

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de
Litopenaeus vannamei cultivados en sistema intensivo en Tumbes – Perú
y su potencial uso como probióticos**

Tesis para optar el Título de

BIÓLOGO ACUICULTOR

Autor: Bach. Gladis Yulisa Melgarejo Velásquez

Asesores: Dr. Walter Eduardo Reyes Avalos

Mblgo. Rubén Alfaro Aguilera

**Nuevo Chimbote – Perú
2016**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de
Litopenaeus vannamei cultivados en sistema intensivo en Tumbes – Perú
y su potencial uso como probióticos**

Tesis para optar el Título de

BIÓLOGO ACUICULTOR

Sustentado por: Bach. Gladis Yulisa Melgarejo Velásquez

Revisado y aprobado por el asesor:

Dr. Walter Eduardo Reyes Avalos

**Nuevo Chimbote – Perú
2016**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de
Litopenaeus vannamei cultivados en sistema intensivo en Tumbes – Perú
y su potencial uso como probióticos**

Tesis para optar el Título de

BIÓLOGO ACUICULTOR

Sustentado por: Bach. Gladis Yulisa Melgarejo Velásquez

Aprobado por el jurado evaluador:

Dr. Carlos Azañero Díaz
Presidente

Blgo. Mclgo. José Villanueva Carlos
Integrante

Dr. Walter Reyes Avalos
Integrante

**Nuevo Chimbote – Perú
2016**

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a enfrentar las adversidades sin perder nunca la fé.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy. A mis padres Eugenio e Isabel, quienes me dieron la vida, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo todo el tiempo, por quererme mucho y creer en mí. A mis hermanos, Edith, Fredy, Yuri, Elizabeth, Mechy, Renán, y Carlos, por estar conmigo, apoyarme y alentarme siempre, acompañándome para poderme realizar, los quiero mucho.

A Henry por haberme apoyado en momentos difíciles por los que atravesé, gracias.

A mi hija Zaira quien es mi mayor motivación, inspiración y felicidad.

AGRADECIMIENTO

Te doy gracias a ti mi Dios desde lo más profundo de mi ser, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado, dándome la fortaleza para seguir adelante en esos momentos de debilidad.

A la Universidad Nacional del Santa por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A mi Asesor de tesis Dr. Walter Reyes Ávalos, por su dedicación y apoyo, por sus sugerencias, ideas y orientación que ha brindado a la realización de este informe; por su visión crítica de muchos aspectos de la vida, por su rectitud como docente, por sus consejos, amistad y por los conocimientos que me transmitió que me ayudaron a formarme como profesional.

A mi Co-asesor de tesis Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional en Bides Laboratorios Soluciones Integrales S.R.L, por el apoyo y facilidades que me fue otorgado, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación han logrado que pueda terminar mi tesis con éxito.

Al Ing. Pesq. José Serna Cruz por apoyarme en la aplicación de los diferentes procedimientos necesarios para el desarrollo de mi tesis.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida, gracias por formar parte de ella, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
1. MATERIAL	6
1.1. Población	6
1.2. Muestra	6
1.2. Unidad de Análisis.....	6
2. Métodos	6
2.1. Tipo de Investigación.....	6
2.2. Diseño de la Investigación	6
2.3. Procedimiento	7
Descarte de patógenos.....	7
Aislamiento y selección primaria de bacterias ácido lácticas.....	7
Identificación básica de bacterias ácido lácticas.....	7
Pruebas para determinar el uso de probióticos:	7
Aislamiento de bacterias patógenas.....	8
Identificación molecular.....	8
III. RESULTADOS.....	10
3.1. Análisis de ensayo por PCR y microbiológicos de langostinos.....	10
3.2. Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	12
3.3. Identificación básica de bacterias ácido lácticas.....	12
3.4. Inhibición bacteriana de ácido lácticas.....	13
3.5. Aislamiento de bacterias patógenas e identificación molecular.....	14
IV. DISCUSIÓN.....	16
V. CONCLUSIONES.....	20
VI. RECOMENDACIONES.....	20
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
ANEXOS.....	28

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizó bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de *Litopenaeus vannamei* y se determinó su potencial uso como probiótico. Los juveniles de *L. vannamei* se seleccionaron aquellos sin signos y síntomas de enfermedad, y procedieron de un estanque de cultivo intensivo del campo langostinero Lan Karina de la empresa Corporación Refrigerados INYSA, de la provincia de Zarumilla, departamento de Tumbes. Los langostinos fueron analizados por PCR, descartándose la presencia de patógenos como WSV, IHHNV, BP y NHPB. Además, los recuentos bacterianos de vibrios se encontraban dentro de los niveles normales. Por otro lado, de todas las bacterias aisladas y seleccionadas a partir del intestino de los langostinos, la cepa BG10 reunía todas las características fenotípicas propias de una bacteria ácido láctica, entre ellas bacilos Gram positivos, catalasa negativa, oxidasa negativa, oxidación/fermentación de la glucosa, no esporulada y sin producción de gas. Para la selección de bacterias con propiedades antibacterianas, se utilizó el método de inhibición *in vitro* enfrentándose directamente discos de agar MRS impregnado con la bacteria ácido láctica BG10, con *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae*. La cepa BG10 presentó característica inhibitoria, produciendo halos de $12,0 \pm 0,2$ mm y $16,0 \pm 0,1$ mm con las bacterias *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae* respectivamente. Para la prueba final se utilizó el método de difusión en pocillo, y se demostró que la actividad antibacteriana de la BAL BG10 se debió principalmente a la presencia de ácidos orgánicos.

Palabras clave: bacteria ácido láctica, *Litopenaeus vannamei*, probióticos, *Vibrio harveyi*, *Shewanella algae*.

ABSTRACT

In the present work lactic acid bacteria isolated from the intestine of *Litopenaeus vannamei* were characterized and their potential use as probiotic was determined. The juveniles of *L. vannamei* were selected without signs and symptoms of disease, and came from an intensive culture pond of the Lan Karina shrimp field of the company Corporación Refrigerados INYSA, in the province of Zarumilla, department of Tumbes. The prawns were analyzed by PCR, discarding the presence of pathogens such as WSV, IHHNV, BP and NHPB. In addition, bacterial counts of vibrios were within normal levels. On the other hand, of all bacteria isolated and selected from the shrimp intestine, the BG10 strain had all the phenotypic characteristics of a lactic acid bacterium, including Gram positive bacilli, catalase negative, oxidase negative, oxidation / fermentation of Glucose, non-sporulated and without gas production. For the selection of bacteria with antibacterial properties, the in vitro inhibition method was used directly against MRS agar discs impregnated with the lactic acid bacterium BG10, with *Vibrio harveyi* and *Shewanella algae*. The strain BG10 presented inhibitory characteristic, producing halos of $12,0 \pm 0,2$ mm and $16,0 \pm 0,1$ mm with the bacteria *Vibrio harveyi* and *Shewanella algae* respectively. For the final test the well diffusion method was used, and it was demonstrated that the antibacterial activity of the BG10 BAL was mainly due to the presence of organic acids.

Key words: lactic acid bacteria, *Litopenaeus vannamei*, probiotics, *Vibrio harveyi*, *Shewanella algae*.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad humana, cuyo objetivo principal es la producción de especies acuáticas bajo condiciones controladas o semi-controladas (Barnabé, 1996). La industria de la acuicultura continúa creciendo de acuerdo a la demanda de recursos acuáticos debido al incremento de la población mundial, a diferencia de los productos de la pesca de captura que se mantienen relativamente estables en las últimas cinco décadas (FAO, 2014). Además, es una actividad que satisface la creciente demanda de alimentos acuáticos, y es el sector productivo de más rápido crecimiento dentro de la producción pesquera mundial, pasando del 20,9 % en 1995 al 32,4 % en 2005 y al 42 % en el 2011 (FAO, 2012) y se prevé que incremente en un 62 % para el 2030 (FAO, 2014).

En América Latina, la acuicultura presenta crecimiento firme y continuado de la producción acuícola mundial, donde los peces de escama representan el 66,3 %, los moluscos el 22,8 y los crustáceos el 9,7%. Dentro de los crustáceos, el langostino blanco *Litopenaeus vannamei* es la especie introducida con mayor éxito a nivel internacional para cultivo (FAO, 2014).

La industria del cultivo de *L. vannamei* es una actividad económica relevante a nivel mundial y nacional (Valenzuela *et al.*, 2010), de mayor valor económico en la producción acuícola, pues en el 2012 representó el 15 % del valor total de los productos comercializados a nivel internacional (FAO, 2014). En el Perú, el cultivo del langostino se inició en la década del 70 en el departamento de Tumbes, adquiriendo importancia en la economía y es la principal actividad de la acuicultura peruana (Quispe & Berger, 2005).

No obstante, la producción acuícola es vulnerable a diversos factores, tanto socioeconómicos, ambientales, tecnológicos y de origen natural. En los últimos años, el cultivo de langostino en varios países de Asia, América del Sur y África, ha registrado brotes de enfermedades infecciosas, como el síndrome de mortalidad temprana, por incidencia de bacterias, hongos y virus, frecuentemente asociados con el aumento en las densidades de cultivo y el rápido desarrollo de la acuicultura con deficiencias en los métodos de manejo, calidad de aguas, valor nutricional del alimento, entre otros factores (Paillard *et al.*, 2004; Pruzzo *et al.*, 2005; FAO, 2014), con la consiguiente pérdida parcial y en algunos casos total de la producción en casi todas las etapas del cultivo, provocando pérdidas millonarias (Lin, 1995; Lightner, 1996; Moriarty, 1999; Berger, 2000).

Perú, enfrentó en el año 2000 la crisis de producción más aguda en su historia a consecuencia del Virus de la Mancha Blanca (WSV por sus siglas en inglés). Se estima que las exportaciones cayeron de un promedio anual de U\$S 50 millones a 3 millones en el año 2000 (Caro, 2000). Actualmente los volúmenes de producción se han incrementado sustancialmente gracias al cultivo intensivo; siendo así que para el año 2005 el 30 % de la producción exportable de langostinos provino de los cultivos intensivos; haciéndose la estimación que para el 2014 la participación de los cultivos intensivos sería del 75%. Sin embargo, al igual que esta infección viral, agentes patógenos bacterianos han estado igualmente implicados y han sido frecuentemente asociados a mortalidades.

Por otro lado, cada especie animal posee una microbiota autóctona, en animales terrestres está compuesta en su mayoría por organismos anaeróbicos (McCartney, 1994). En langostinos silvestres y de cultivo la microbiota se encuentra constituida principalmente por bacterias Gram negativas y en menor proporción por Gram positivas (McCartney, 1994; Morales, 2000; García, 2003). En la mayoría de los casos los mecanismos internos de defensa les permiten controlar a los agentes patógenos (Morales, 2000). Sin embargo, cuando éstos mecanismos están suprimidos se vuelven susceptibles a ataques de patógenos (Brock & Lightner, 1990; Morales, 2000), donde el estrés generado por las condiciones del cultivo provoca el desequilibrio de la flora intestinal lo cual es aprovechado por diversos agentes patógenos oportunistas que se instalan y se multiplican desplazando rápidamente a las bacterias benéficas (Zazueta, 2003).

Los principales factores que causan estrés a los langostinos en cultivo son la pobre calidad del agua, elevadas densidades y variación brusca de los parámetros físico-químicos como la temperatura, salinidad, pH, baja concentración del oxígeno disuelto, baja tasa de recambio de agua, mala alimentación y prácticas de manejo inadecuadas (Lewis, 1973; Lightner & Lewis, 1975; Brock & Lightner, 1990; Morales, 2000).

Diversos investigadores consideran que las principales enfermedades del cultivo de langostinos son producidas por bacterias del género *Vibrio* (Aguirre *et al.*, 2004; Lightner *et al.*, 1992; Decamp & Moriarty, 2006; Morales, 2000; Garriques & Arévalo, 1995). Este género forma parte de la flora normal del hábitat en los estanques de cultivo (Sinderman, 1990; Segovia *et al.*, 2000, Alvarez *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 2000; Pizzuto & Hirst, 1995) que actúan como agentes patógenos (Brock & Lightner, 1990; Segovia *et al.*, 2000). Las diferentes enfermedades generadas por estas bacterias se conocen como vibriosis,

enfermedad bacterial, septicemia bacteriana de los peneidos, vibriosis de los peneidos, vibriosis luminiscente y enfermedad de las patas rojas (Alday-Sanz *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2004). Entre las especies de *Vibrio* que han sido involucradas en las enfermedades observadas en langostino son *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. penaeicida*, *V. anguillarum*, *V. nereis*, *V. campbellii*, *V. tubiashi* y *V. fluviales* (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 2004).

La vibriosis es la enfermedad más problemática en acuicultura y es responsable de la mortalidad del langostino de cultivo en todo el mundo (Lightner & Lewis, 1975; Adams, 1991; Lightner *et al.*, 1992; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1996; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). Esta enfermedad es causada por bacterias Gram negativas de la familia Vibrionaceae presente en el agua, alimento vivo y sedimentos; e ingresa al hospedero a través de las heridas en el exoesqueleto (Jiravanichpaisal & Miyazaki, 1994; Alday-Sanz *et al.*, 2002), penetra por las branquias (Taylor & Taylor, 1992) y el intestino (Ruby *et al.*, 1980; Jayabalan *et al.*, 1982). Las mayores epizootias de vibriosis han sido reportadas para *Penaeus monodon* en la región Indo Pacífico, *P. japonicus* de Japón, y *L. vannamei* de Ecuador, Perú, Colombia y América Central (Lightner, 1996).

Actualmente el tratamiento de vibriosis es con antibióticos, pero ocasiona cepas resistentes y cada vez más patógenas (Valle *et al.*, 2002) y, además, generan un elevado riesgo de toxicidad en los humanos. Por ejemplo, el cloranfenicol está relacionado con problemas de anemia aplásica y los nitrofuranos se les atribuye propiedades carcinogénicas, los cuales son regulados por legislaciones norteamericanas (FDA) y europeas (EMEA), mediante norma prohibitiva y cauteladora de “cero tolerancia” en la producción de alimentos (Montoya, 2002).

Existen nuevas opciones para el control de enfermedades bacterianas en peneidos con el uso de microorganismos probióticos, los cuales producen efectos benéficos para el hospedero tales como, el incremento de la tasa de crecimiento, disminuye la conversión alimentaria, incrementa la resistencia a enfermedades, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y mejora la calidad del agua (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil, 2000; Do Nascimento *et al.*, 2007; Villamil & Martínez, 2009).

Los probióticos son bacterias benéficas que actúan a través de distintos mecanismos como la producción de compuestos inhibitorios, la competencia por nutrientes y sitios de

adhesión, el suministro de enzimas y estimulación de la respuesta inmune del langostino (Verschuere *et al.*, 2000; Balcazar *et al.*, 2006), que se aplican al agua o al alimento (Decamp & Moriarty, 2006), donde mejoran la supervivencia de langostinos después de una infección por *Vibrio* (Do Nascimento *et al.*, 2007).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son utilizadas en la producción de probióticos y son caracterizadas como bacterias Gram positivas, anaeróbicas facultativas, inmóviles, no esporuladas, catalasa negativa, carecen de citocromo, de forma bacilar, y producen ácido láctico como mayor producto de su metabolismo (Axelsson, 1990; Gatesoupe, 1999; Estela *et al.*, 2007;). Existen diferentes géneros de bacterias lácticas, los géneros más importantes son *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Etragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, que se desarrollan y adaptan a diferentes condiciones ambientales (Ivar, 2005; Farzanfar, 2006).

Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aislados de diversos sustratos como tierra, agua, plantas, leche, peces, granos, tracto digestivo de animales, entre otras fuentes (Strøm & Ringø, 1993; Torres, 2002; Pfeiler & Klaenhammer, 2007; Azadnia *et al.*, 2011; Gómez, 2013).

La microbiota bacteriana está relacionada con el tracto digestivo de los animales acuáticos (García, 2003), cuya composición genérica son diferentes entre sí, debido a una serie de factores como condiciones ambientales del lugar de captura de los animales; diferente en la clasificación taxonómica de las bacterias, en los métodos de aislamiento: y la edad y estado de desarrollo de la especie (Moriarty, 1976; Campbell & Buswell, 1983). Álvarez *et al.* (2000) reportaron que hubo diferencias en cuanto a las especies aisladas por otros investigadores, a pesar de proceder de las mismas especies de langostino marino *L. vannamei* y *L. schmitii*.

En los sistemas de cultivos intensivos, donde se manejan altas densidades, se suministran raciones diarias de hasta o mayores a 200 kg/ha de alimento balanceado y donde la temperatura oscila entre 28°C y 30°C; se crean condiciones adversas de calidad de agua por la alta carga orgánica, la dinámica del balance natural de la microbiota bacteriana se ve alterada y la habilidad de los langostinos para tolerarla se ve disminuida y puede ser interrumpida con leves cambios en las condiciones ambientales, estando

predispuestos a diversas enfermedades. Dichas condiciones restringen, además, las posibilidades de utilizar probióticos de distinta procedencia pues se verán reducidas para colonizar y desarrollarse o a su vez pueden convertirse en nocivos para los langostinos.

Los probióticos se utilizan a nivel comercial desde hace tiempo en diferentes especies de langostinos cultivados en países como China, Taiwán, Ecuador, México, Colombia, Perú, Brasil, entre otros (Moriarty, 1990; Gatesoupe, 1999; Moriarty, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Cedeño, 2009; Luna, 2009; Sotomayor, 2009; Fernández, *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta los diferentes problemas que generan los antibióticos, es necesario buscar nuevas alternativas que permitan mitigar el impacto negativo de diversos patógenos bacterianos en los cultivos; las cuales deben ser amigables con el ecosistema vinculado con el cultivo de peneidos. Es necesario buscar soluciones viables que permitan el desarrollo sostenible de la industria acuícola en nuestro país.

Por tal motivo, en esta investigación se formula el siguiente problema ¿Qué características poseen las bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de *L. vannamei* cultivados en sistema intensivo en Tumbes – Perú y cuál es su potencial uso como probióticos?

El objetivo general fue caracterizar las bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de *L. vannamei* cultivados en sistema intensivo en Tumbes – Perú y determinar su potencial uso como probióticos.

Los objetivos específicos fueron:

- Aislar bacterias ácido lácticas del intestino de *L. vannamei*.
- Identificar bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de *L. vannamei*.
- Seleccionar bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Población

Los langostinos juveniles de *L. vannamei* se capturaron del estanque 17 de cultivo intensivo del campo langostinero Lan Karina de la empresa Corporación Refrigerados INYSA, ubicado en el distrito de Zarumilla, departamento de Tumbes (Anexo 1). Este estanque tiene un área de 1,56 ha, está revestido con geomembrana, provisto de aireadores tipo inyección y paletas y es de tipo invernadero. La densidad de siembra fue de 120 ind/m² y el consumo de alimento promedio fue de 490 kg/ha.

1.2. Muestra

Los 10 juveniles de *L. vannamei* con peso promedio de 7 g y de apariencia saludable (antenas y urópodos de coloración no rojisa, intestino lleno, hepatopáncreas grande y brillante) se utilizaron como muestra. Los langostinos fueron llevados en bolsas plásticas provistas de oxígeno, a las instalaciones de la empresa Bides Laboratorios Soluciones Integrales S.R.L., ubicada en Tumbes.

1.3. Unidad de análisis

Para el aislamiento de bacterias se utilizó como unidad de análisis el intestino y el hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei*.

Para la prueba de inhibición de utilizo como unidad de análisis los halos de inhibición.

2. MÉTODOS

2.1. Tipo de investigación

Investigación descriptiva

2.2. Diseño de investigación

Diseño de investigación no experimental descriptivo de una sola casilla.

2.3. Procedimiento

Descarte de patógenos: A los langostinos seleccionados, se realizó análisis por PCR para descartar la presencia de patógenos como WSV (Virus de la mancha blanca), IHHNV (Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa), BP (*Baculovirus penai*), NHPB (Bacteria de la necrosis del hepatopáncreas), siguiendo la metodología utilizada por Alfaro *et al.* (2010). Además, a partir del hepatopáncreas se realizaron cultivos bacterianos en agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) para conocer la cantidad de Vibrios (UFC/g) presentes en los langostinos.

Aislamiento y selección primaria de BAL: Los intestinos extraídos de los langostinos se homogenizaron en caldo peptonado con ayuda de micropistilos y se inoculó en tubos con caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) y se incubó por 48 h. Las muestras de los tubos que presentaron crecimiento (presencia de turbidez) se realizaron siembras por estría en agar MRS suplementada con azul de anilina (0,012%) y se incubó por 48 h. Luego, las colonias bacterianas desarrolladas que presentaron de preferencia coloración azul intensa, se purificaron varias veces en nuevo medio de cultivo agar MRS suplementada con azul de anilina (0,012 %). Las cepas se conservaron a -20 °C en caldo MRS suplementado con 25 % de glicerol y a 4 °C en tubos con agar MRS inclinado.

Identificación básica de BAL: Todas las bacterias aisladas del intestino de los langostinos y seleccionadas inicialmente se identificaron teniendo en cuenta sus características fisiológicas básicas, mediante las siguientes pruebas: coloración Gram, morfología, catalasa, oxidasa, oxidación/fermentación de la glucosa, producción de gas y esporulación.

Pruebas para determinar el uso de probióticos:

Para la selección de bacterias con propiedades antibacterianas, se utilizó el método de inhibición *in vitro* (Ramírez, 2005), enfrentándose directamente en discos de agar MRS (6 mm de diámetro) impregnado con BAL después de 48 h de incubación, con las cepas bacterianas patógenas *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae*, sembradas por extensión en placas de agar Mueller Hinton. La producción de halos de inhibición, demostraron la actividad antibacteriana de las cepas aisladas, y se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

Para descartar el efecto inhibitorio por competición de nutrientes entre la bacteria patógena y la BAL, se realizó una prueba final con el método de difusión en pocillo (Chythanya *et al.*, 2002), en el cual se perforó dos hoyos de 6 mm en placas con agar Mueller Hinton previamente sembrado por superficie con *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae*. Se analizó dos tratamientos, extracto de cultivo líquido de BAL (48 h de cultivo) libre de bacterias (por centrifugación a 10000 g por 10 min y luego filtrada en filtro de 0,2 µm), neutralizado con NaOH 5 M y otro sin neutralizar. A cada pocillo preparado se agregó 50 µL de cada uno de los extractos y se procedió a incubar a 33°C por 24 h, esto, además, permitió evaluar si el efecto inhibitorio fue producido por algún tipo de bacteriocina u otro producto diferente a los ácidos orgánicos.

El diámetro de los halos de inhibición fueron expresados como media ± desviación estándar.

Aislamiento de bacterias patógenas: Adicionalmente los hepatopáncreas de langostinos con signos de enfermedad, procedentes de cultivos intensivos, se cultivaron en agar TCBS. Las colonias bacterianas que crecieron en las placas Petri, se aislaron por siembra en estría en agar TSA (Agar tripticasa soya) y se realizaron purificaciones consecutivas en nuevo agar TSA. Las cepas se conservaron a -20 °C en caldo BHI suplementado con 25 % de glicerol y a 4°C en tubos con agar BHI inclinado.

Identificación molecular: Las colonias patógenas aisladas se identificaron molecularmente mediante el gen 16S ARNr. Para esto, las extracciones de ADN se realizaron con el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich *et al.* 1991), adaptado para células bacterianas (Dulanto, 2013). Las cepas bacterianas se sembraron en tubos de vidrio con 10 mL Caldo Tripticasa Soya (TSB) e incubadas a 28-30 °C por 24 h. Luego, 1 mL de la suspensión bacteriana se añadió a un microtubo de 1,5 mL y se centrifugó a 10000 g durante 5 min; se eliminó el sobrenadante, posteriormente se pesó la biomasa de células en una balanza analítica hasta obtener entre de 15 a 25 mg. Al microtubo con las células bacterianas se le agregó 600 µL de solución DTAB (dodeciltrimetilamonio bromuro 8%, NaCl 1,5 M, Tris HCl 100 mM pH 8,8 y EDTA 50 mM) y con ayuda de micropistilos plásticos se homogenizó con el fin de ayudar a la lisis celular. Luego, se incubó a 75°C por 15 min y se agitó en vortex por 20 s. Después, se adicionó 700 µL de cloroformo HPLC y se agitó nuevamente en vortex por 20 s. A continuación, se centrifugó a 10000 g durante 5 min y se transfirió 250 µL del sobrenadante a otro microtubo que contiene previamente

100 µL de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro, 0,4 M NaCl) y 900 µl de agua destilada.

El nuevo microtubo se incubó a 75°C durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 10000 g durante 10 min. Inmediatamente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el ADN con 150 µL de solución disolvente (NaCl 1,2 M) incubándose a 75°C durante 5 min. Luego, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Se transfirió 150 µL de la solución a un nuevo microtubo que previamente contiene 300 µL de etanol absoluto. Este nuevo microtubo se agitó en vortex por 20 s y se centrifugó a 10000 g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder el pellet de ADN y se agregó 500 µL de etanol al 75 % para lavar el ADN. Finalmente, el ADN fue resuspendido con 200 µL de tampón TE (Tris 10 mM- EDTA 1 mM) y almacenado a -20°C.

Para amplificar la región 16S rDNA, se utilizó los cebadores universales 8F (5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´) y 1510R (5´ GGC TAC CTT GTT ACG A 3´) descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud *et al.*, 2003). El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, constituida por 2 µl de buffer Taq 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 1 U de Taq ADN polimerasa, 10 pmol de cada cebador y 2 µl de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y constó de un ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Luego, 10 uL de cada producto de amplificación, se migró en gel de agarosa al 1 % con tampón de migración TAE 1X. La migración se realizó a 120 V durante 20 min; conjuntamente se migró un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de bases (pb). Los geles se visualizaron con un transiluminador UV y se fotografió con cámara digital. Para la secuenciación se utilizó 10 µl de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, y se colocaron en microtubos de 0,2 ml. Además, se prepararon en microtubos de 0,2 ml porciones de 5 uL de cada cebador universal para el gen 16S DNAr. Estos fueron empacados y enviados a la empresa Macrogen de Korea, para realizar la secuenciación de las dos cadenas de cada producto amplificado.

III. RESULTADOS

3.1. Análisis de ensayo por PCR y microbiológicos de langostinos

Los análisis por PCR descartaron la presencia de los patógenos WSV, IHNV, BP; y NHPB en los langostinos evaluados (Fig. 1).

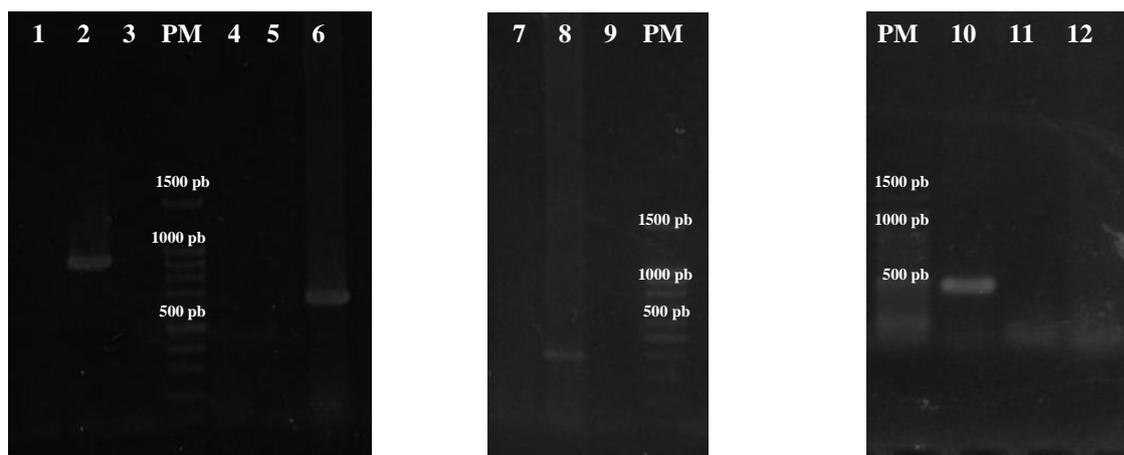


Figura 1. Resultados de análisis por PCR a diferentes patógenos en juveniles de *L. vannamei* del estanque N° 17 del campo Lan Karina de la empresa Corporación Refrigerados INYSA. a. E-17 (1), control positivo WSV (2), control negativo WSV (3), marcador de peso molecular (PM), E-17 (4), control negativo NHPB (5), control positivo NHPB (6) b. E-17 (7), control positivo IHNV (8), control negativo IHNV (9), marcador de peso molecular (PM) c. marcador de peso molecular (PM), control positivo BP (10), E-17 (11), control negativo BP (12).

Por otro lado, de los recuentos bacterianos de Vibrios, los niveles se encontraron dentro de lo normal (80 %) y normal-elevado (20 %), considerando la tabla de interpretación de resultados bacteriológicos según Gómez-Gil *et al.*, (1998) (Tabla 1).

Tabla 1. Recuento bacteriano de vibrios en juveniles de *L. vannamei* estanque 17 del campo Lan Karina de la empresa Corporación Refrigerados INYSA.

Muestra	Medio de cultivo	Descripción	UFC/g HP	Nivel
Langostino 01	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	34000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	34000	Normal
Langostino 02	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	50000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	50000	Normal
Langostino 03	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	124000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	124000	Normal-elevado
Langostino 04	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	30000	
		Vibrios sacarosa negativas	2300	
		Total	32300	Normal-elevado
Langostino 05	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	40000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	40000	Normal
Langostino 06	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	56000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	56000	Normal
Langostino 07	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	17000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	17000	Normal
Langostino 08	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	88200	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	88200	Normal
Langostino 09	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	61000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	61000	Normal
Langostino 10	Agar TCBS	Vibrios sacarosa positivas	28000	
		Vibrios sacarosa negativas	0	
		Total	28000	Normal

3.2. Aislamiento de BAL

Se aislaron 10 colonias bacterianas de las placas con agar MRS suplementado con azul de anilina, seleccionándose preferentemente colonias bacterianas azul intensas (Fig. 2).

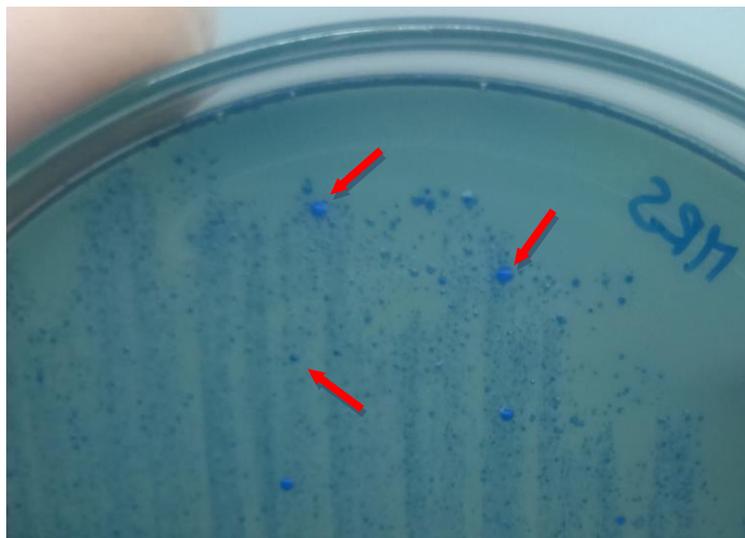


Figura 2. Colonias bacterianas ácido lácticas desarrolladas en agar MRS suplementada con azul de anilina.

3.3. Identificación básica de BAL

De las 10 colonias aisladas inicialmente se analizaron diferentes características morfológicas y fisiológicas (Tabla 3). Las colonias bacterianas que presentaron reacción Gram negativa, oxidasa positiva, catalasa positiva $\text{pH} \geq 5$, presencia de gas y formación esporas, no fueron consideradas para los estudios posteriores de inhibición bacteriana.

Tabla 3. Características morfológicas y fisiológicas de las colonias bacterianas aisladas.

Cepa	Gram	Morfología celular	pH del medio de cultivo	Catalasa	Oxidasa	Prueba O/F glucosa	Presencia de gas	Presencia de spora
BG1	+	Bacilo	5,1	+	-	Fermentativa	-	-
BG2	+	Bacilo	5,0	+	-	Fermentativa	-	-
BG3	+	Bacilo	4,9	+	-	Fermentativa	-	+
BG4	-	Cocobacilo	6,4	+	+	Oxidativa	+	-
BG5	+	Bacilo	5,0	+	-	Fermentativa	-	-
BG6	+	Bacilo	6,1	+	-	Oxidativa	-	-
BG7	+	Bacilo	5,5	+	-	Fermentativa	-	+
BG8	+	Bacilo	5,0	+	-	Fermentativa	-	+
BG9	+	Bacilo	5,2	+	-	Fermentativa	+	-
BG10	+	Bacilo	3,9	-	-	Fermentativa	-	-

3.4. Inhibición bacteriana de BAL

Para realizar las pruebas de inhibición con las cepas bacterianas patógenas para langostino, se eligió a la cepa BG10 considerando para esto los resultados de la caracterización morfológica y fisiológica de las bacterias aisladas. Esta cepa de bacteria ácido láctica presentó característica inhibitoria, produciendo halos de $12,0 \pm 0,2$ mm con la bacteria *V. harveyi* y de $16,0 \pm 0,1$ mm con la bacteria *Shewanella algae* (Fig.3).

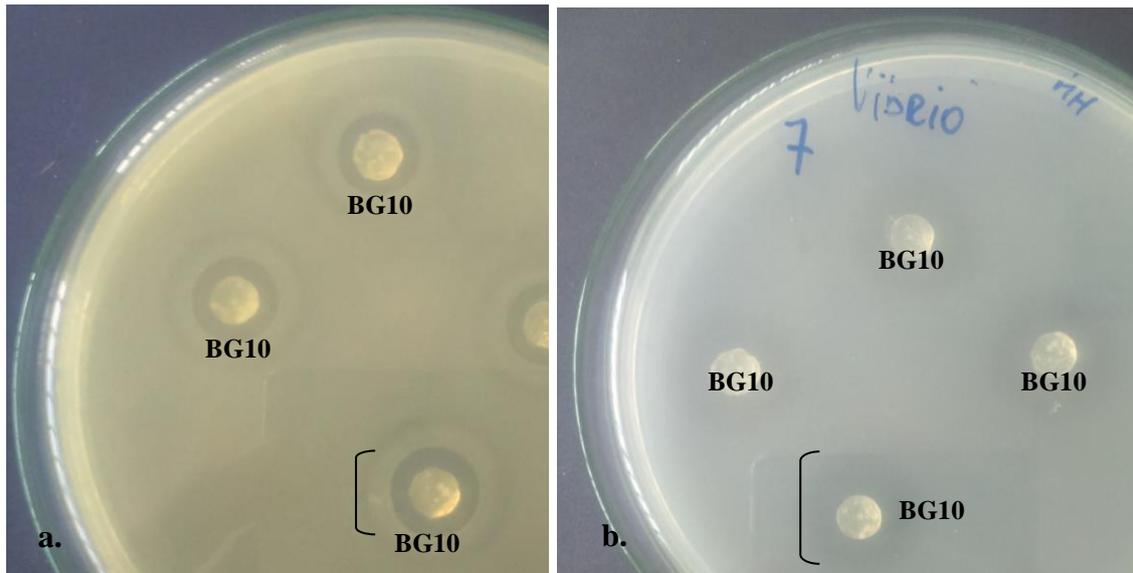


Figura 3. Pruebas de inhibición de la cepa bacteriana ácido láctica BG10 frente a las bacterias *V. harveyi* (a) y *Sh. algae* (b).

Además, se observa que la actividad antibacteriana de la cepa BG10 frente a *V. harveyi* y *Sh. algae*, ocurre solo con el extracto acuoso bacteriano sin neutralizar y no con el mismo extracto neutralizado con hidróxido de sodio (Fig. 4).

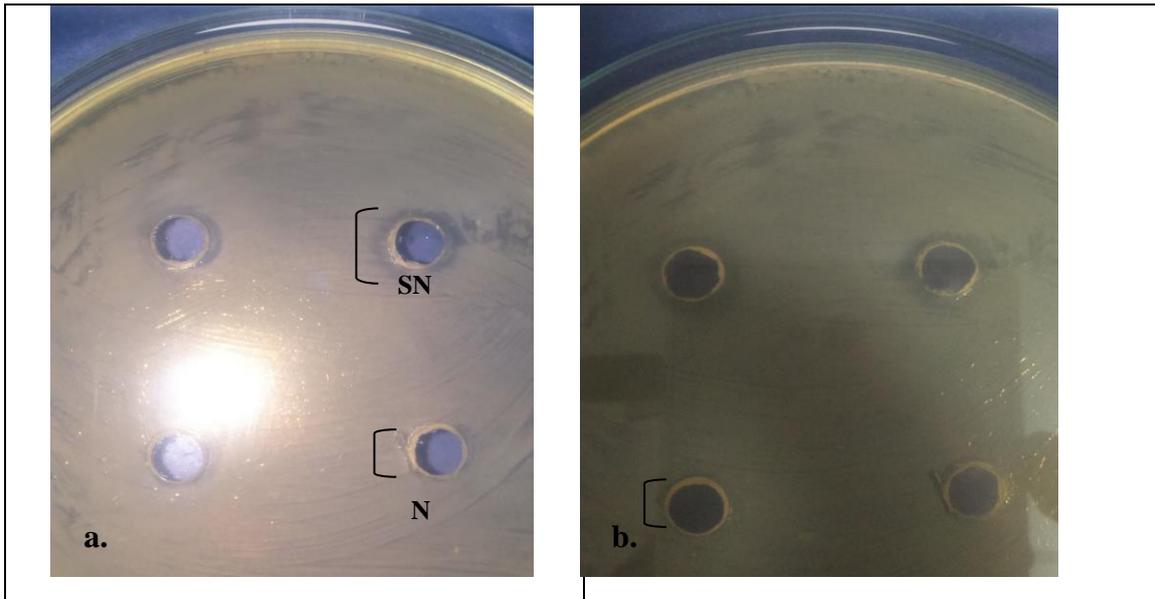


Figura 4. Pruebas de inhibición de extracto acuoso de la cepa bacteriana ácido láctica BG10 neutralizado (N) y sin neutralizar (SN) frente a las bacterias *V. harveyi* (a) y *Sh. algae* (b).

3.5. Aislamiento de bacterias patógenas e identificación molecular

Adicionalmente, se seleccionaron dos colonias bacterianas desarrolladas en agar TCBS a partir de langostinos de cultivo con signos de flacidez, cromatóforos expandidos, coloración rojiza de pleópodos y nado errático. Estas colonias fueron identificadas molecularmente mediante la amplificación el gen 16S ARNr (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de colonias bacterianas patógenas en langostinos de cultivo *L. vanamei*, utilizando el programa Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Cepa patógena 1 = *Vibrio harveyi*

Porcentaje de identidad: 99%

Número de accesión: NR_102976.1

Secuencia generada: >151218-04_M07_7A_16SrRNAF518.ab1 1250

```
TACTGGGCGTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTC
GGAATTGCATTTGAAACTNGGCAGACTAGAGTACTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATAC
TGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAG
ACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA
ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCG
AGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGG
CCAACCTTGCAGAGAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACT
CGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGTNNTAGTTTAACTT
TCGGGAGGACGCTTACCACTTTGTGGTTCATGACTGGG
```

Cepa patógena 2 = *Shewanella* algae

Porcentaje de identidad: 99%

Número de accesión: NR_102976.1

Secuencia generada: >151218-04_A09_10A_16SrRNAF518.ab11260

```
TACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT
GGGAACCGCATTTCGAACTGGCAAAGTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCCGCCCCCTGGACAAAGACT
GACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAACGCATTAAGTAGA
CCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAA
CTTTTCAGAGATGAATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTACTTGCCAGCG
GGTAATGCCGGGAACTTTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGC
GAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCNCATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCT
TCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGGTTCATGACTGGGGTGA
```

IV. DISCUSIÓN

Los langostinos evaluados, fueron negativos a WVS, IHHNV, BP y NHPB, y además el 80 % de los langostinos presentaron los recuentos de *Vibrio* en agar TCBS dentro de los rangos normales permisibles (Gómez-Gil *et al.*, 1998), por lo que cumplió con la exigencia de que las cepas probióticas provengan de organismos sanos y que el proceso de selección de las BAL, candidatas como probióticos se realice con alta rigurosidad (Holzapfel *et al.*, 1998; Villamil *et al.*, 2009). En la presente investigación se comprueba la presencia de BAL en el intestino de *L. vannamei* cultivados en sistema intensivo de la empresa. Diversos estudios reportan la presencia de este grupo bacteriano en el intestino de *L. vannamei* (Ramírez, 2005; Kongnum & Hongpattarakere, 2012); aunque Partida (2009) y Leyva (2010), aislaron BAL del intestino de *Farfantepenaeus californiensis*, pero no en *L. vannamei*.

El uso de azul de anilina permite identificar fácilmente la presencia de BAL dentro de un cultivo heterogéneo de bacterias, ya que las colonias productoras de ácidos orgánicos asimilan el colorante (Giraud, 1992; Ramírez, 2005; Partida, 2009). De las 10 cepas aisladas en agar MRS suplementada con azul de anilina, la cepa BG10 fue la única que presentó características propias de BAL, es decir, bacteria Gram positiva, anaeróbica facultativa, no esporulada, catalasa negativa, carece de citocromo, de forma bacilar, ácido tolerante y estrictamente fermentativo. Según esto, se logró aislar solo una cepa de BAL ya que es conocido que estas se encuentran formando parte de la flora microbiana natural del tracto digestivo de langostinos sanos (García, 2003), lo cual no deja de ser interesante ya que existen reportes que indican que, en organismos acuáticos la microflora es generalmente considerada como transitoria y que puede variar con los cambios de temperatura y salinidad (Gatesoupe, 2000).

La prueba de catalasa de la cepa BG10 fue negativa, característica general de las BAL ya que son anaerobias y carecen de esta enzima (Naidu *et al.*, 1999), esto concuerda con lo reportado por Roissart & Luquet (1994). La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Los resultados negativos de la BG10 para la producción de gas y oxidasa, constituyen una importante característica probiótica de las BAL utilizadas en la alimentación, dado que la primera indica que la cepa no produce gas, que altere las funciones del tracto gastrointestinal del huésped (Tagg & Mcgiven, 1971; Fontana, 2015), mientras que la

segunda indica que la cepa no produce la enzima citocromo C oxidasa convirtiéndola en una cepa estrictamente anaeróbica, y ésta enzima se encuentra presente solo en los organismos aerobios capaces de usar el oxígeno como aceptor final de hidrógeno (Aznar & Zuñiga, 2011). Por otro lado, la principal característica del metabolismo de las BAL es la fermentación de los azúcares (Aznar & Zuñiga, 2011), tal como ocurre con la cepa BG10 que presenta un metabolismo estrictamente fermentativo

La cepa BG10 creció en un medio con pH 3,9, lo que demuestra su capacidad de sobrevivir en condiciones drásticas de acidez, propiedad que la hace adecuada para ser empleada como una cepa con propiedades probióticas, ya que la mayoría de BAL son capaces de sobrevivir en el tracto digestivo del huésped (Mahious & Ollevier, 2005, Vásquez *et al.*, 2009) y es una de las primeras propiedades evaluadas al seleccionar cepas probióticas (Tuomola, *et al.*, 2001) y la mayoría crece a pH entre 4,0 a 4,5 (Carr *et al.*, 2002). La resistencia a pH bajos permite sobrevivir en medios donde otras bacterias morirían, como los patógenos oportunistas (Ajitha *et al.*, 2004) por lo que favorece los sitios de adhesión de los microorganismos lácticos (Iñiguez *et al.*, 2007). Por consiguiente, su acción probiótica sería eficaz contra los microorganismos patógenos presentes en el intestino del langostino.

Además, la cepa BG10 mostró características inhibitoras contra *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae*, que afectan el cultivo de langostino (Moriarty, 1999; Gómez-Gil, 2000). Las BAL poseen actividad contra bacterias Gram negativas como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* y *Proteus vulgaris* (Ringø & Gatesoupe, 1998), así también contra *V. cholerae*, *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas* (El-Naggar, 2004). Ramírez (2005), demostró *in vitro* el efecto inhibitorio de BAL aisladas del intestino de *L. vannamei* sobre diferentes patógenos. Sotomayor (2009), encontró dos cepas de BAL con alta capacidad inhibitoria contra diferentes cepas patógenas. Sánchez *et al.*, (2013), demostraron actividad antagonica de BAL frente a *Vibrio harveyi*.

El efecto inhibitorio de la cepa BG10 contra *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae* probablemente sea consecuencia de la liberación de ácido que bajaron el pH del medio, pues fue comprobado neutralizando la solución del extracto bacteriano con NaOH siguiendo las pautas de Chythanya *et al.*, (2002). El ácido láctico y el ácido acético son sustancias antagonicas que liberan las BAL (Lindgren & Clevström, 1978; Midolo *et al.*, 1995; Alakomi *et al.*, 2000; Annuk *et al.*, 2003), además de sustancias antibacteriales como

bacteriocinas (Imada *et al.*, 1985; Williams & Vickers, 1986; Maeda, 1994; Villamil *et al.*, 2003a ;Vázquez *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008), dióxido de carbono (Naidu *et al.*, 1999) y peróxido de hidrógeno (Vázquez *et al.*, 2005).

La actividad antimicrobiana de la cepa BG10 probablemente se deba a los ácidos orgánicos y al pH, donde la fracción no disociada de los ácidos orgánicos sería la que ocasiona mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica. Estas moléculas interfieren con funciones celulares, como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa. También, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Vasquez *et al.*, 2009; Requena & Pelaez, 1995).

Las bacterias patógenas de *L. vannamei* con signos de enfermedad y su caracterización molecular, nos indica que pertenecen a las especies *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae* y por las concentraciones encontradas es probable que generen enfermedades en el langostino (datos no publicados). Así también, se han aislado Vibrios en organismos sanos y enfermos de *L. vannamei* (hepatopáncreas y tracto digestivo), del agua y sedimento (Álvarez *et al.*, 2000; Gullian & Rodríguez, 2002; Partida, 2009). Es importante señalar que el género *Vibrio* forma parte de la flora normal de los ambientes naturales acuáticos, de los estanques de cultivo y del langostino (Pizzuto & Hirst, 1995; Álvarez *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2000; Segovia *et al.*, 2000), los cuales actúan además como agentes patógenos (Brock & Lightner, 1990; Segovia *et al.*, 2000).

La mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para acuicultura pertenecen a las BAL, de las cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Holzapfel *et al.*, 1998). Diversos estudios reportan el uso de BAL en langostinos. Chiu *et al.* (2007), reportaron que *L. plantarum* suministrado en la dieta mejoró la capacidad inmune de *L. vannamei*, y el aumento de su resistencia a la infección por *V. alginolyticus*. Kongnum & Hongpattarakere (2012), controlaron una infección inducida con *Vibrio harveyi* en *L. vannamei* con una cepa de *L. plantarum* aislada del

tracto digestivo de langostino. Por consiguiente, los resultados indican que la cepa BG10 podría ser utilizada para prevenir y tratar enfermedades en los sistemas acuícolas intensivos de langostino. Esta cepa podría permitir la implementación de nuevas estrategias en el desarrollo de productos probióticos para organismos acuáticos.

V. CONCLUSIONES

Se aislaron 10 colonias bacterianas ácido lácticas del intestino de *L. vannamei* en placas con agar MRS suplementado con azul de anilina.

La cepa bacteriana BG10 presentó características propias de BAL (Gram positiva, forma bacilar, anaeróbica facultativa, no esporulada, catalasa negativa, oxidasa negativa, ácido tolerante y fermentativa).

La cepa bacteriana ácido láctica BG10 presentó propiedades probióticas al mostrar actividad inhibitoria frente a las bacterias *Vibrio harveyi* y *Shewanella algae*.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar otras pruebas para determinar que una bacteria sea considerada como probiótico, tales como: resistencia a pH bajos, resistencia sales biliares, resistencia a salinidades altas, adhesión epitelial, adhesión a mucus.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, G., H. Mejia & F. Asencio. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 5: 1395-1404.
- Alfaro, R., M. Guevara & I. Gonzales. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan a los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. peru. Biol.*, 17(3):359 – 364 pp.
- Álvarez, J., B. Austin, A. Álvarez, B. Quintero & H. Reyes. 1999. Estudio bacteriológico en langostinos peneidos silvestres y bajo cultivo en Venezuela. FONAIAP DIVULGA N° 62, abril – junio.
- Alvarez, J., B. Austin, A. Alvarez & C. Agurto. 2000. Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de langostinos marinos sanos, silvestres y cultivados en Venezuela. *Revista Científica Veterinaria Tropical*, 25(1): 5-27.
- Alday-Sanz, V., A. Roque & J.F. Turnbull, 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.*, 48:91– 99.
- Adams, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. *Fish Shellfish Immunol*, 1:59–70.
- Axelsson, L. 1990. *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. Studies on antagonism, metabolism and genetics. Ph.D. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.
- Balcazar, J., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Veridrell, M. Evora & J. Musquiz. 2006. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18:61-3
- Barnabé, G. 1996. Bases Biológicas de la Acuicultura. Ed. Omega. 563pp.
- Berger, C. 2000. Aportes de la biotecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de langostinos peneidos. in L. E. Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. A. Olvera Novoa & R. Rivera-Cerecedo (eds.), *Avances en nutrición acuícola. Memorias*

- del V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola, 19-22 de noviembre, Mérida, pp. 102-110.
- Brock, J. & D. Lightner, 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.). Diseases of Marine Animals Vol. 3, Biologische Install Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.
- Cedeño, R. 2009. Evaluación de nuevas cepas probióticas Inv-116 y Inv-165 en el engorde del langostino *Penaeus vannamei*. CENAIM INFORMA. Boletín Informativo 152. Mayo 30 del 2009. 3pp. Disponible en: www.cenaim.espol.edu.ec
- Chen, F.R., Liu, P.C. & K.K., Lee. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicus*. Zool Naturforsch, 55:94-99.
- Chynthanya, R. & I. Karunasagar. 2002. Inhibitions of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture, 208:1-10.
- Campbell, A. C. & J. A. Buswell. 1983. The intestinal microflora of farmed dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. J. Appl. Bacteriol., 55:215-223.
- Caro, R. 2000. América latina, fuente de camarones unos años después. INFOPECA Internacional. N° 3 Octubre-Noviembre 1999. Disponible en <http://cdiserver.mbasil.edu.pe/mbapage/BoletinesElectronicos/Estudios%20de%20mercado/camaronam.lat.pdf>
- Decamp, O. & D. Moriarty. 2006. Probióticos como una alternativa a los antimicrobianos: limitaciones y potencial. Revista Panorama Acuícola Magazine, Mayo – Junio 2006, pp. 10-12.
- Do Nascimento, F., F. Santiago, C. Buglione, J. Pedreira, E. Beltrame, M. Laterca, C. Ramirez & L. Vinatea. 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. Brazilian Journal of Oceanography, 55(4): 251-255.
- Dulanto, G. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA

- restriction analysis (ARDRA). Lima – Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- FAO. 2014. El Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 pp.
- Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS. Immunology & Medical Microbiology, 48:149-158.
- Fernandez, R., M. Sridhar & N. Sridhar. 2011. Effect of lactic acid bacteria administered orally on growth performance of *Penaeus indicus* (H. Milna Edwards) Juveniles. Research Journal of Microbiology, 6:406-479.
- Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 65: 97-101.
- García, R. 2003. Relevancia de las bacterias ácido lácticas en los diferentes estadios del cultivo de langostino. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, México.
- Garrigues, D. & G. Arevalo. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. Word Aquaculture Society, 53 – 59.
- Gatesoupe, F. 1999. The use of probiotic in aquaculture. Aquaculture, 180: 147-165.
- Gomez-Gil, B., L. Tron-Mayen, A. Roque, J. F. Turnbull, V. Inglis & A. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 163:1-9.
- Gómez-Gil, B., A. Roque & J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organism. Aquaculture, 191:259-270
- Jayabalan, N., R. Chandran, V. Sivakumar & K. Ramamoorthi. 1982. Occurrence of luminescent bacteria in sediment. Curr Sci., 51:710–711.
- Jiravanichpaisal, P. & T. Miyazaki. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger shrimp *Penaeus monodon*. J. Aquat. An. Health, 6: 27-35.

- Lavilla-Pitogo, C.R., E.M. Leano & M.G. Paner. 1996. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent bacteria, *Vibrio harveyi* in the rearing environment. SICCPPS book of abstracts, SEAFDEC, Iloilo City, Philippines. p.40.
- Lavilla-Pitogo, C.R., E.M. Leano & M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164:337–349.
- Lewis, D.H. 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. *Proc. World. Maricult. Soc.*, 4: 333-338.
- Lightner, D.V. & D.H. Lewis. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, 37(5-6): 25-28.
- Lightner, D.V., T.A. Bell, R.M. Redman, L.L. Mohny, J.M. Natividad, A. Rukyani & A. Poernomo. 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid shrimps/shrimps of the Americas and Indo-Pacific. *In*: M. Shariff, R. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.). *Proceedings 1st Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 57-80.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases in penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE. UU. 305 p.
- Lin, C. K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. 12-23. *En*: Hopkins, S. J. (ed.). *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE. UU. 1323 p.
- Luna, G.A. 2009. Tratamiento biológico contra virus de la mancha blanca en camarón. Resultados de proyectos. *Rev. de la Fundación Produce Sinaloa, A.C. México*. 18 p. Disponible en: www.fps.org.mx.
- Montoya, N. 2002. Análisis de residuos de cloranfenicol y nitrofuranos. *Cenaim Informa. Boletín Informativo N° 70*. Disponible en web: <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/quincenal/bquinc70.pdf>

- Moriarty, D. 1976. Quantitative studies on bacteria and algae in the food of the mullet *Mugil cephalus* L. and the prawn *Metapenaeus bennetae* (Racck y Dall). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 22:131-143.
- Moriarty, D. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. 217-222. En: Lesel, R. (Ed.). Microbiology in poecilotherms. Elsevier, Amsterdam. 282 p.
- Moriarty, D. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. 237-243. In: Bell, C. R., M. Brylinsky & P. Johnson-Green (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canadá.
- Morales, M. 2000. Principales enfermedades de los langostinos peneidos, en el pacífico mexicano. Rev. Panorama acuícola, 6(1); 54 – 55.
- McCartney, E. 1994. Probióticos: Biorregulación, probióticos y su aplicación en piensos. Boletín agropecuario técnico 2. Concepto de probiótico (2). Jul – Sep. Barcelona, España.
- Paillard, C., F. Le Rox & J. J. Borrego. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquat. Living Resour., 17: 447-498.
- Philippi, A. 1992. Estudios sobre la septicemia bacteriana en langostinos peneidos, con especial referencia a la patogénesis experimental. Tesis de Magister. Universidad Central. Maracay, Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. 180 pp.
- Pizzuto, M. & R. Hirst. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA finger printing. Dis. Aquat. Org., 21: 61-68.
- Pruzzo, C., G. Gallo & L. Canesi. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. Environ. Microbiol., 7 (6): 761-772.
- Quispe, M. & C. Berger. 2005. Evolución de los cultivos intensivos de langostinos peneidos (*Litopenaeus vannamei*) en Perú. Boletín Nicovita. Edición julio-setiembre.

- Ramires, C. 2005. Uso de bacterias lácticas probióticas en alimentación de langostinos *Litopenaeus vannamei* como inhibidoras de microorganismos patogénicos e estimulantes de sistema inmune. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Paraná. Brasil.
- Requena, T. & C. Pelaez. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Rev Española Cienc Tecnol Al., 35(1): 19-44.
- Ruby, E.G., E.P. Greenberg & J.W. Hastings. 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. Applied and Environmental Microbiology, 39: 302-306.
- Sindermann, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish, Vol. 2, 2da Edition. Academic Press, New York.
- Sotomayor, M. 2009. Uso de cepas ácido lácticas como probióticos en sistemas acuícolas. Parte 1. Evaluación *in vitro*. CENAIM. Boletín Informativo No 153. Junio.
- Taylor, H.H. & E.W. Taylor. 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. *In*: Harrison FW, Humes AG (eds) Microscopic anatomy of invertebrates 10. Wiley-Liss, New York, p 203–293.
- Timmons, M. & T. Losordo. 1994. Aquaculture water reuse systems: Engineering design and management. Ed. Elsevier. EE.UU. 333 pp.
- Valenzuela, W., G. Rodríguez & H. Esparza. 2010. Cultivo Intensivo de Langostino Blanco *Litopenaeus vannamei* (BOONE) en agua de Pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. Ra Ximhai, 6(1): 1-8.
- Valle, J., A. Torres, L. San Miguel & G. Haro. 2002. Efecto Timsen sobre la carga de *Vibrios spp.* en el cultivo de langostino. Panorama Acuícola, 8(1): 52-53.
- Vásquez, S., M. Suárez & S. Zapata. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición, 36(1): 64-71.

- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:655-71.
- Villamil, L. & M. Martínez-Silva. 2009. Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de langostino: Reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR*. Dic. 2009. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612009000200009
- Zazueta, P. 2003. Estudio del potencial de cepas del género *Lactobacillus* para usarse como probióticos en lechones. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur, México.

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación geográfica del lugar de obtención de muestras: Estanque 17 del campo Lan Karina de la Empresa Corporación Refrigerados INYSA – Zarumilla – Tumbes (3°28'26.02"S, 80°15'42.54"O)



Anexo 2. Características internas (a) y externas (b) del estanque 17 de cultivo utilizado para la colecta de muestras de langostino.

