ppm y 6000 ppm presentaron menores diferencias entre la primera y sexta hora de incubación lo que revela que las mismas inhibieron el crecimiento bacteriano dentro de estas horas de incubación, destacando dentro de esta prueba.

3.1.3 Enzimas

Para las enzimas, se tomaron 3 concentraciones las cuales correspondieron al 50, 70 y 100% de la concentración de las enzimas, estas se compararon con el control

Figura 30

Comparación de concentración vs Absorbancia de Enzimas en 4 h de incubación, a diferentes concentraciones y con un grupo de control.



Nota. Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos.

Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

Los resultados mostraron que en la etapa inicial sin incubación (11:00 a.m.) el control exhibió diferencias significativas con respecto a las otras concentraciones, por consiguiente, la concentración del 70% no presentó diferencias significativas con la concentración del 50% y la concentración 100%, además la concentración del 50% exhibió diferencias significativas con respecto a la concentración del 100%.

A la cuarta hora de incubación (15:00 p.m.) el control presentó diferencias significativas en referencia a los demás tratamientos, la concentración del 100% bajo su absorbancia en esta hora de incubación y también presentó diferencias significativa con los demás tratamientos, para el caso de la concentración de 50% y 70% en ambas no se visualizó diferencias significativas.

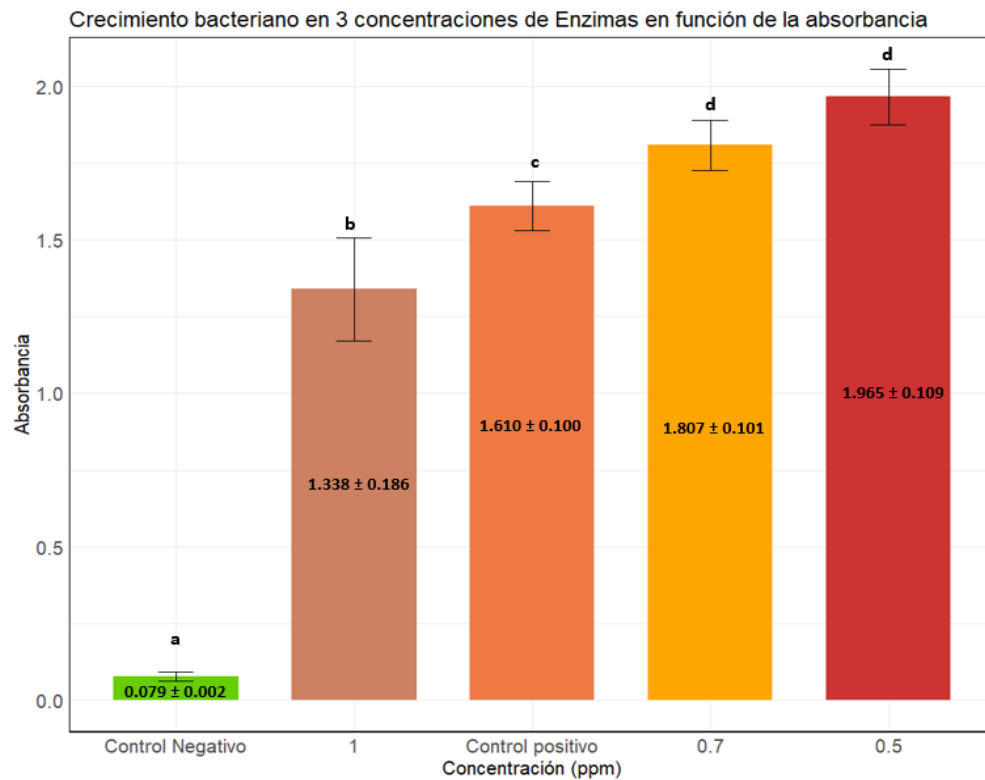
A la quinta hora de incubación (16:00 p.m.) el control presentó diferencias significativas con las concentraciones del 50 y 70%, pero no con la concentración del 100% esto da a entender que esta concentración ha servido como un medio para el crecimiento de esta.

A las 24 horas de incubación se observó que el control presenta diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos siendo esta menor a las absorbancias de las concentraciones estudiadas.

En esta prueba se visualizó que las enzimas en la concentración del 100% a lo largo del tiempo sirvieron como un medio para el crecimiento de la bacteria, a lo largo de las 4 primeras horas, pese a esto se ve un ligero cambio en la quinta hora, pues se observó una mínima inhibición en el crecimiento de la bacteria.

Figura 31

Crecimiento bacteriano en 3 concentraciones de Enzimas en función de la absorbancia.



Nota. Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos.

Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

En la figura 31, se observa el crecimiento bacteriano usando 3 dosis diferentes de enzimas, este grafico demuestra el desempeño que obtuvo cada una en el MIC, los datos revelan que la concentración al 100% fue la efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano por presentar diferencias significativas con el control positivo.

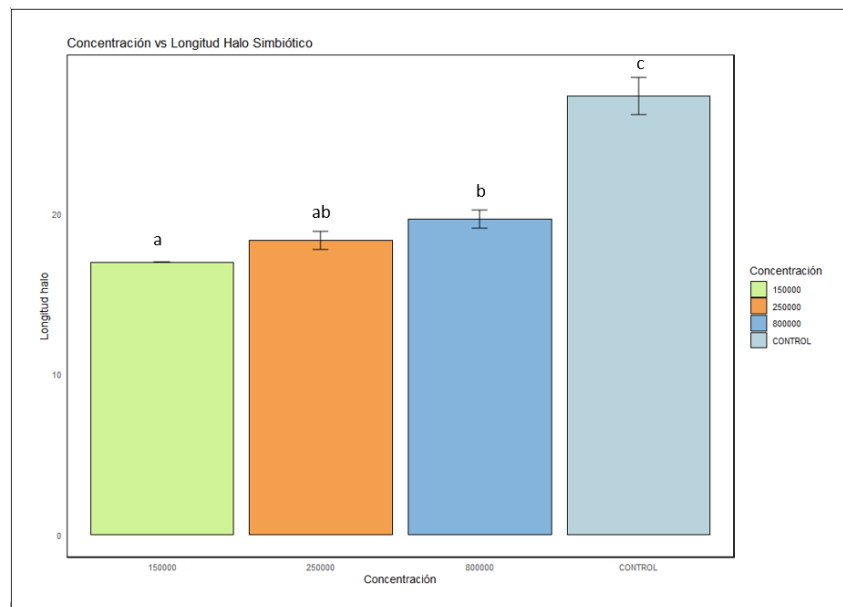
3.1.4 Simbiótico

Para las pruebas de antagonismo se midieron los halos de cada una de las concentraciones, esta prueba fue realizada con el Simbiótico y el suero de leche.

En el caso del simbiótico, a las 24 horas el crecimiento del halo fue proporcional a la concentración, siendo la concentración de 800000 ppm la que obtuvo mejores resultados, con halos cercanos a los 20 mm de diámetro, pese a esto el halo formado por el control fue aún más notorio, siendo este mayor que 30 mm.

Figura 32

Efecto de la concentración de simbiótico en la longitud de halo (promedio $\pm$ desviación estándar).



Nota. Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos. Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

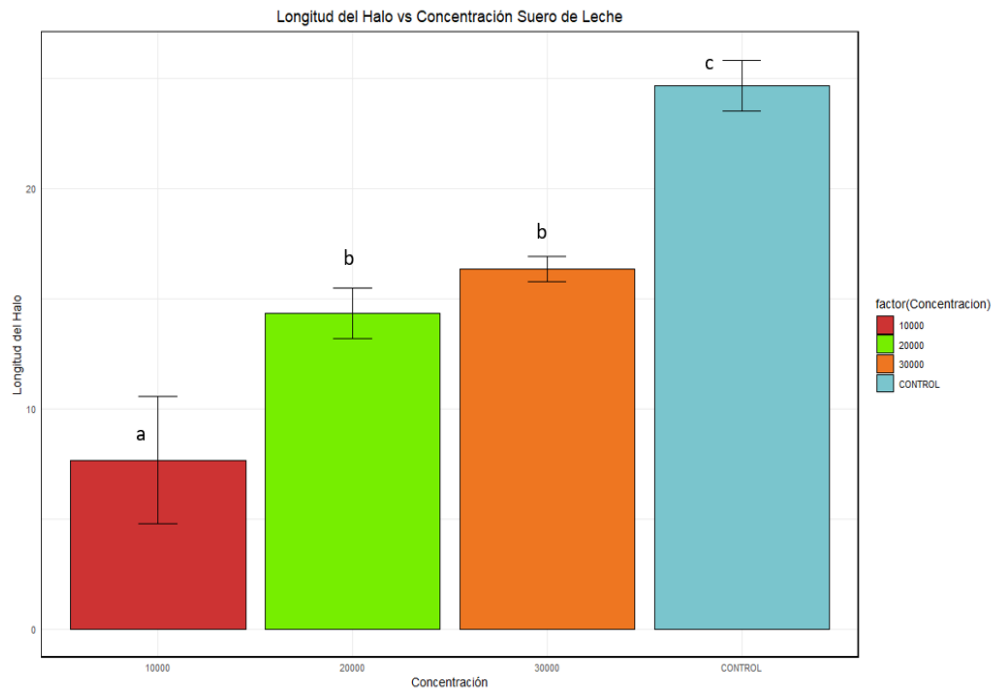
3.1.5 Suero de leche

Para la prueba de sensibilidad con el suero de leche se probaron 3 concentraciones (10000 ppm, 20000 ppm, 30000 ppm) juntamente con el control, los resultados mostraron que la concentración de 10000 ppm fue la menos efectiva contra la bacteria, presentando diferencias

significativas entre las otras concentraciones. Por otro lado, la concentración correspondiente a 20000 ppm presentó diferencias significativas con respecto al control y a la concentración de 10000 ppm, por consiguiente, la concentración de 30000 ppm y de 20000 ppm fueron las que más se destacaron debido a la longitud de sus halos, pese a esto, las mismas no superó a los halos realizados por el control; ya que los mismos presentaron diferencias significativas entre ellos.

Figura 33

Efecto de la concentración de suero de leche en la longitud de halo (promedio $\pm$ desviación estándar).



Nota. Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos.

Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

3.2 Bioensayo

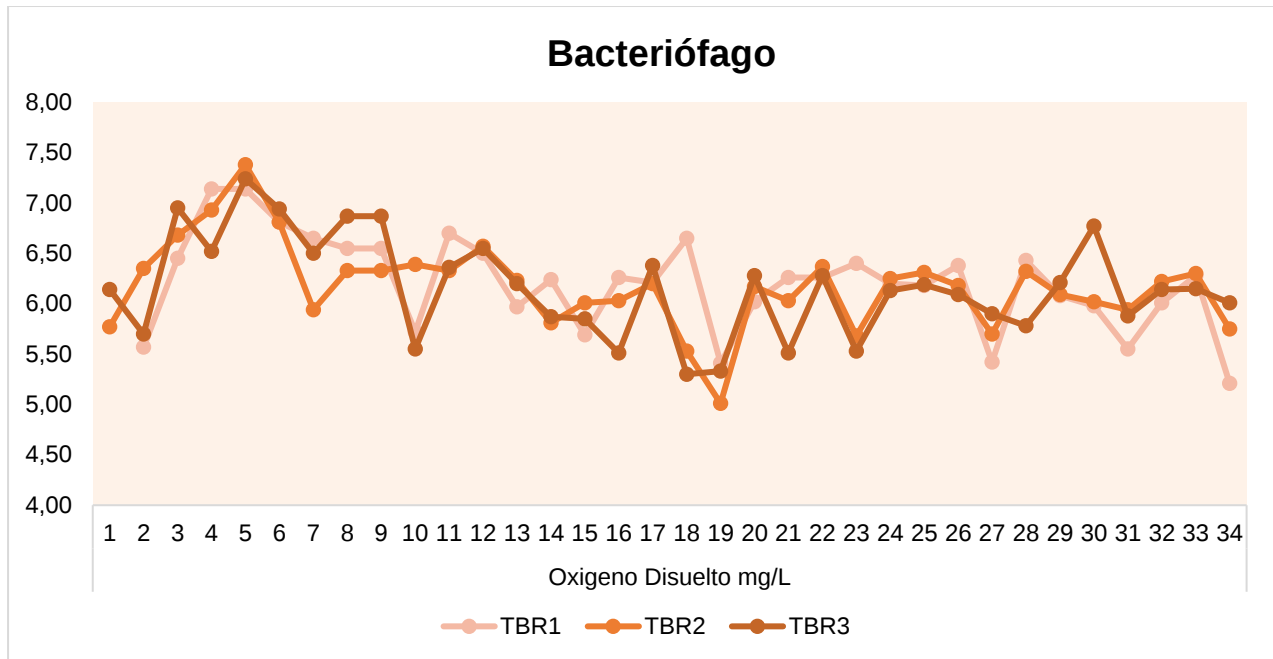
Entre los resultados del bioensayo se presentan la medición de parámetros ambientales y químicos.

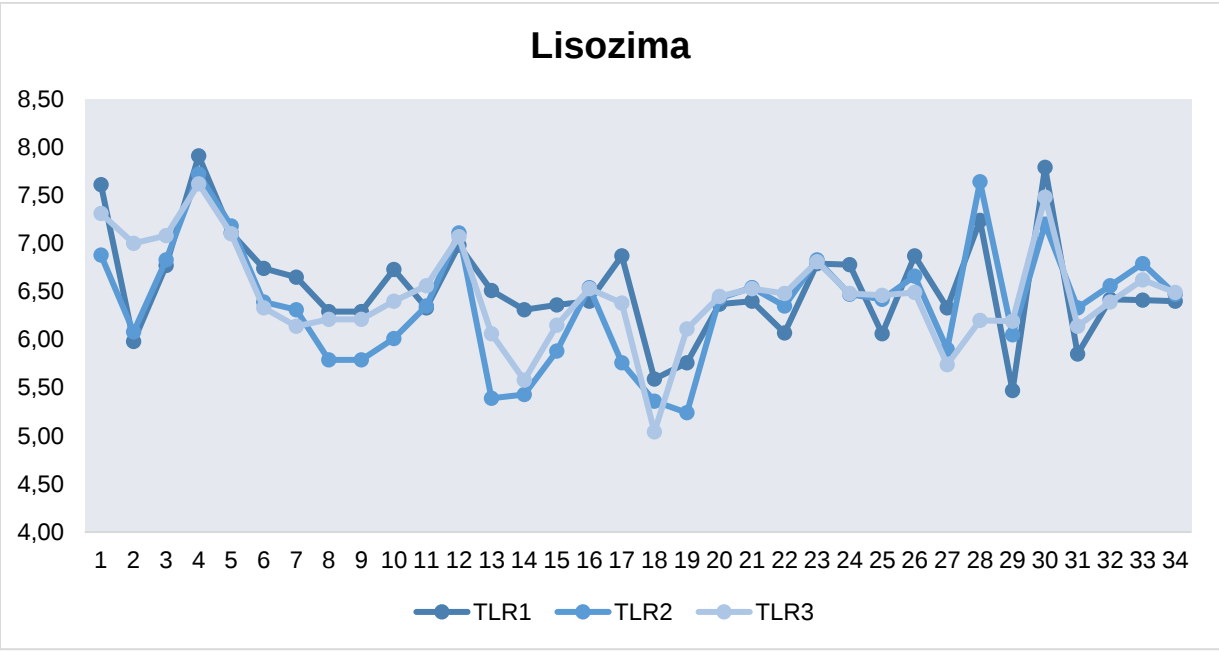
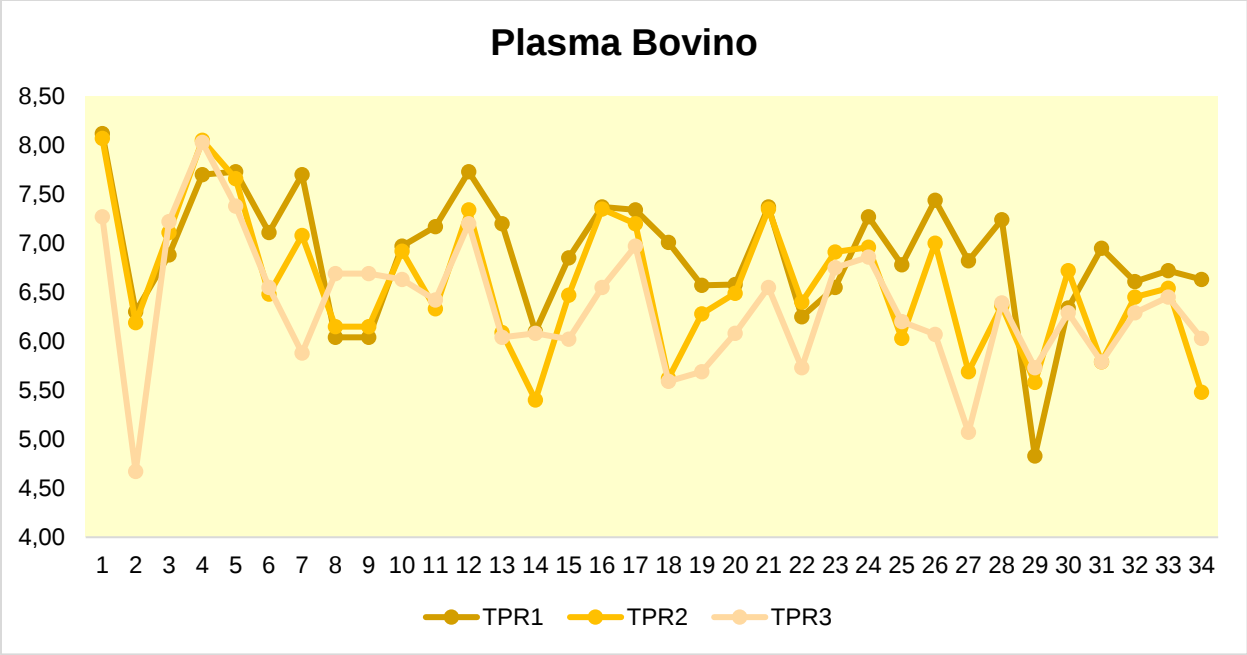
3.2.1 Parámetros fisicoquímicos

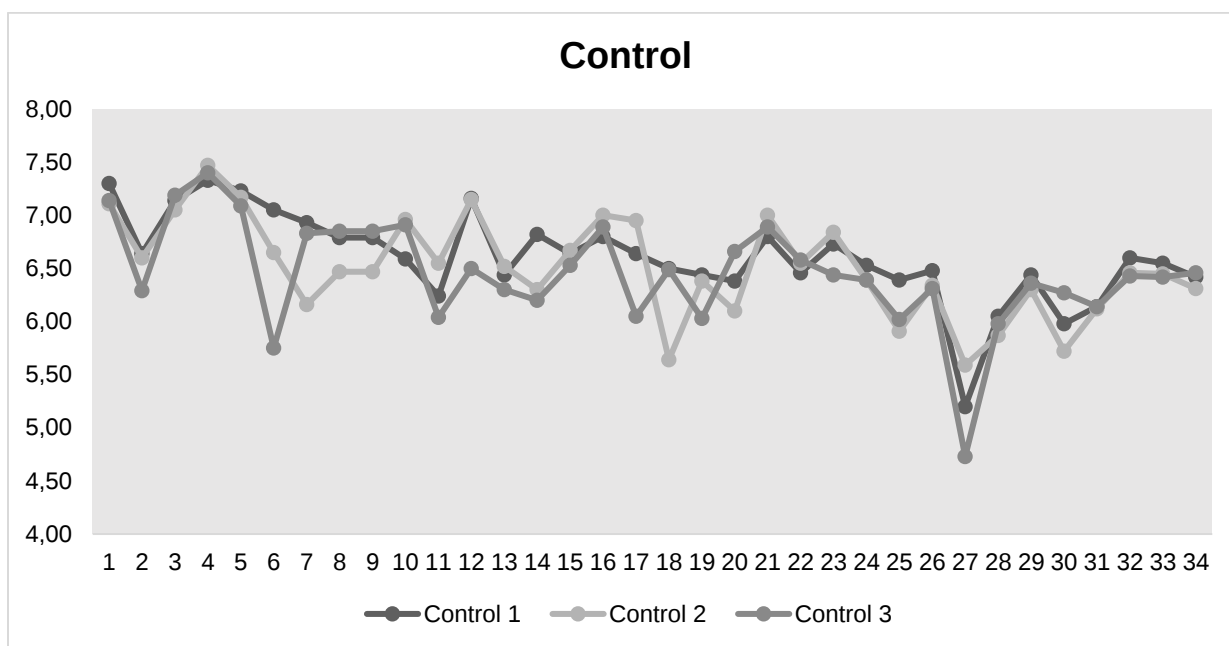
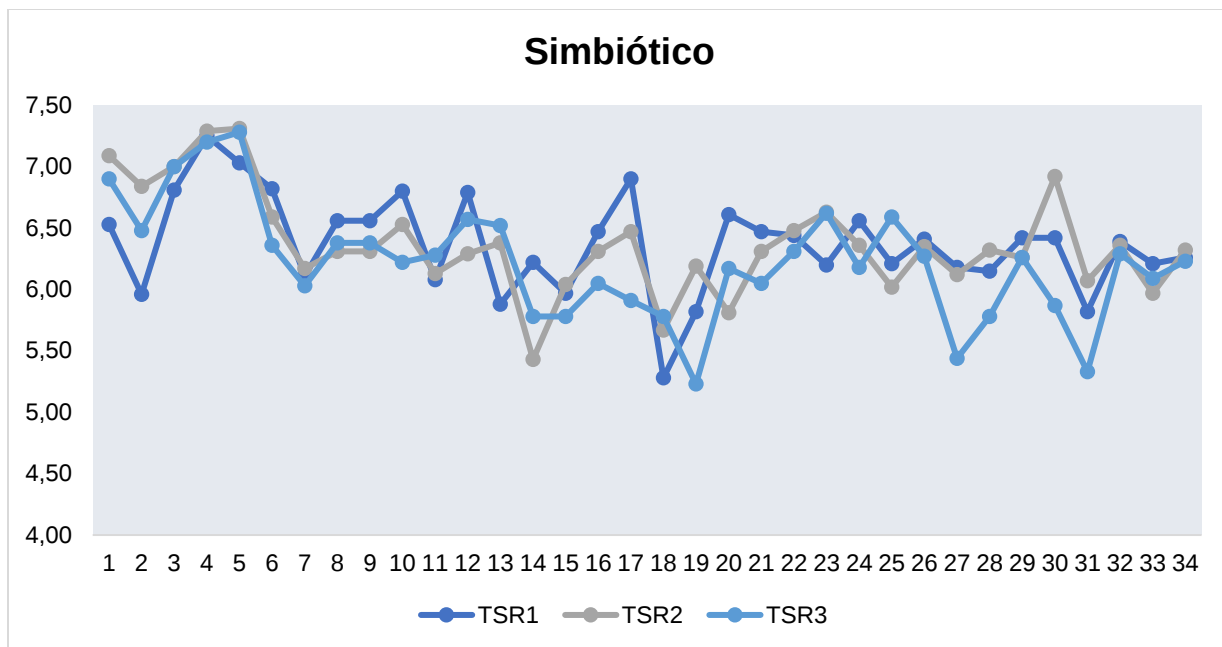
3.2.1.1 Oxígeno disuelto

Figura 34

Cantidad de oxígeno disuelto (mg/L) en cada uno de los tratamientos experimentales.







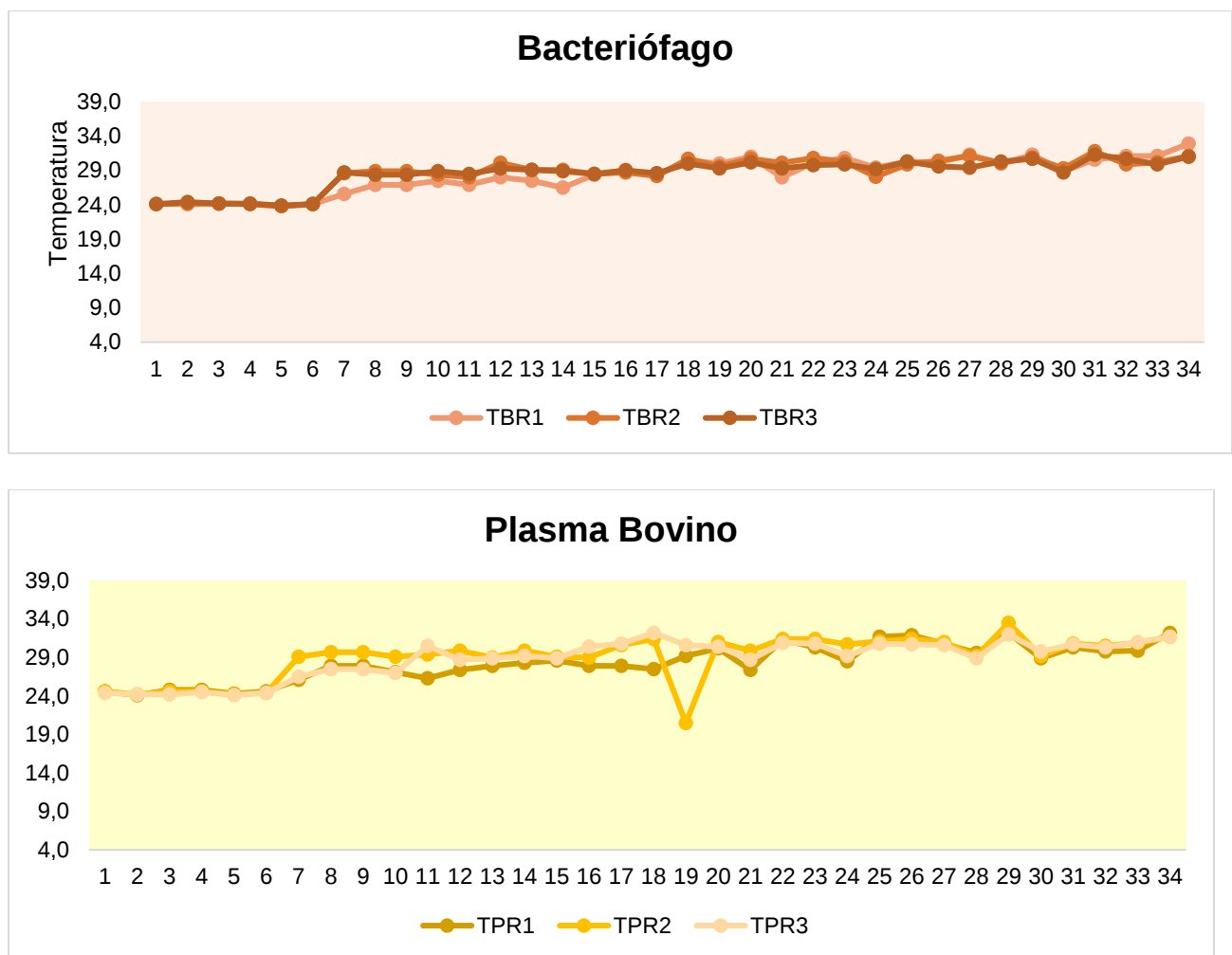
Nota. Los gráficos muestran la cantidad de oxígeno medido en cada uno de los días de experimentación, mediciones menores de 5 mg/L fueron corregidas al momento a fin de no afectar a los tratamientos.

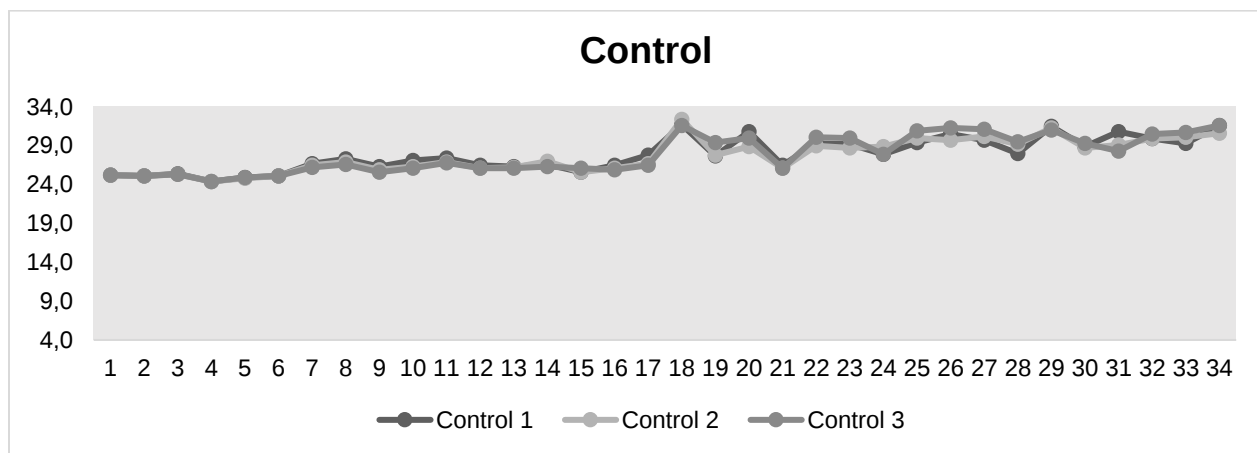
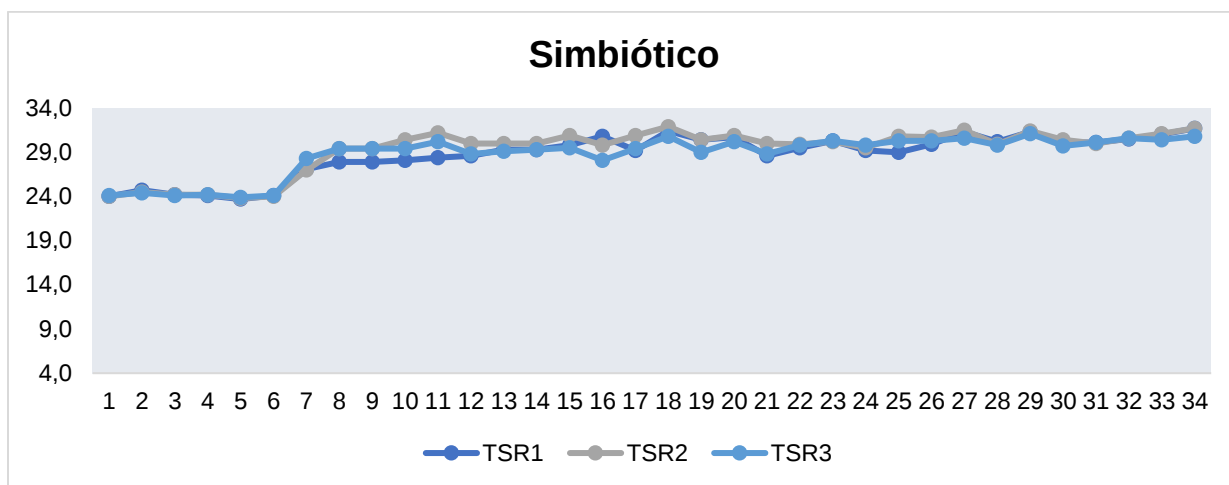
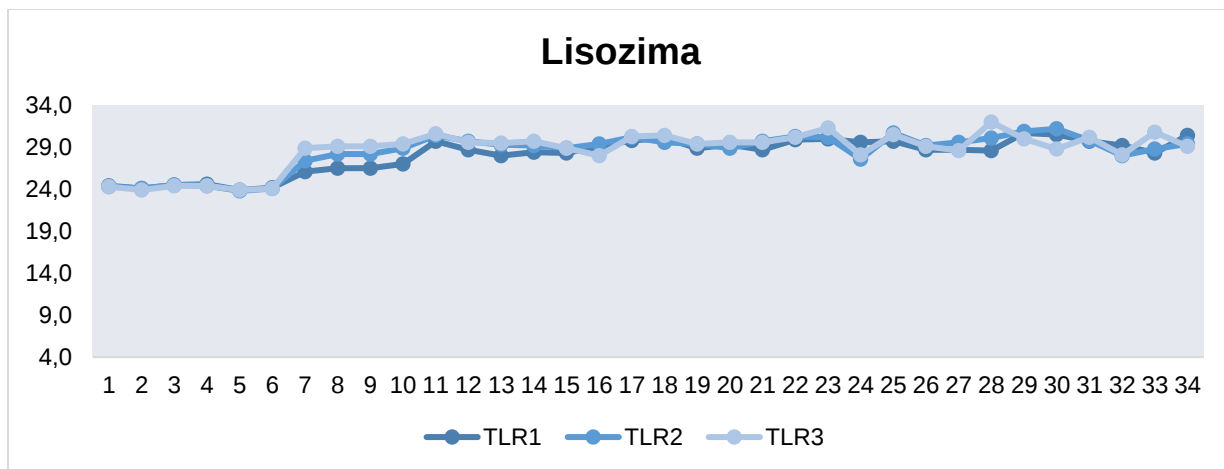
Los gráficos muestran las mediciones de oxígeno disuelto mg/L en los tratamientos experimentales a lo largo de 34 días de experimentación. En este tiempo, las mediciones de oxígeno se mantuvieron estables y óptimas siendo estas mayores a 5 mg/L en todos los tratamientos, esto propició un ambiente adecuado para el crecimiento en cada uno de ellos.

3.2.1.2 Temperatura

Figura 35

Temperatura (°C) en cada uno de los tratamientos experimentales.





Nota. Los gráficos muestran la temperatura en cada uno de los días de experimentación, mediciones menores de 24 mg/L fueron corregidas al momento a fin de no afectar a los

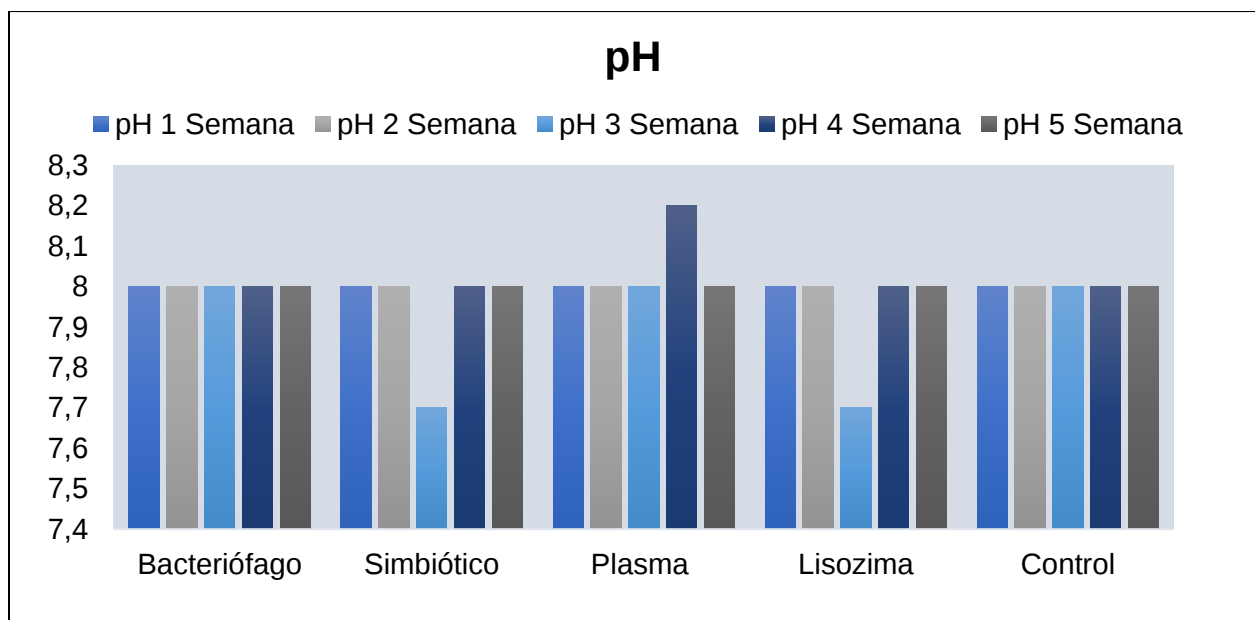
tratamientos, se trató de mantener en todos los acuarios condiciones similares, con respecto a la temperatura.

Los gráficos muestran las temperatura en los tratamientos experimentales a lo largo de 34 días de experimentación. Durante este lapso, los valores de temperatura se mantuvieron adecuados para la experimentación variando de 25°C - 35°C en todos los tratamientos. Al igual que en el caso anterior esto propició un ambiente adecuado para el crecimiento en cada uno de los tratamientos.

3.2.1.3 pH

Figura 36

Medición de pH en cada uno de los tratamientos por semana experimentación.



Nota. El gráfico muestra la cantidad de pH medido en cada una de las semanas de experimentación, mediciones de pH no idóneas para el cultivo fueron corregidos semanalmente, a fin de evitar inconvenientes en el crecimiento de los camarones.

El presente gráfico muestra los niveles de pH para cinco tratamientos diferentes: bacteriófago, simbiótico, plasma, lisozima y control, durante un periodo de cinco semanas. Los tratamientos de bacteriófago y control mantuvieron un nivel de pH constante de 8 durante todo el periodo. Por otro lado, los tratamientos simbiótico y lisozima experimentaron una disminución en los niveles de pH a 7,7 en la tercera semana, pero se recuperaron a 8 en las semanas siguientes.

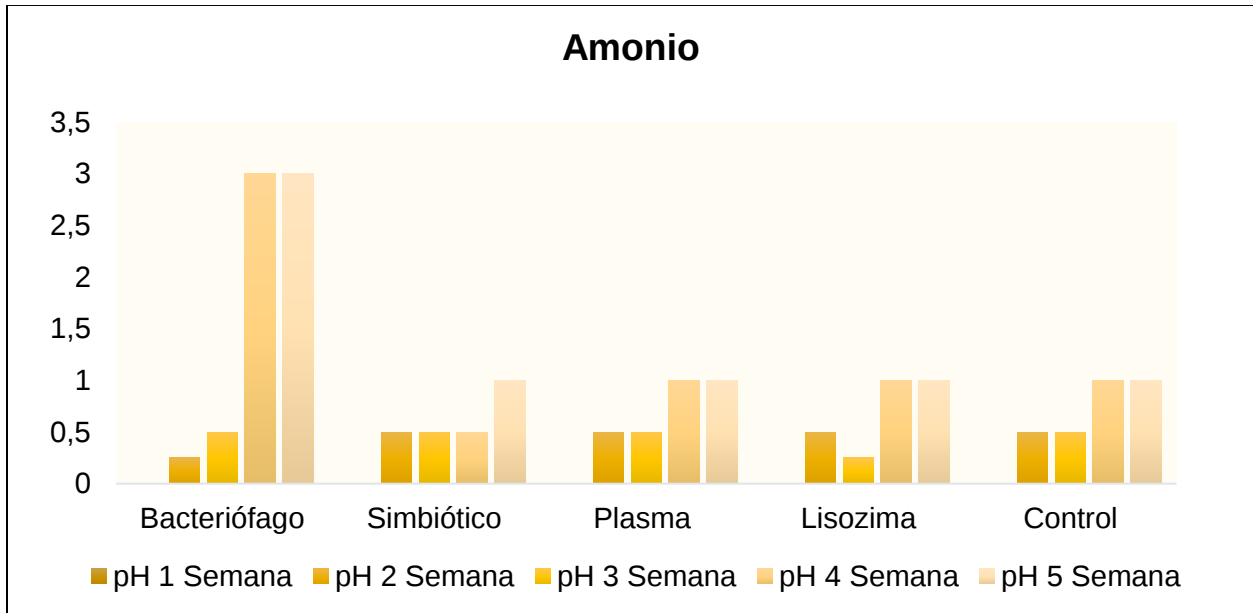
El tratamiento con Plasma mostró un aumento en los niveles de pH a 8,2 en la cuarta semana, pero volvió a 8 en la quinta semana. Aunque hubo pequeñas fluctuaciones en los niveles de pH con los tratamientos simbiótico, lisozima y plasma, todos los tratamientos mantuvieron en general niveles de pH bastante estables a lo largo del tiempo.

La estabilidad que presentó el bioensayo con respecto al pH (7.7- 8.2) a lo largo de las 5 semanas, indicó que los mismos estaban en un ambiente adecuado para el crecimiento dentro de esta experimentación.

3.2.1.4 Amonio.

Figura 37

Medición de Amonio en cada uno de los tratamientos por semana experimentación.



Nota. El gráfico muestra la cantidad de amonio medido en cada una de las semanas de experimentación, mediciones de amonio no idóneas para el cultivo fueron corregidas semanalmente ajustando los recambios, a fin de evitar inconvenientes en el crecimiento de los camarones.

El gráfico indica los niveles de amonio en cinco tratamientos diferentes a lo largo de 5 semanas, estos tratamientos incluyen al bacteriófago, simbiótico, plasma, lisozima y control.

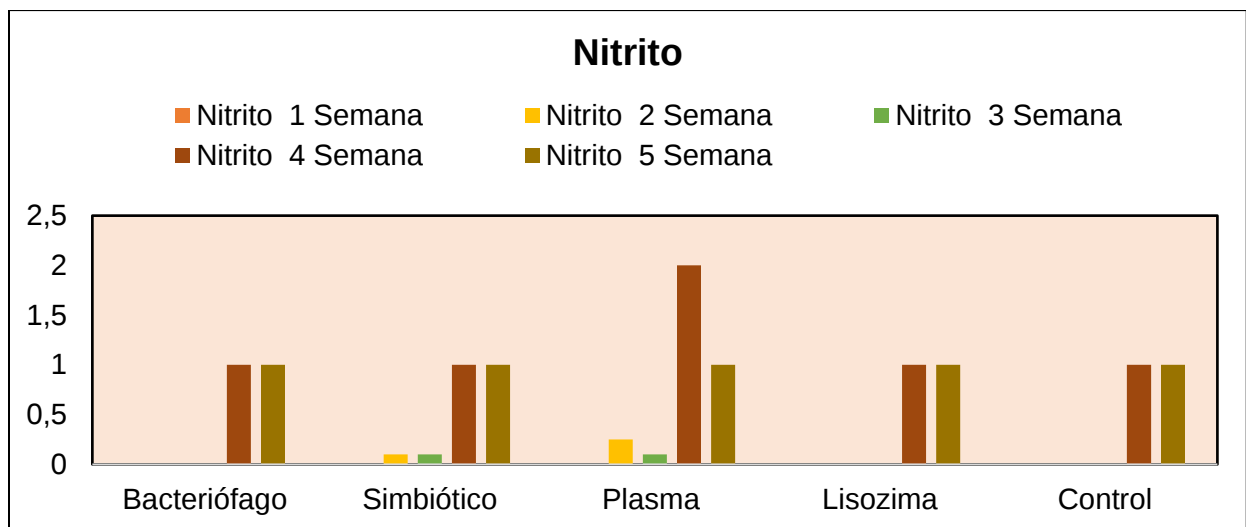
En el tratamiento bacteriófago, los niveles de amonio aumentaron significativamente de 0 a 3 mg/L. En el tratamiento simbiótico, los niveles de amonio aumentaron gradualmente de 0 a 1 mg/L. Los tratamientos plasma, lisozima y control mostraron un aumento similar de 0 a 1 mg/L.

Durante la experimentación los niveles de amonio en los tratamientos simbiótico, plasma, lisozima y control parecen estar dentro de un rango seguro. Los niveles observados en el tratamiento bacteriófago en las semanas 4 y 5 podrían ser perjudiciales para los camarones.

3.2.1.5 Nitrito

Figura 38

Medición de nitrito en cada uno de los tratamientos por semana experimentación.



Nota. El gráfico muestra la cantidad de nitrito medido en cada una de las semanas de experimentación, mediciones de nitrito no idóneas para el cultivo fueron corregidos semanalmente, a fin de evitar inconvenientes en el crecimiento de los camarones.

El gráfico presenta las cantidades de nitrito (mg/L) en los cinco tratamientos a lo largo de las 5 semanas de experimentación; para el caso particular del bacteriófago, los niveles de nitrito se mantuvieron en 0 durante las 3 primeras semanas, estas se vieron en aumento a las semanas 4 y 5 siendo este de 1 mg/L.

Para el simbiótico los niveles de nitrato aumentaron de 0 a 1 mg/L, el plasma, por otra parte, presentó cantidades que iban de 0 a 2 mg/L en la cuarta semana de experimentación y disminuyó a 1 mg/L en la quinta.

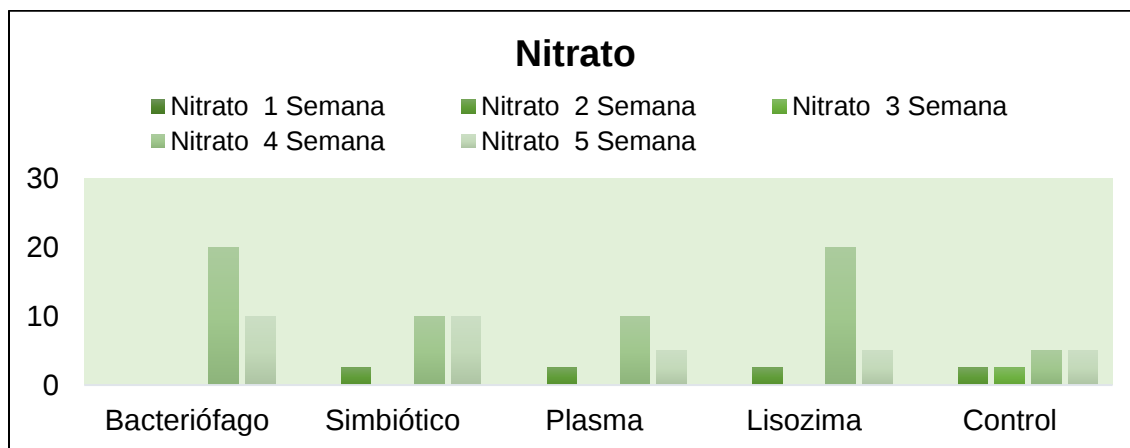
Para el caso de la lisozima y el control los niveles de nitrato se mantuvieron en 0 durante las 3 primeras semanas obteniendo un ligero aumento de 1 mg/L en las cuarta y quinta semana.

Durante todo el experimento los niveles de nitrato en los tratamientos fueron estables a excepción del tratamiento con el plasma durante la cuarta semana, en la cual se presentaron cantidades que pueden ser perjudiciales a los camarones.

3.2.1.6 Nitrato

Figura 39

Medición de nitrato en cada uno de los tratamientos por semana experimentación.



Nota. El gráfico muestra la cantidad de nitrato medido en cada una de las semanas de experimentación, mediciones de nitrato no idóneas para el cultivo fueron corregidos semanalmente, a fin de evitar inconvenientes en el crecimiento de los camarones.

El gráfico presenta las cantidades de nitrato (mg/L) en los cinco tratamientos a lo largo de las 5 semanas de experimentación. En el tratamiento con bacteriófago los niveles de nitrato fueron menores en las primeras 3 semanas siendo este de 0 mg/L, pese a esto en la cuarta y quinta semana se vieron drásticamente modificadas presentando cantidades de 20 mg/L y 10 mg/L, respectivamente.

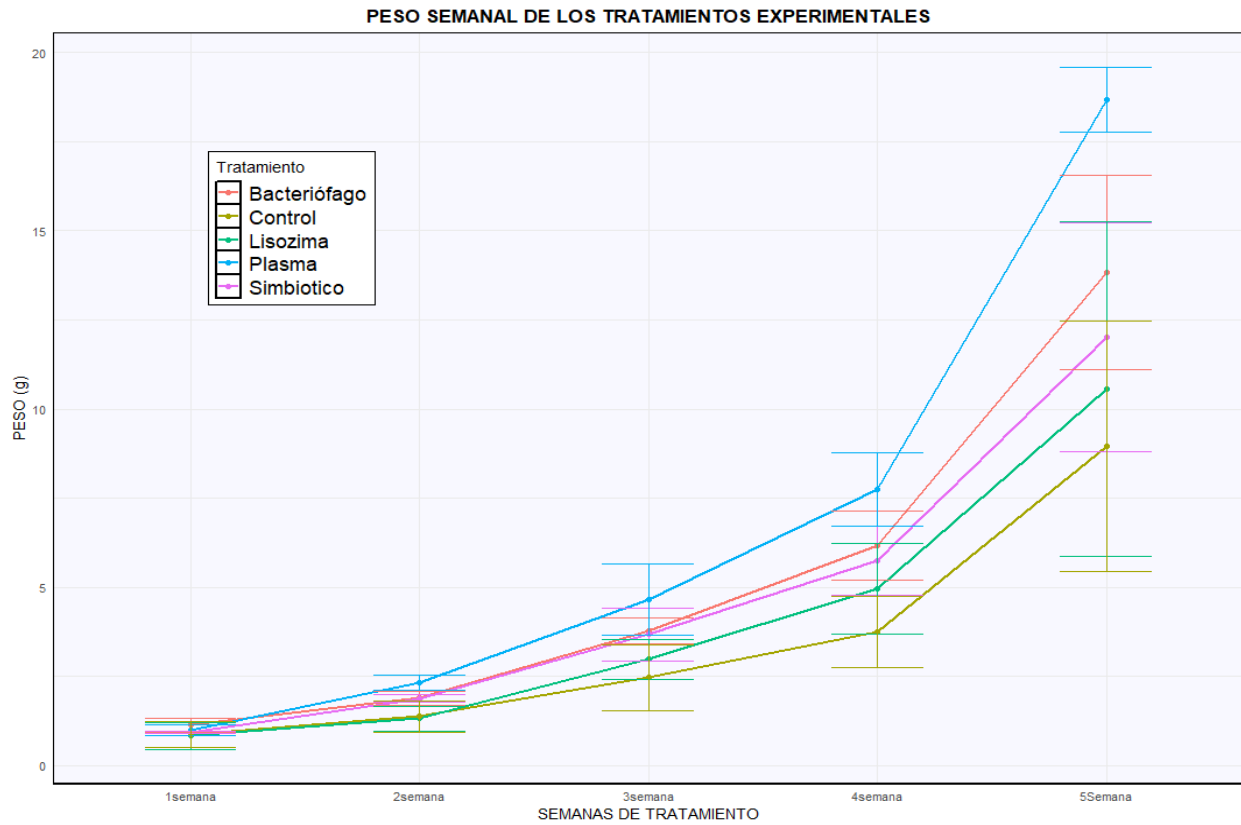
En el tratamiento con el simbiótico los niveles de nitrato aumentaron de 0 a 10 mg/L a lo largo de toda la experimentación. En el tratamiento con el plasma los niveles de nitrato aumentaron de 0 a 10 mg/L a partir de la tercera semana, pero disminuyeron a 5 mg/L en la última semana de la experimentación. Para el control los niveles aumentaron de manera gradual de 0 a 5 mg/L durante las cinco semanas de experimentación. Finalmente, en el tratamiento con la lisozima los niveles se mantuvieron en constancia con 0 mg/L durante tres semanas, pero aumentaron en la cuarta semana y en la quinta disminuyeron en cantidades de 20 mg/L y 5 mg/L, respectivamente.

Según los resultados mostrados se asegura que los camarones tuvieron niveles de nitrato óptimos para su correcto crecimiento, lo que asegura una buena supervivencia y bienestar en los mismos.

3.2.2 Pruebas de crecimiento

Figura 40

Peso semanal de los tratamientos experimentales en los 34 días de experimentación.

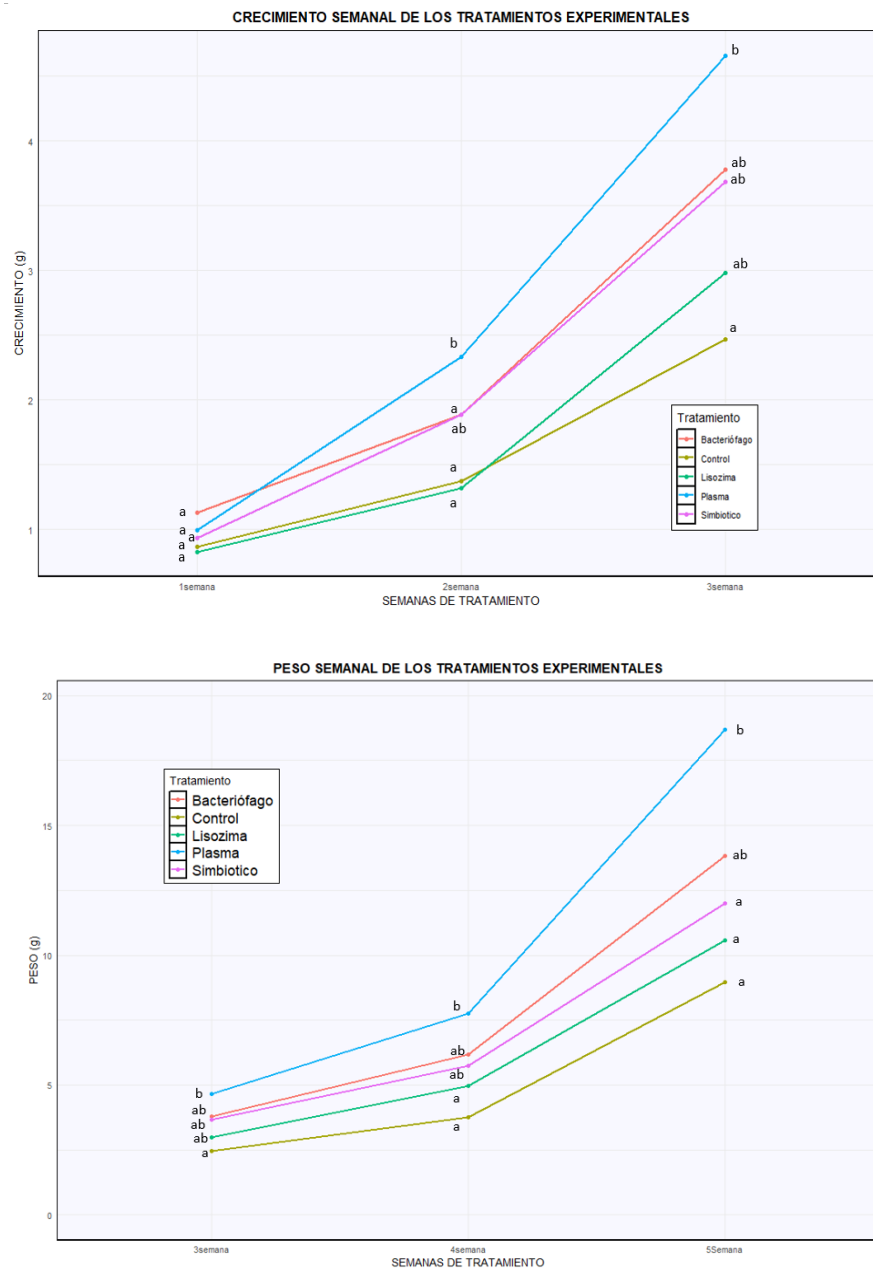


Nota. El gráfico muestra el desempeño de los tratamientos en las semanas de experimentación, el peso semanal mostrado es el peso total de cada pecera de tratamiento.

El gráfico anterior muestra los pesos semanales de cada uno de los tratamientos experimentales en camarones, para una mayor visualización se procedió a segmentar este gráfico, lo que nos permitió agilizar el análisis estadístico y asimismo la apreciación de los resultados en el crecimiento.

Figura 41

Crecimiento semanal de los tratamientos experimentales en los 34 días de experimentación.



Nota. Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos.

Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

Según los datos analizados, durante la primera semana no existió diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos, pese a esto en la segunda semana esto cambió y no hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos con lisozima, bacteriófago y simbiótico, pero sí con el plasma. Por otro lado, se observó que el tratamiento con simbiótico no posee diferencias significativas con respecto al tratamiento con plasma, por lo cual los que han tenido mejor resultado de crecimiento son el plasma bovino y el simbiótico.

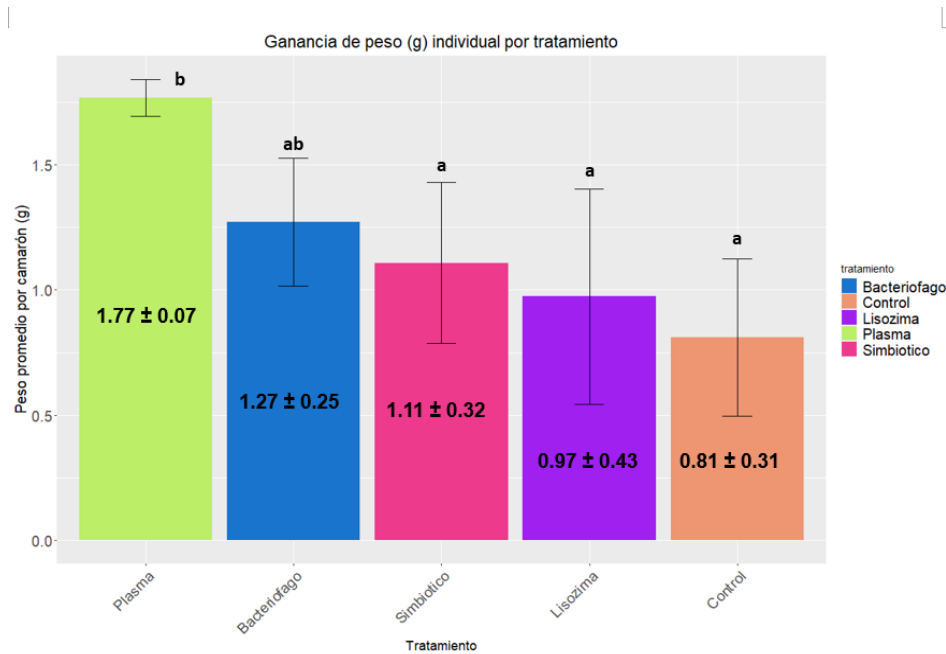
En la tercera semana se observó que el tratamiento control no posee diferencias significativas con respecto a los tratamientos con bacteriófago, lisozima y simbiótico, pero sí con el tratamiento con plasma bovino. Pese a esto, los tratamientos con bacteriófago, lisozima y simbiótico tampoco tienen muchas diferencias significativas con respecto al plasma bovino.

En la cuarta semana se visualizó que el tratamiento de control no presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos con bacteriófago y lisozima, pero sí con el tratamiento con plasma. Sin embargo, los tratamientos con bacteriófago, lisozima y simbiótico no presentaron muchas diferencias significativas con respecto al plasma.

Finalmente, en la quinta semana, el tratamiento de control no registró diferencias significativas con el simbiótico, lisozima y el bacteriófago, pero sí con el plasma bovino, y este comportamiento cambió ligeramente en el bacteriófago puesto a que en esta semana no presentó diferencias significativas con el plasma bovino.

Figura 42.

Crecimiento semanal de los tratamientos experimentales en los 34 días de experimentación.



Nota. Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre grupos.

Letras idénticas señalan ausencia de significación estadística.

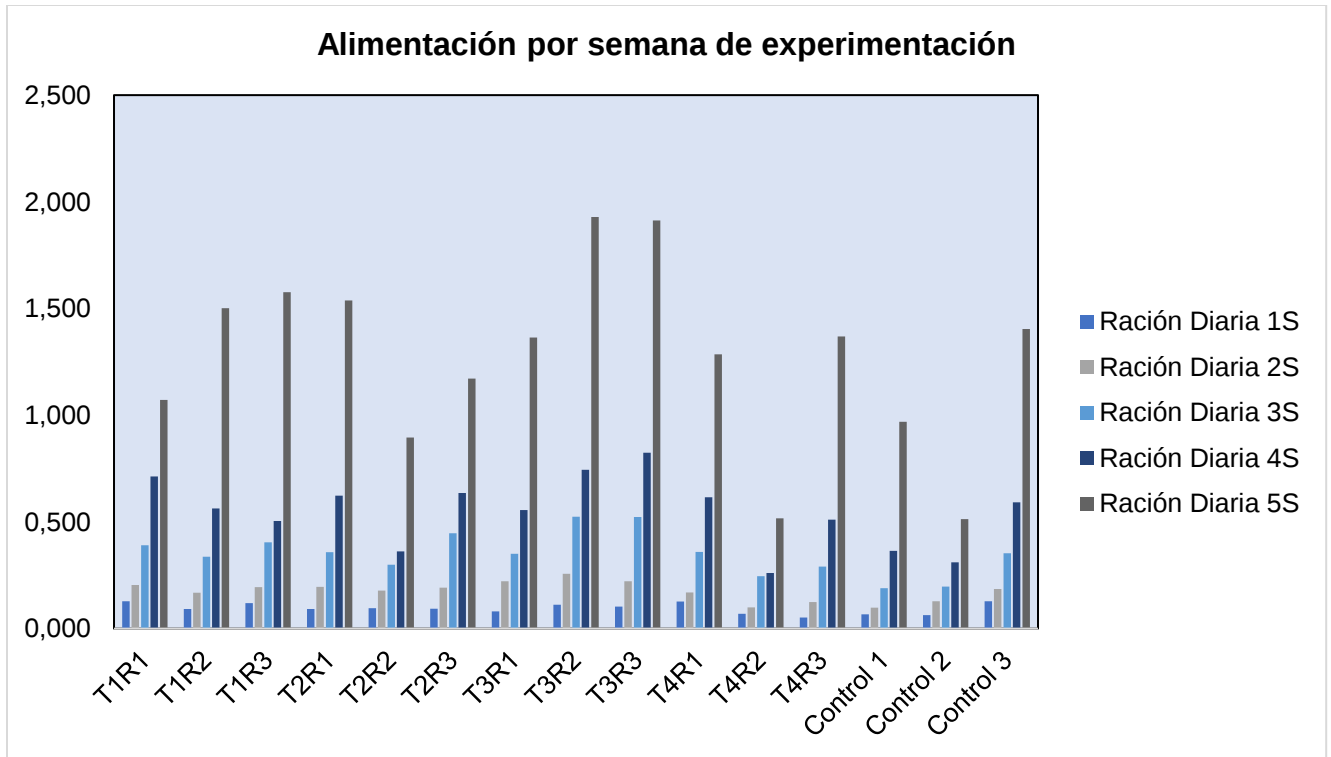
En la figura 42, se observa que la ganancia de peso del tratamiento con proteína de plasma bovino fue superior al control y al simbiótico y la lisozima, pero no al bacteriófago.

Los resultados sugirieron que el tratamiento con plasma bovino ha proporcionado mejores crecimientos con respecto a los otros tratamientos desde la semana 2 hasta la semana 5.

3.2.3 Alimentación

Figura 43

Dosis de alimentación semanal para cada uno de los tratamientos experimentales en 5 semanas.



Nota. La alimentación en cada uno de los tratamientos fue creciente debido al crecimiento de los camarones.

La alimentación en los 5 tratamientos fue suministrada de manera creciente a lo largo de las semanas como se lo puede visualizar en el gráfico arriba presentado, siendo esta proporcional a su crecimiento, dando la misma porción en dos horarios que representaba la mitad de su ración diaria (10% Biomasa).

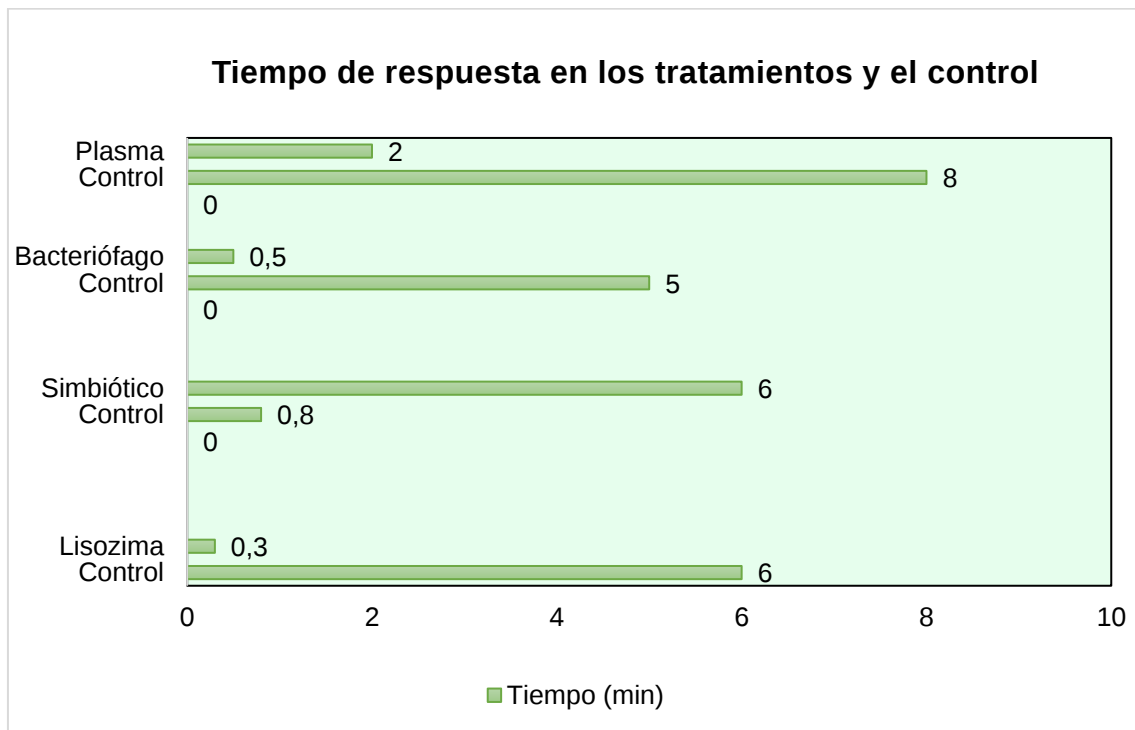
3.2.4 Pruebas físicas del alimento

Las pruebas físicas del alimento son esenciales para evaluar su calidad y eficacia. En este estudio, se realizaron pruebas para evaluar la hidroestabilidad y la atractabilidad del alimento en varios tratamientos, incluyendo Lisozima, Bacteriófago, Simbiótico y Plasma.

3.2.4.1 Atractabilidad

Figura 44

Tiempo de respuesta en camarones entre los tratamientos experimentales y el control.



Nota. El gráfico muestra el tiempo de respuesta en minutos de los camarones al elegir un tratamiento entre los dos probados, es preciso aclarar que todos los tratamientos fueron iniciados en un mismo tiempo.

Los resultados del experimento muestran que los tratamientos con Plasma, Bacteriófago, Simbiótico y Lisozima mejoran la atractividad del alimento para los camarones en

comparación con sus respectivos controles. Específicamente, el tiempo de respuesta para el tratamiento con Plasma es de 2 minutos, significativamente menor que los 8 minutos observados para su control. De manera similar, el tratamiento con Bacteriófago tiene un tiempo de respuesta de 0,5 minutos, en comparación con los 5 minutos de su control. El tratamiento con Simbiótico muestra un tiempo de respuesta de 6 minutos, frente a los 0.8 minutos de su control. Finalmente, el tratamiento con Lisozima tiene un tiempo de respuesta de 0,3 minutos, notablemente menor que los 6 minutos de su control.

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

Este proyecto integrador ha logrado determinar las dosis óptimas de 3 productos experimentales para inhibir el crecimiento de una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en camarones *P. vannamei*.

Los resultados obtenidos en los análisis in vitro revelaron concentraciones óptimas específicas para cada uno de los 3 productos experimentales, proporcionando información valiosa para el desarrollo y futuro de medidas preventivas o de control contra la enfermedad AHPND. Así, se determinó la dosis óptima a usar con lisozima a 1000 - 2000 ppm, con la proteína de plasma bovino a 3000 ppm, el simbiótico a 800000 ppm y, además, un cuarto y quinto producto añadidos que fueron la proteína del suero de leche a 30000 ppm y las enzimas al 100% de concentración. La eficacia de los productos se validó posteriormente en un bioensayo con camarones donde se observó un comportamiento diferencial en las semanas de evaluación.

Así mismo, la adaptación de un protocolo de molienda, mezclado y reconstitución de pellets comerciales para camarones, incorporando estos productos experimentales, ha demostrado ser una estrategia viable. Las pruebas físicas de calidad de pellet y la evaluación de la tasa de crecimiento en camarones juveniles *P. vannamei* sometidos a estos tratamientos experimentales han proporcionado evidencia de su eficacia.

Es de suma importancia destacar que, a pesar de las variaciones en los tratamientos, las variables físicas y químicas se mantuvieron dentro de los rangos óptimos para el desarrollo del bioensayo con camarones. Los resultados del bioensayo sugirieron que el tratamiento con proteína de plasma bovino ha proporcionado mejores crecimientos con respecto a los otros tratamientos desde la semana 2 hasta la semana 5. Estos resultados sugieren una alternativa

prometedora al uso de antibióticos, abriendo nuevas posibilidades para la industria cultural y contribuyendo a la búsqueda de soluciones sostenibles.

Para finalizar, esta investigación no solo avanza en la comprensión de estrategias de control para AHPND, sino también sienta las bases para futuras investigaciones, incluyendo la optimización de procesos de producción y la exploración de aplicaciones prácticas la industria acuícola. En última instancia, estos hallazgos tienen el potencial de impactar positivamente en la salud y la sostenibilidad de la producción de camarones.

4.2. Recomendaciones

- Se sugiere realizar más lecturas durante los MIC para determinar el comportamiento del producto y la bacteria en un periodo de tiempo más amplio.
- Se sugiere realizar más replicas para las pruebas de antagonismo
- Mantener los niveles de temperatura, oxígeno y salinidad estables, ya que en pruebas de crecimiento estas variables afectan el metabolismo del crustáceo pudiendo ocasionar mediciones de peso alteradas.
- Las peceras deben estar cubiertas con tapas de cualquier material que impida que los camarones salten fuera de esta. Se recomienda utilizar tapas de acetato o enmalladas.
- En pruebas de crecimiento en peceras, se recomienda usar poca densidad de animales por m³, ya que se da más espacio al camarón para crecer.
- En la elaboración del balanceado, tener en cuenta las temperaturas de secado ya que temperaturas muy altas pueden inactivar el agente biológico de los tratamientos.
- Tener en cuenta el tamaño del animal para que el balanceado sea apto para su consumo.

5. Referencias

- Aranguren Caro, L. F., Mai, H. N., Noble, B., & Dhar, A. K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 174.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>
- Ávila, M., Conforme, D., & Chancay, G. (2021). Comportamiento del sector camaronero como determinante en la generación de empleo en el cantón Jama. *Polo Del Conocimiento*, 6, 1897–1914. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3146>
- Chuchird, N., Rairat, T., Keetanon, A., Phansawat, P., Chou, C. C., & Campbell, J. (2021). Effects of spray-dried animal plasma on growth performance, survival, feed utilization, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *PLoS ONE*, 16 (9 September).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257792>
- Cuéllar-Anjel, J., Lightner, D.V. y Pantoja, C. (2012). Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS) o Síndrome de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPNS). *Panorama Acuicola Magazine*, 18-1 (nov.-dic.): 42-43.
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS). *The Center for Food Security and Public Health*. Iowa. Estados Unidos.
- Cuéllar-Anjel, J. and Brock, J.A. (2018). Clinical case report: EMS/AHPND outbreak in Latin America. *Global Aquaculture Advocate*. Vol. 141 - July 16, 2018.
- El Comercio. (2023, June). El camarón supera al petróleo en las exportaciones de productos primarios. *El Comercio*.

- El Universo. (2023, September). Camarón destronó por primera vez al petróleo en este 2023 como primer producto de exportación con \$ 314 millones. *El Universo*.
<https://www.eluniverso.com/noticias/economia/por-314-millones-el-camaron-destrono-por-primera-vez-al-petroleo-como-primer-producto-de-exportacion-nota/>
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. In *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- González-Gómez, J.P., Soto-Rodríguez, S.A., Gomez-Gil, B., Serrano-Hernández, J.M., Lozano-Olvera, R., López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., & Chaidez, C. (2023). Effect of phage therapy on survival, histopathology, and water microbiota of *Penaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 576. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739851>
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, 16(5), 493–500.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.07.005>
- Hikima, S., Hikima, J. ichi, Rojtinakorn, J., Hirono, I., & Aoki, T. (2003). Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 316(1–2), 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00761-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00761-3)
- Huynh, T.-G., Cheng, A.-C., Chi, C.-C., Chiu, K.-H., & Liu, C.-H. (2018). A synbiotic improves the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Metabolomic analysis reveal compelling evidence. *Fish & Shellfish Immunology*, 79, 284–293.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.031>

- Javahery, S., Noori, A., & Hoseinifar, S. H. (2019). Growth performance, immune response, and digestive enzyme activity in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931, fed dietary microbial lysozyme. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 528–535. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2019.06.049>
- Jory, D. (2018a, July 16). *La producción actual, desafíos y el futuro del cultivo del camarón*. Responsible Food Advocate. <https://www.globalseafood.org/advocate/la-produccion-actual-desafios-y-el-futuro-del-cultivo-del-camaron/>
- Jory, D. (2018b, July 16). *La producción actual, desafíos y el futuro del cultivo del camarón - Responsible Seafood Advocate*. <https://www.globalseafood.org/advocate/la-produccion-actual-desafios-y-el-futuro-del-cultivo-del-camaron/>
- Jory, D. E. (2018). *La producción actual, desafíos y el futuro del cultivo del camarón*. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/estimating-global-shrimp-pond-area/>
- Kolida, S., & Gibson, G. R. (2011). Synbiotics in Health and Disease. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 373–393. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133739>
- Lightner, D. V, Redman, R. M., Pantoja, C., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Glob. Aquacult.*, 15.
- Luna-González, A., Moreno-Herrera, J. T., Campa-Córdova, Á. I., González-Ocampo, H. A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., & Bueno-Ibarra, M. A. (2013). Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5), 898–907. <https://doi.org/103856/vol41-issue5-fulltext-10>

- Martín Ríos, L. D., Corrales Barrios, Y., González Salotén, M., Carrillo Farnés, O., Cabrera Alarcón, H., & Arenal Cruz, A. (1985). Revista de producción animal. In *Revista de Producción Animal* (Vol. 34, Issue 1). Universidad de Camagüey, Ministerio de Educación Superior. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202022000100103&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Mayer, E. (2016). *Enzimas - Mejora en la calidad del agua y el suelo en acuicultura*. <https://aquafeed.co/entrada/enzimas---mejora-en-la-calidad-del-agua-y-el-suelo-en-acuicultura-20498/>
- Mazzola, G., Aloisio, I., Biavati, B., & Di Gioia, D. (2015). Development of a synbiotic product for newborns and infants. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.033>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Børgwald, J., Castex, M., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2023). *Ecuador refuerza medidas para evitar enfermedad que afecta al camarón*. Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Mondal, K., Haque, S., Das, S., Mondal Associate Professor, K., & Kausik Mondal Associate Professor, C. (2017). A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2), 422–429. <https://www.researchgate.net/publication/335222699>

- Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). (2014). Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones, 2da Edición. *Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano (OSPESCA) y Sistema de la Integración Centroamericana (SICA)*. Panamá, Rep. de Panamá. ISBN 978-9962-8500-7-6. Versión Digital ISBN 978-9962-8500-8-3. pp. 382.
- Moreno, F., Salas, G., & Rico Gutiérrez, R. (2013). *Revista AquaTIC, nº 38-2013 68 Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura Sistema inmune de los camarones*. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=266>
- Nindalگو, & Grupograndes. (2023). *Ficha técnica de MicroSoil (proteína de suero de leche)*.
- Nurhayati, D., W., & Yuhana, M. (2014). Dietary Synbiotic Influence on the Growth Performances and Immune Responses to Co-Infection with Infectious Myonecrosis Virus and *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(1), 13–23. <https://doi.org/10.3923/jfas.2015.13.23>
- Piedrahita, Y. (2018). La industria de cultivo de camarón en Ecuador. *Responsible Seafood Advocate*. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/la-industria-de-cultivo-de-camaron-en-ecuador-parte-2/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZBAMARKETPLACE>
- Rendón, L., & Balcázar, J. (2003). *Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances* (Vol. 19). <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=158>
- Santos, G. A. (2020). *El papel de la biorremediación en el manejo de la calidad del agua*. <https://aquafeed.co/entrada/el-papel-de-la-biorremediacion-en-el-manejo-de-la-calidad-del-agua-20399/>

- Sekhon, B. S., & Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 1(2).
- Subhashini, C. R., & Kumar, J. (2020). *Assessing the impact of bacteriophages in the control of Vibrios in Litopenaeus vannamei*. 3(7), 11–17.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. (2013a). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. (2013b). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Varela Mejias, A., & Peña Navarro, N. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico, Universidad Estatal a Distancia*, 17, 25–30.
https://www.researchgate.net/publication/282942291_Sindrome_de_la_Mortalidad_Temprana_EMSAHPNS_en_camarones_cultivados_Una_revision#fullTextFileContent
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tapaamorndech, S., Sritunyalucksana, K., Phromson, M., Jangsutthivorawat, W., Jeamsripong, S., & Visessanguan, W. (2020). Suppression of white feces syndrome in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using hen egg white lysozyme. *Aquaculture*, 521, 735025.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735025>

Zubaidah, A., Yuhana, M., & Widanarni. (2015). Encapsulated Synbiotic Dietary Supplementation at Different Dosages to Prevent Vibriosis in White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(4), 163–168.
<https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.007>