



**UNIVERSIDAD ESTATAL
“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

Selección y evaluación de cepas bacterianas probióticas tipo *Bacillus* con actividad antagónica sobre cepas bacterianas patógenas aisladas en *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

DIANA CAROLINA PÁRRAGA SANTOS

TUTOR EXTERNO

A.c. MARIA AUXILIADORA SOTOMAYOR MACÍAS M.S.c.

TUTOR UPSE

Blgo. DANIEL RUILOVA DAVILA M.S.c.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2017

**UNIVERSIDAD ESTATAL
“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

Selección y evaluación de cepas bacterianas probióticas tipo *Bacillus* con actividad antagonica sobre cepas bacterianas patógenas aisladas en *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

DIANA CAROLINA PÁRRAGA SANTOS

TUTOR EXTERNO

A.c. MARIA AUXILIADORA SOTOMAYOR MACIAS M.S.c.

TUTOR UPSE

Blgo DANIEL RUILOVA DAVILA M.S.c

LA LIBERTAD – ECUADOR

2017

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por hechos, ideas, patrimonio intelectual de la misma y resultados expuestos en este trabajo de titulación, le corresponden a Cenaím – Espol y a la Facultad de Ciencias del Mar - Universidad Estatal Península de Santa Elena por su aporte en el desarrollo del artículo

Nombre del estudiante

CI.0926255159

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial, a mi madre Sra. Lourdes Santos y tía Sra. Norma Santos, por su cariño y apoyo incondicional que motivaron a no rendirme en cumplir esta meta importante en mi vida.

Y mis hijos, Thiago y Luana Menéndez por ser mis impulsos a seguir creciendo como ser humano, anhelando ser un ejemplo a futuro para ellos.

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena por sus revisiones en este artículo científico enriqueciéndolos con sus opiniones, a los directivos del Centro Nacional de Investigaciones Marinas por permitirme ejercer el Proyecto de Investigación, labor que fortalecieron mis conocimientos en el campo de Salud Animal –Microbiología y por su guía en la culminación de este estudio importante en el campo de Acuicultura.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Blgo. Richard Duque Marín MSc.

Decano(a)

Blga. Tanya González Banchón

Director(a) de Carrera

Blga. Gregori Casamayor Maria, Ph.D.

Docente de área

Blgo. Daniel Ruilova Dávila MSc.

Docente Tutor

Secretario General

Anexo 1

Tabla 1. Selección de cepas Gram positivas y formadoras de Espora aisladas de cultivo de camarón *P. vannamei* (Zona Taura - Guayas) (Fuente: Párraga D. 2017)

Código	Agar	Tipo de siembra	Origen del aislado	Forma colonia	K(oh) 3%	Tinción	Gram tinción	Catalasa	Forma al microscopio 7 días	Terminación espora
AB1	TSA	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca globosa	+	Diplobacilo largo	+	+	Bacilos de 2 cadenas	Central
AB3	TSA	Vacío no autoclavado	Sedimento	Redonda translúcida	+	Bacilo largo cadena 4 a+	+	+	Bacilos de 2 cadenas	Terminal
AB5	TSA	Vacío no autoclavado	Sedimento	Naranja clara redonda	+	Bacilo largo cadena 2 a +	-	-	Bacilos de 2 a 4 cadenas	Central
AB7	TSA	Vacío- autoclavado	Sedimento	Naranja oscura redonda	+	Bacilo largo cadena 2	+	+	Bacilos de 2 cadenas	Central
AB8	TSA	Vacío- autoclavado	Sedimento	Naranja clara redonda	+	Bacilo largo cadena 2 a 4	+	+	Bacilos de 2 a 3 cadenas	Central
AB10	TSA	Vacío- autoclavado	Sedimento	Blanca redonda translúcida pequeña	+	Bacilo largo cadenas y bacilos	+	-	Bacilos de 2 a 4 cadenas	Central
AB11	TSA	Vacío- autoclavado	Sedimento	Blanca translúcida grande	+	Contaminado	-	-	Bacilos de 3 cadenas	Central
AB12	LB	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca redonda grande	+	Bacilos muy largos en cadenas	-	+	Bacilos de 3 cadenas	Central
AB15	LB	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca translúcida	+	Bacilos cortos cadenas 2	-	+	Bacilos de 2 cadenas	Central
AB16	LB	Vacío no autoclavado	Sedimento	Crema redonda grande	+	Cadenas largas 2 a3	+	+	Bacilos de 2 cadenas	Central
AB17	LB	Vacío- autoclavado	Sedimento	Blanca redonda	+	Bacilos largos cadena 2	-	+	Bacilos de 3 cadenas	Terminal
AB20	TSA	Vacío no autoclavado	Sedimento	Naranja oscura redonda	+	Bacilos largos cadena 2	+	-	Bacilos de 3 a 4 cadenas	Central
AB23	TSA	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca redonda convexa	+	Bacilos largos cadena 2 a 4	+	+	Bacilos de 2 cadenas	Central
AB26	LB	Vacío- autoclavado	Sedimento	Translúcida redonda	+	Bacilos largos cadena 2 a 4	+	-	Bacilos de 2 cadenas	Central
AB28	LB	Vacío- autoclavado	Sedimento	Crema rugosa centro oscuro	+	Bacilo largo cadena 2	+	+	Bacilos de dos cadenas	Terminal
AB33	LB	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca irregular	+	Bacilo cadena 2	+	+	Bacilos de 2 o 3 cadenas	Terminal
MRS3	MRS	Superficie	Intestinos	Blanca redonda regular	+	Bacilos cortos cadenas 2	-	-	Bacilos cadenas de 3	Terminal
MRS5	MRS	Superficie	Intestinos	Crema redonda	+	Bacilo doble cadena	+	+	Bacilos largos	Terminal
MRS6	MRS	Superficie	Intestinos	Blanca redonda	+	Bacilos pequeños cadena 2	+	-	Bacilos largos de 2 cadenas	Terminal
MRS11	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Plana pequeña	+	Bacilos largos cadena 2	+	+	Bacilos largos 2 cadenas	Terminal
MRS13	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca plana redonda	+	Bacilos doble cadena	+	+	Bacilos largos	Terminal
MRS14	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Crema globosa grande	+	Bacilos largos cadena 2	+	+	Bacilos cadenas de 2	Terminal
MRS15	MRS	Vacío- autoclavado	Sedimento	Plana alargada	+	Bacilos largos cadena 2	+	+	Bacilos cadenas de 2 o 3	Terminal
MRS17	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca redonda pequeña	+	Forma estresado bacilar	-	+	Bacilos cadenas de 3	Terminal
MRS18	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Crema pequeña	+	Bacilos cortos y largos	+	+	Bacilos cadenas de 2 o 3	Terminal
MRS19	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Crema redonda convexa	+	Bacilos cortos	+	+	Bacilos cadenas de 2 o 3	Terminal
MRS20	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Plana alargada	+	Bacilos	+	+	Bacilos cadenas de 3	Terminal

Tabla 2. Selección de cepas Gram positivas y formadoras de Espora aisladas de Policultivo de camarón *P. vannamei* y *Oreochromis spp* (Zona Palmar- Sta. Elena) (Fuente: Párraga D. 2017)

Código	Agar	Tipo de siembra	Origen del aislado	Forma colonia	K(oh) 3%	Tinción	Gram tinción	Catalasa	Forma al microscopio 7 días	Terminación espora
PMRS1	MRS	Superficie	Intestino	Rugosa plana	+				bacilos 2 cadenas 2	Central
PMRS3	MRS	Superficie	Intestino	Crema rizoide	+				bacilos largos cadena 3a 4	Central
PMRS4	MRS	Superficie	Intestino	Blanca convexa	+				streptococcus bacilos largos cadena 3	Central
PMRS7	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Rosado nucleado	+				bacilos largos cadena 2 a 3	Central
PMRS8	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Plano traslucido grande	+				bacilos largos cadena 2 a 3	Terminal
PMRS12	MRS	Vacío no autoclavado	Sedimento	Crema rizoide	+				bacilos cadena 2 a 3	Terminal
PMRS14	MRS	Superficie Vacío	Intestino	Blanca rizoide	+				bacilos cadena 2 a 3	Terminal
PMRS16	MRS	Vacío autoclavado	Sedimento	Rosado nucleado	+				bacilos largos cadena 6 a 8	Central
PMRS17	MRS	Vacío autoclavado	Sedimento	Blanco rugoso	+				bacilos 4 cadenas	Central
PMRS19	MRS	Vacío autoclavado	Sedimento	globoso irregular	+				bacilos cortos cadena 2	Central

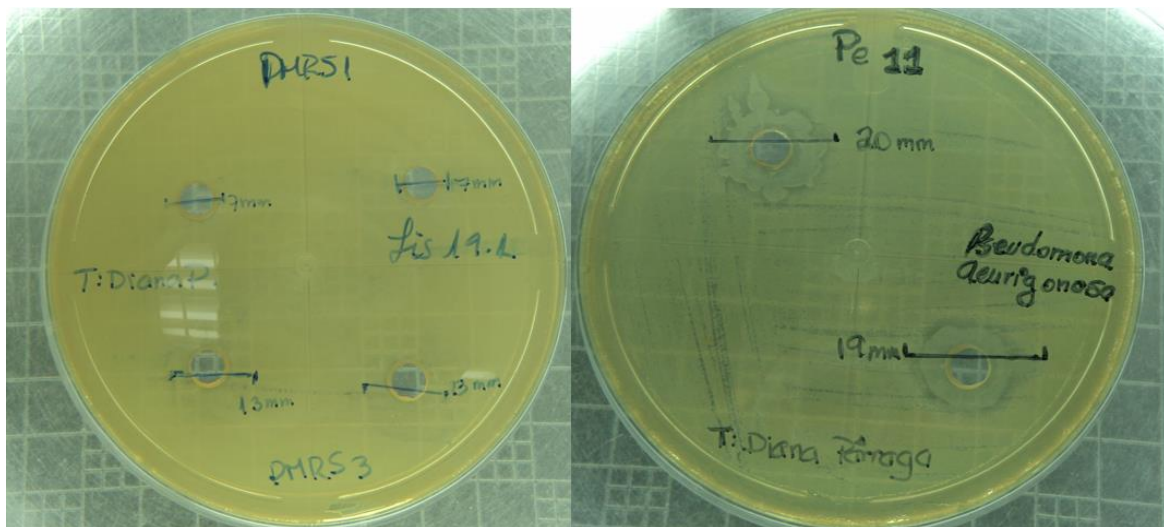
Tabla 3. Selección de cepas Gram positivas y formadoras de Espora aisladas de Reserva marina de El Pelado (REMAPE, Santa Elena) (Fuente: Párraga D. 2017)

Código	Agar	Tipo de siembra	Origen del aislado	Forma colonia	K(oh) 3%	Tinción	Gram tinción	Catalasa	Forma al microscopio 7 días	Terminación espora
Pe9	Mrs	Vacío no autoclavado	Sedimento	Traslucida plana	+				bacilos largos, 2 cadenas	Central
Pe11	Mrs	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca irregular rizoide	+				bacilos largos, 2 cadenas	Central
Pe13	Mrs	Vacío no autoclavado	Sedimento	Blanca plana	+				bacilos cortos, 2 a 3 cadenas	Central
Pe17	Tsa	Vacío autoclavado	Sedimento	Traslucida plana irregular	+				bacilos largos, 2 cadenas	Central
Pe19	Lb	Vacío autoclavado	Sedimento	Blanca irregular	+				bacilos largos, 2 a 3 cadenas	Central
Pe21	Mrs	Vacío autoclavado	Sedimento	Blanca plana	+				Bacilos cortos, 2 cadenas	central

Tabla 4. Selección de cepas *Bacillus sp.*, e identificación taxonómica Bioquímica Api 50CHB V 4.0 (Fuente: Parraga D. 2017)

Código	Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra				
Pe 11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.9	0.81	ARB 97%	TUR 80%	LAC 23%		
Pmrs 19	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.5	0.44	RIB 97%	TUR 75%	DXYL87%	GAL75%	AMY 99%
Mrs 13	<i>Bacillus lentus</i>	94.6	0.23	MDG 3%		INU 1%	TAG 0%	
Mrs 11	<i>Bacillus micoydes</i>	69.5	0.86	MNE 4%	CEL 88%	SAL 24%		

Foto 1. Medición de halos inhibitorios bajo el Método Depósito en pozo (Cepas potenciales Probióticas /Cepas patógenas) (Fuente: Parraga D. 2017)



Fotos 2, Análisis Microbiológico de muestras de camarón en medios de cultivo TSA (caldo Tripticasa de Soya) y TCBS (Fuente: Parraga D. 2017)

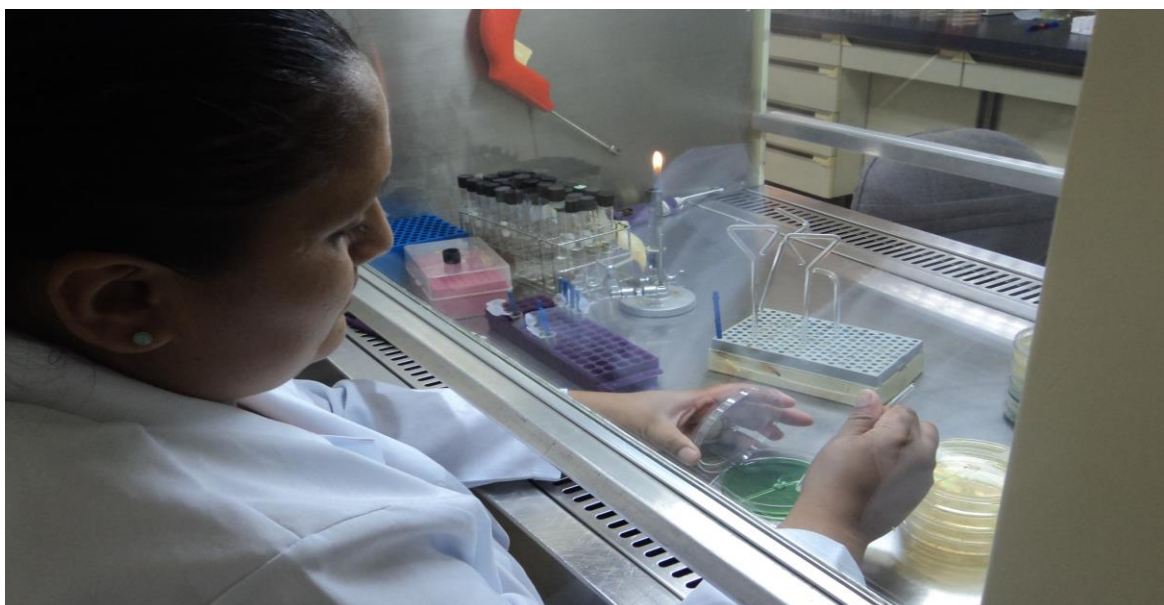
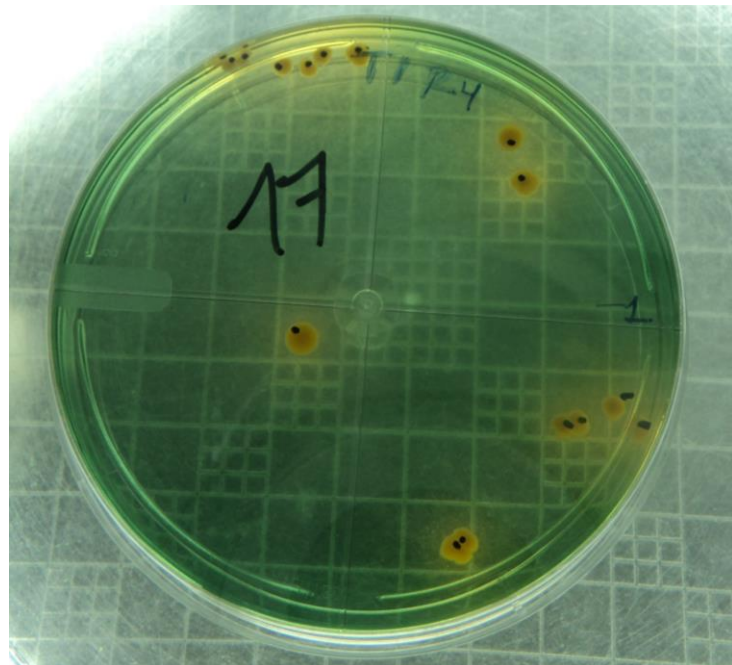


Foto 3. Prueba de Toxicidad en Post larva de camarón *P. vannamei*. (Sala Experimentación 1) (Fuente: Párraga D. 2017)



Foto 4. Análisis de desplazamiento de agentes patógenos en Agar TCBS posterior a la aplicación de los tratamientos (Fuente: Párraga D. 2017)



Selección y evaluación de cepas bacterianas probióticas tipo *Bacillus* con actividad antagonica sobre cepas bacterianas patógenas aisladas en *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

Diana Párraga

^a Universidad Estatal Península de Santa Elena, UPSE, Facultad de Ciencias del Mar, FCM, Vía Santa Elena-La Libertad, P. O. Box 09-11-16459, La Libertad, Ecuador

Resumen

La búsqueda de nuevos probióticos para el control de enfermedades bacterianas en cultivo de camarones *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en Ecuador es una prioridad para reducir el impacto del uso de antibióticos en la industria acuícola. Se colectaron muestras de sedimento e intestinos de juveniles sanos *P. vannamei* en estanques de cultivo y policultivo (camarón/tilapia), y sedimento de la reserva marina "El Pelado". Se obtuvieron 43 aislados de tipo *Bacillus* spp. Gram positivos y formadores de esporas, siendo evaluados in vitro frente a tres patógenos (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *Pseudomonas aeruginosa*). Dada la mayor capacidad antagonica conjunta contra los tres vibrios, se seleccionaron tres cepas potencialmente probióticas (Pe11, Pmrs19 y Mrs13), identificadas taxonómicamente como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus lentus*, respectivamente. Las tres cepas mostraron ser inocuas al ser administradas vía inmersión en postlarvas de camarón (PL 30). Las cepas Pe11 y Mrs13 mostraron además una mayor capacidad colonizadora y desplazamiento de *Vibrios* spp. La identificación de potenciales probióticos formulados con cepas bacterianas autóctonas contribuirá a mitigar los impactos negativos de las enfermedades bacterianas en Ecuador.

Palabras claves: Probióticos, *Bacillus* spp., antagonismo, toxicidad, patógenos

ABSTRACT

The search of new probiotics for the control of bacterial diseases in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* cultures in Ecuador is a priority to reduce the impact of the use of antibiotics in the aquaculture industry. Sediments and intestines were collected from healthy juveniles *P. vannamei* in culture and polyculture ponds (shrimp/tilapia), and sediment from El Pelado marine reserve. Fourty-three *Bacillus* spp isolates, Gram positives and spore forming were obtained and evaluated in vitro against three pathogens (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. campbellii* and *Pseudomonas aeruginosa*). Given the high antagonistic capacity against the three vibrios, three potentially probiotic strains (Pe11, Pmrs19 and Mrs13), taxonomically identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus lentus*, respectively, were selected. All three strains showed to be safe to be administered via immersion in shrimp postlarvae (PL30). The strains Pe11 and Mrs13 also showed a greater colonizing capacity and displacement of *Vibrios* spp. The identification of potentials probiotic formulated with autochthonous bacterial strains will help to mitigate the negative impacts of bacterial diseases in Ecuador.

Key words: Probiotics, *Bacillus* spp., antagonism, toxicity, pathogens

1. Introducción

El cultivo de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* es una de las principales actividades económicas del país, generando múltiples empleos y divisas. La industria experimentó una recuperación después de la quiebra ocasionada por el impacto del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), detectado en el Ecuador en 1989. De tal forma que, las exportaciones de los últimos 6 años han experimentado un crecimiento ascendiendo en 2016 a 800.454.741 millones de libras (CNA, 2017). A pesar de las altas producciones, el riesgo de ocurrencia de epidemias ocasionadas por patógenos de origen viral y bacterial es alto. Actualmente uno de los patógenos emergentes más importante es la bacteria que provoca la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) anteriormente conocida como síndrome de la mortalidad temprana (EMS), causada por diversos géneros de *Vibrios* (*V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. owensi*), destacando al *V. parahaemolyticus* como el principal causante de esta enfermedad. Estas bacterias portan un plásmido que codifica la producción de una toxina con capacidad de producir toxinas letales para los penaeidos (Han, Mohney, Tang, Pantoja, & Lightner, 2015). Los países más afectados han sido Asia y México, con pérdidas económicas particularmente altas (CITAS). En Ecuador se han registrado enfermedades causadas por *Vibrio* que han generado grandes pérdidas económicas y una disminución significativa y de puestos de trabajo relacionados con el cultivo de camarones (Morales-Covarrubias, Ruiz-Luna, Pereira Moura-Lemus, Solis Montiel, & Conroy, 2011). En 1980, la epidemia del Síndrome de la Gaviota, causada por diferentes especies de *Vibrio* oportunistas asociados a situaciones de estrés del camarón, causó altas mortalidades y grandes pérdidas económicas para el país (Lightner, y otros, 1992).

Para el control de las enfermedades causadas por vibrios se han utilizado antibióticos indiscriminadamente, provocando la aparición de cepas multiresistentes (National Institutes of Health, 2008) generadas a partir de la capacidad de las bacterias de adquirir genes de resistencia o plásmidos de otras bacterias o del medio. Ante esto la Comunidad Europea respondió prohibiendo la aplicación de antibióticos como promotores del crecimiento así como tratamientos para infecciones bacterianas en veterinaria (CE, 2003). Tal política, se extendió posteriormente a los principales importadores a nivel mundial propiciando el desarrollo de tratamientos amigables con el ambiente, como el uso de probióticos por ser microorganismos vivos capaces de controlar y prevenir enfermedades de tipo bacteriano.

En este sentido, se han descubierto determinadas bacterias como *Vibrio alginolyticus* (Morales, 1992), *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. (Díaz Palacios & G., 2012), *Bacillus S11* (Rengipat, 2003), *L. plantarum* (Chiu, 2007), *L. acidophilus* (Sivakumar, Sundararaman, & Selvakumar, 2012), *Streptococcus phocae* (PI80), *E. faecium* (MC13) (Swain, Singh, & Arul, 2009) y *Pseudomonas* (Chythanya, Karunasagar, & Karunasagar, I., 2002), consideradas beneficiosas ya que son capaces de controlar los problemas ocasionados por vibriosis en los cultivos de *Penaeus monodon*, *P. vannamei* y otros *Penaeidos*. Morales, (1992) ya validó, en Ecuador, la capacidad probiótica y/o inmunoestimulante de algunas cepas autóctonas como Ili (*V. alginolyticus*), P62 (*V. hepatarius*), P63 (*Vibrio* sp.). Gullian & Rodríguez, 2002 y Cedeño 2009 validaban el P64 (*Bacillus* sp.) y el Inv-165 e Inv-116 (*Bacillus* sp.) respectivamente. De entre las cepas más utilizadas como probiótico en el camarón de cultivo pertenecen al género *Bacillus* spp. Su uso en campo ha permitido controlar la incidencia de vibriosis aumentando la supervivencia en fases de zoea, mysis y postlarvas (Dalmin, G, Kathiresan, K, & Purushothaman, A., 2001; Silva, y otros, 2012). Vaseeharan & Ramasamy, 2003 demostraron la eficacia de *B. subtilis*-BT23 frente a *V. harveyi*. Otros *Bacillus* como *B. subtilis* UTM126 (Bálcazar & Rojas Luna, 2007), *B. subtilis* E20 no solo controlan vibriosis sino también son productores de proteasas aumentando la digestibilidad de alimentos en el camarón (Liu, Chiu, Ho, & Wang, 2009) y *B. megaterium* con propiedades alimentarias (Zhang Q. , y otros, 2011).

Una de las características principales de estas bacterias Gram positivas es la baja probabilidad de intercambio genético entre especies y la transferencia de información por medio de plásmidos (Cuevas Tominaga, 2008). Por tanto, el uso de probióticos de tipo *Bacillus* es particularmente apropiado para mitigar los problemas originados por AHPND. Otra de las ventajas de los *Bacillus* spp., es que influyen positivamente sobre el crecimiento y porcentaje de supervivencia del camarón (Kumar, 2016).

El objetivo de este estudio fue identificar *in vitro* cepas bacterianas autóctonas del Ecuador tipo *Bacillos* sp., con actividad antagonista y probiótica sobre cepas bacterianas patógenas que mitigue los impactos negativos de los problemas causados por enfermedades de origen por vibrios en el Ecuador en los cultivos de *P. vannamei*

2. Diseño muestral

2.1 Recolección y procesamiento de muestras

El muestreo se realizó en tres ambientes geográficos: tanto en estanques de cultivo de camarón *P. vannamei* (Taura, Guayas, Ecuador), y policultivo de camarón *P. vannamei* y tilapia *Oreochromis spp.*, con ubicación geográfica: 02°01'23.9"S -80°44'02.28"W. (Palmar, Santa Elena, Ecuador), y como en el medio natural de la Reserva marina El Pelado con ubicación geográfica: 01°55'53"S - 80°46'55"W (REMAPE, Santa Elena, Ecuador)

Los estanques de cultivo de camarón *P. vannamei* se seleccionaron en base a la alta producción registrada con escaso uso de probióticos. Se colectaron un total de 5 camarones juveniles sanos (peso promedio de 13 gramos) por piscina.

Las muestras de sedimentos fueron constituidas de 5 submuestras se recogieron siguiendo el protocolo propuesto por SENASA (SENASA, 2012) procedentes del centro y de las cuatro esquinas de los estanques.

La muestra de sedimento marino colectada en la REMAPE estuvo constituida por cinco sub-muestras (INTA -COSTA RICA, 2015), extraídas mediante buceo a una profundidad de 15 m.

Se procesaron las muestras en el laboratorio de microbiología del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIME, Santa Elena, Ecuador), en el cual se extrajeron los intestinos de cada camarón (n=100) y fueron también pesados y lavados con solución salina (2%), para proceder a su dilución. Por otra parte, las sub-muestras de sedimento se pesaron por duplicado y se diluyeron en una proporción de 100 g de sedimento en 900 mL de solución salina (¿concentración?). Una vez preparadas las submuestras se realizaron tres diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} en solución salina (2%). Las muestras se sembraron mediante vertido en placa (sedimento) y superficie (intestinos) en los en tres diferentes medios de cultivo Tripticosa Soya (TSA), Luria Bertani (LBA) y Man Rogosa y Sharpe (MRSA), e incubadas a 30°C (TSA, LBA) y 37°C (MRSA) en el equipo Incubadora Thermo Scientific. Se utilizó anaerobiosis por 3 días para las muestras sembradas en agar MRS. Sólo una réplica de sedimento por muestreo fue autoclavada (SQ500C Yamato) por un minuto a 115 °C para la obtención de aislados más específicos

Se diferenciaron distintas cepas bacterianas atendiendo a criterios morfológicos obteniendo 104 aislados en caldo Tripticosa Soya (TSB) modificado al 2% de cloruro de sodio y 20% de glicerol que se congelaron a -80 °C (Ruiz, Roman, & Sánchez JL, 1996) (Tabla 1). Para la selección de las cepas del género *Bacillus spp.*,

se comprobó la reactividad en medio TSA usando tres criterios: (1) bacterias Gram positivas; (2) bacterias con forma bacilar; y (3) bacterias formadoras de esporas. La forma y la estructura de la pared celular se evaluó mediante la tinción de Gram utilizando cultivos de hasta 24 horas de crecimiento. Sólo los aislados Gram positivos fueron envejecidos por 5 días para la observación de esporas al microscopio.

2.2. Pruebas de antagonismo con cepas patógenas

Las cepas de *Bacillus spp.*, fueron utilizadas en pruebas in vitro de antagonismo frente a tres cepas patógenas de camarón: *Vibrio parahaemolyticus* (C15.17.5), *V. campbellii* (L15.19.1) y *Pseudomonas aeruginosa* (L16.56.2) obtenidas del cepario de patógenos de CENAIME. Como controles se usaron las cepas probióticas desarrolladas en CENAIME como *Bacillus subtilis* (P64) y *Bacillus sp.* (Invernadero 116)(Gullian & Rodríguez, 2002; Cedeño, 2009). El antagonismo de las cepas se determinó utilizando el método de probiótico depositado en pozo, para lo que tanto las cepas probióticas como las patógenas se activaron en agar TSA e incubaron durante 24 horas a 30 °C. Las cepas patógenas fueron transferidas a caldo TSB e incubadas por 4 horas (Taroco, 2006) para posterior estandarización a la concentración de 10⁶ bacterias mL⁻¹, siguiendo el patrón de McFarland 0.5 y siembra por duplicado en placas con agar TSA mediante hisopado. Dos colonias (2 mm diámetro) de cada cepa probiótica y patógena se transfirieron a 5 mL de medio TSB, e incubadas a 30 °C en baño maría por 4 horas. Posteriormente las cepas patógenas fueron sembradas por hisopado en agar TSA (siembra por duplicado). El agar TSA se perforó (5 mm de diámetro) para depositar 10⁶bacterias mL⁻¹ (probiótico) por duplicado, previamente activados en medio líquido (20 µL). Las placas se incubaron durante 48 h a 28 °C tras lo cual se realizó la lectura de los diámetros de halos de inhibición. Para determinar las diferencias entre los halos de inhibición entre patógenos se aplicó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Kruskal-Wallis. Para determinar diferencias en el diámetro de los halos de inhibición entre patógenos se aplicó la prueba de Nemenyi, con una aproximación de Chi-cuadrado.

2.3. Selección de cepas *Bacillus spp.*, por intensidad de inhibición de patógenos e identificación taxonómica.

Para cada cepa, se calculó el promedio ponderado del diámetro de inhibición, utilizando los valores obtenidos con las pruebas de antagonismos con los 3 patógenos. Se asignaron las ponderaciones de 2, 1 y 1 a las cepas *Vibrio parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *P. aureginosa*, respectivamente. Siendo la más alta para *V. parahaemolyticus* ya que las

mortalidades observadas en pruebas de patogenicidad previamente realizadas fueron muy superiores a los otros dos patógenos. El 10 % (percentil 90) de las cepas con mayor diámetro promedio ponderado de inhibición se escogieron para las pruebas de toxicidad de probióticos. Estas cepas fueron identificadas taxonómicamente con el kit bioquímico API® 50 CHB (bioMérieux), a fin de descartar especies no aptas para usos agropecuarios y alimenticios.

2.6 Prueba *in vivo* de toxicidad de probióticos

La inocuidad de las cepas seleccionadas se evaluó realizando pruebas *in vivo* de toxicidad en postlarvas (PL) PL30 de *Penaeus vannamei* con un peso promedio de 0.07 g, provenientes de la Estación Experimental de CENAIM. Las postlarvas fueron distribuidas aleatoriamente en acuarios de vidrio con 2 L de agua de mar filtrada y esterilizada con UV, a una densidad de 25 PL L⁻¹. Éstas se sometieron a diferentes tratamientos: (i) cada una de las 3 cepas probióticas seleccionadas fueron aplicados de forma individual T1(Pe11), T2 (Pmrs19), T3 (Mrs13); (ii) en combinación de dos probióticos T4 (Pe11+Pmrs19), T5 (Pe11+Mrs13) y T6 (Pmrs19+Mrs13) y (iii) en combinación de tres probióticos T7 (Pe11+Pmrs19+Mrs13), cada tratamiento tuvo 4 réplicas incluyendo un control negativo (sin aplicación de probiótico).

La aplicación de los probióticos se realizó diariamente (8días) por inmersión, a una concentración 10⁵ UFC mL⁻¹, durante ocho días consecutivos con recambio diario de agua del 50 %. Las postlarvas fueron alimentadas al 2% de la biomasa con balanceado (28% de proteína). La supervivencia fue estimada diariamente. Las larvas cosechadas fueron analizadas microbiológicamente para determinar su carga bacteriana total y la carga de Vibrios. Se estimó la colonización de los probióticos en las larvas mediante morfología diferenciada en agar TSA al 2% de cloruro de sodio, siendo expresada en porcentaje (UFC del probiótico/UFC de aerobios totales). Se utilizó una ANOVA (95%) para determinar diferencias significativas en la supervivencia de las para larvas en función del tratamiento aplicado.

3. Resultados

3.1 Aislamiento de bacterias y selección de *Bacillus* spp.

Según criterios morfológicos se encontraron 104 cepas bacterianas diferentes (Tabla 1). El 46, 34 y 20% de las cepas provinieron de los estanques de camarón, policultivo y REMAPE, respectivamente (Tabla 1). Cuarenta y tres cepas fueron identificadas como *Bacillus* sp. El mayor porcentaje de *Bacillus* sp., se encontró en los estanques monocultivo de camarón

(63%), mientras que, el resto se encontraron en los estanques de policultivo y ambiente marino en un 23% y 14% respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Fuentes de las cepas bacterianas, bacterias aisladas y *Bacillus* sp., seleccionadas

Fuentes de cepas bacterianas	Número de cepas aisladas	Aislados <i>Bacillus</i> spp. seleccionadas	Procedencia
Estanques de monocultivo ¹	48	27	(3 intestinos y 24 sedimento)
Estanques de policultivo ²	35	10	(4 intestinos y 6 sedimento)
Reserva Marina El Pelado (REMAPE)	21	6	(6 sedimento)
Total	104	43	43

3.2. Pruebas de antagonismo con cepas patógenas

El tamaño de los halos de inhibición causado por los probióticos mostró un efecto significativo sobre el patógeno (P = 0.000), siendo el diámetro de inhibición para la cepa *V. parahaemolyticus* significativamente inferior que el observado para *V. campbellii* (P = 0.000) y *P. aureginosa* (P = 0.000, Tabla 2). No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los halos de inhibición entre las cepas *V. campbellii* y *P. aureginosa* (P = 0.178) (Fig.1 y Tabla 2).

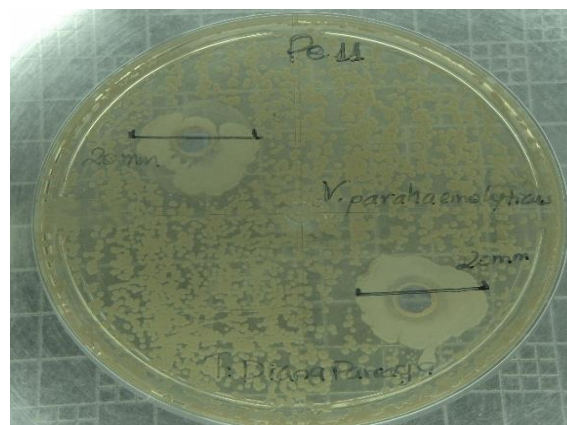


Fig. 1. Antagonismo *V. parahaemolyticus* código interno C15.17.5 y cepa probiótica Pe11 (autor: Parraga D.)

¹ Monocultivo *Penaeus vannamei*.

² *P. vannamei* y *Oreochromis* spp.

Tabla 2. Promedio de los tamaños de los halos de inhibición (\pm desviación estándar) frente a patógenos. Los subíndices indican resultados estadísticamente significativos con valor $P < 0.05$, basado en las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y comparación de pares de tratamientos de Nemenyi

Patógeno	Diámetro de halos de inhibición (mm)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8.1 \pm 3.4 ^a
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9.5 \pm 1.8 ^b
<i>Vibrio campbellii</i>	9.2 \pm 2.7 ^b

3.3. Selección de cepas *Bacillus* sp., por intensidad de inhibición de patógenos e identificación taxonómica

De las 43 de cepas de *Bacillus* spp. identificadas cuatro presentaron un promedio ponderado de diámetro de halo de inhibición superior al percentil 90 (10.70 mm), y por tanto fueron consideradas más eficaces disminuyendo la actividad de los patógenos (Tabla 3). Estas cuatro cepas fueron aisladas de los distintos sitios muestreados (i) la cepa aislada de sedimento marino (Pe11), se identificó como *B. amyloliquefaciens* y presentó el mayor promedio ponderado de halos de inhibición y los mayores tamaños de halos de inhibición individual para *V. Parahaemolyticus* y *V. campbellii*; (ii) la cepa Pmrs19, identificada como *B. licheniformis*, aislada del estanque de policultivo, presentó el segundo mayor promedio ponderado de halos de inhibición que actuó más eficazmente al patógeno *V. parahaemolyticus* y en menor medida a *P. aeruginosa* (Tabla 3); (iii) las cepas Mrs13 y Mrs11 (*B. lentus* y *B. micoyde*), procedentes de monocultivo, presentaron el tercer y cuarto mayor promedio ponderado de halo de inhibición (Tabla 3).

Solamente las cepas *B. amyloliquefaciens* (Pe11), *B. licheniformis* (Pmrs19) y *B. lentus* (Mrs13) fueron consideradas para las pruebas *in vivo* de toxicidad de probióticos ya que resultaron ser inocuas para uso agropecuario y humano, a excepción de *B. micoyde* considerada como patógeno humano.

La identificación taxonómica de las cepas se realizaron con el kit API® 50 CHB (bioMérieux).

Tabla 3. Selección de Cepas *Bacillus* spp., en base al promedio ponderado del diámetro de los halos de inhibición sobre tres patógenos: *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa* y *Vibrio campbellii*, ponderados con los valores de 2, 1 y 1, respectivamente.

Código de la cepa	Origen de la cepa	Especie	Diámetro de halos de inhibición (mm)			
			<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. campbellii</i>	Promedio ponderado
Pe11	Sedimento marino	<i>B. amyloliquefaciens</i>	19	8	19	16,3
Pmrs19	Policultivo	<i>B. licheniformis</i>	20	9	10	14,9
Mrs13	Camaronera	<i>B. lentus</i>	13	12	9	11,8
Mrs11	Camaronera	<i>B. micoyde</i>	12	12	8	10,8

3.4. Experimento *in vivo* de toxicidad de probióticos

Los tratamientos suministrados individualmente: T1 (Pe11), T2 (Pmrs19), T3 (Mrs13); y en combinación de 2 probióticos: T4 (Pe11+Pmrs19), T5 (Pe11+Mrs13) y T6 (Pmrs19+Mrs13) mostraron ser inocuas para camarón *P. vannamei* a la concentración 10^5 UFC mL⁻¹, excepto el tratamiento donde se combinaron las 3 cepas Pe11, Mmrs19 y Mrs13, que desde el primer día de experimentación presentaron mortalidades (Figura 1). La supervivencia de las larvas con la cepa Mrs13 (*B. lentus*) fué menor desde el día 4 de experimentación, comparado con los demás tratamientos (Figura 1). Sin embargo no fue suficiente para ver diferencias significativas al 95% de confianza (Tabla 4).

Al final de la experimentación, no se encontraron diferencias significativas entre los 6 tratamientos y el control ($P > 0.054$), excepto el tratamiento 7 donde se combinaron las 3 cepas (*B. amyloliquefaciens*,) (*B. licheniformis*) y *B. lentus*) que mostraron una supervivencia significativamente menor, comparada con el control ($P = 0.036$) (Tabla 4). Los tratamientos T1 (Pe11), T2 (Pmrs19), T4 (Pe11+Pmrs19), T5 (Pe11+Mrs13) y T6 (Pmrs19+Mrs13) presentaron una supervivencia promedio de 97.5 ± 3.0 %, lo cual representa solamente el 1% de diferencia con respecto al control, al que no se le aplicó ninguna bacteria (supervivencia = 98.5%, Tabla 4).

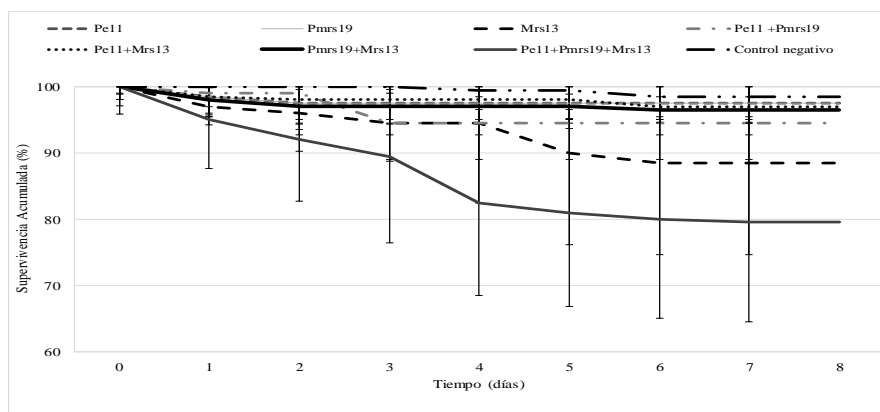


Figura 2. Supervivencia acumulada de postlarvas *P. vannamei* PL30 observada en el experimento *in vivo* de toxicidad de probióticos.

Tabla 4. Supervivencia de postlarvas *P. vannamei* PL30 al finalizar la prueba de toxicidad de potenciales probióticos. Promedios (\pm desviación estándar) con distintas letras son significativamente diferentes a $P < 0.05$, basado en el análisis de ANOVA y prueba de comparación de pares de tratamientos de Tukey.

Tratamientos	Supervivencia (%)
T1: Pe11	97.5 \pm 3.0 a, b
T2: Pmrs19	97.5 \pm 2.5 a, b
T3: Mrs13	88.5 \pm 13.9 a, b
T4: Pe11 + Pmrs19	94.5 \pm 5.5 a, b
T5: Pe11 + Mrs13	97.0 \pm 2.6 a, b
T6: Pmrs19 + Mrs13	96.5 \pm 1.9 a, b
T7: Pe11 + Pmrs19 + Mrs13	79.5 \pm 15 a
Control sin bacterias	98.5 \pm 3.0 b

Las cepas Pe11 (*B. amyloliquefaciens*) y Mrs13 (*B. lentus*) reportaron la mayor colonización de las bacterias al finalizar el experimento (Tabla 5). Las otras cepas administradas en forma individual y combinada presentaron una baja colonización (Tabla5).

Tabla 5. Colonización de los probióticos en larvas *P. vannamei* al finalizar la prueba de toxicidad de potenciales probióticos, estimada mediante morfología diferenciada en agar TSA.

Tratamientos	Colonización (%)
Pe11	64
Pmrs19	9
Mrs13	70
Pe11 + Pmrs19	4
Pe11 + Mrs13	16
Pmrs19 + Mrs13	5
Pe11 + Pmrs19 + Mrs13	3
Control sin bacterias	0

4. Discusión

En la búsqueda de potenciales probióticos usando cepas de *Bacillus* spp., se observó que los sedimentos de las piscinas de camarón y de policultivo presentaron mayores aislados de tipo bacilar, en comparación con el sedimento marino. Posiblemente la baja incidencia humana en el ambiente marino (contaminación) de la reserva marina El Pelado disminuye la proporción de este tipo de organismos y privilegia la predominancia de otras especies bacterianas. En general, las especies aisladas en los tres sitios de muestreo presentaron diferentes comportamientos antagónicos contra especies patógenas. Así, la cepa más antagónica fue aquella recuperada de la reserva marina El Pelado.

Las cepas Pe11 (*B. amyloliquefaciens*), Pmrs19 (*B. licheniformis*) y Mrs13 (*B. lentus*) se evaluaron (en forma individual y conjunta) en postlarvas de camarón *P. vannamei*, a fin de descartar efectos tóxicos donde se excluyó cepas como Mrs11 (*B. mycoide*) por ser considerada organismo de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). Sin embargo, para descartar completamente la cepa como potencial probiótico es necesario realizar la identificación taxonómica mediante secuenciación del gen ARN ribosomal 16s, así como la evaluación toxicológica del organismo excluido, pues en contraparte a las regulaciones mencionadas, existen estudios que recomiendan el uso *B. mycoide* en cultivos de *Cherax cainii* (Ambas, Fotedar, & Buller, 2015).

Es importante destacar las bondades de las especies encontradas. Por ejemplo, la bacteria *B. amyloliquefaciens* se caracteriza por presentar un rápido crecimiento dentro de sistemas con bioflóculos, además de incrementar los mecanismos de defensa del sistema inmune y la supervivencia en camarones *P. vannamei* (Prentu, 2016). Esta condición puede ser explicada por la pared de lipopéptidos, de acción antibacteriana a *Vibrios* spp., multiresistentes (Xu, Rong, Zhao, Song, & Chi, 2014). En tal sentido, ha sido utilizado contra infecciones de *Aeromonas*

hydrophila en peces como la *Anguilla anguilla* (Cao, He, Wei, Diong, & Lu, 2011). En tanto que, las bacterias *B. licheniformis* es la especie más utilizada y estudiada como probiótico en acuicultura, por ser inmunostimulante celular y enzimático en *P. vannamei* y *C. sikamea* (Sánchez Ortiz, 2015). Se ha reportado además que esta especie mejora la salud intestinal en peneidos (Li, y otros, 2007), (Zhang Q. , y otros, 2011), e incrementa el sistema inmune innato, aumentando la resistencia a enfermedades en *Megalobrama terminalis* (Zhang, y otros, 2013) y mejorando el índice hematológico, y por tanto influyendo positivamente en el crecimiento y asimilación de nutrientes en *Oreochromis niloticus* (Hassaan, Soltan, & Ghonemy, 2014). En el caso de *Bacillus lentus*, no existe referencia sobre su uso como probiótico en acuicultura, sin embargo, es muy estudiada a nivel industrial y veterinario por las componentes celulares que presentan actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogens* (Nivedita, Kapor, & Neopaney, 2006) y *Staphylococcus aureus* (Musliu Abdulkadir, 2012). Siendo su endo-1,4-betamanasa muy utilizada en pollos de engorde bajo la forma de aditivo y por tanto recomendada para uso zootécnico (Reglamento (CE), 2007).

A semejanza de investigaciones previas realizadas con cepas experimentales Ili (*V. alginolyticus*), P62 (*V. hepatarius*), P63 (*Vibrio sp*) validaban el P64 (*Bacillus sp.*) por (Gullian & Rodríguez, 2002), (Cedeño 2009) y (Balcázar J. L., 2002) al utilizarse la concentración 10^5 UFC mL⁻¹ vía inmersión o alimento, respectivamente, no se reportaron mortalidades significativas con las nuevas cepas de estudio. Sin embargo (Sotomayor, 2009) y (Cedeño, 2009) al evaluar cepas ácido-lácticas y *Bacillus sp.* (Inv. 116 e Inv.165) si observaron efectos negativos en la supervivencia de los animales en algunas cepas Gram positivas muy antagónicas *in vitro*, por lo que recomendaron ajustar las concentraciones dependiendo del tipo de probiótico previo a su uso en campo. Con nuestros resultados consideramos que la concentración 10^5 UFC mL⁻¹ utilizada, puede ser aplicable en forma individual, pues se observó una leve mortalidad y una baja exclusión de Vibrios (datos no mostrados) en la combinación con las tres cepas Pe11, Pmrs19 y Mrs13. Posiblemente el alto antagonismo de estas cepas podría causar un sinergismo negativo al usarse en conjunto, lo que hace necesario encontrar la adecuada concentración y proporción entre cepas, a fin de mantener sus características probióticas (Balcázar J. L., 2002).

Además de la supervivencia, nosotros investigamos la recuperación de los Bacillus en los animales post aplicación, siendo el *B. amyloliquefaciens* (cepa Pe11) y el *B. lentus* (cepa Mrs13) los que presentaron mejor colonización, en comparación a los otros tratamientos. Similares niveles de colonización han sido

previamente encontrados en otros estudios (Gullian & Rodríguez, 2002). Sin embargo, las combinaciones mostraron baja colonización, aunque otros estudios han evidenciado un efecto opuesto al que encontramos en nuestro estudio (Balcázar J. L., 2002). Por tanto, es necesario que, para la aplicación de combinaciones de cepas, se optimice la proporción de los integrantes de la mezcla a fin de reducir antagonismo entre ellas. Finalmente, es importante que se realicen estudios posteriores para evaluar el efecto de las cepas estudiadas sobre parámetros de producción en condiciones de campo.

5. Conclusiones

- De un total de 104 aislados tipo “*Bacillus*” se han obtenido 43 aislados con buena actividad antagónica *in vitro* a *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *P. aeruginosa*, siendo la cepa Pe 11 (Islote el Pelado) el aislado con mayor capacidad antagónica *in vitro* frente *V. parahaemolyticus* y *P. aeruginosa*, seguido de Pmrs19(Palmar) y Mrs13 (Aquamar)
- Las cepas bacilares (Pe11, Pmrs 19 y Mrs 13) fueron seleccionadas por su alta capacidad antagonista *in vitro* a *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *P. aeruginosa* en postlarvas de camarón *P. vannamei* demostrando que pueden colonizar y desplazar a Vibrios, sin causar efectos tóxicos en los animales al ser aplicados de forma individual a la concentración 10^5 UFC mL⁻¹.
- La cepa Pe11, aislada del ambiente de la reserva marina El Pelado se perfila como un potencial probiótico a ser usada en los sistemas de cultivo de camarón.
- La obtención de probióticos autóctonos puede ser una herramienta importante para el control efectivo de enfermedades bacterianas en los sistemas de cultivo de camarón del Ecuador.

6. Agradecimientos

El estudio se realizó con financiamiento de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) bajo el marco del proyecto de Investigación PIC-14-CENAIM-003 “Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura o repoblación”. Se agradece el invaluable apoyo del Departamento de Microbiología CENAIM- ESPOL, a la Srta. Ana Ayong por su colaboración a la toma de sedimento marino y al M.Sc Daniel Ruilova, de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), por contribuir con la revisión de este artículo.

7. Referencias

1. (CE), C. E. (14 de Marzo de 2003). *Propuesta y Reglamento del Parlamento Europeo y del consejo sobre los aditivos en la alimentación animal 2002/0073 (COD)*. Recuperado el 25 de Agosto de 2017, de <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TEXT/?uri=CELEX%3A52002AE1014>
2. Ambas, I., Fotedar, R., & Buller, N. (25 de April de 2015). *Bacillus mycoides* Improves Health of Gastrointestinal Tract in Marron (*Cherax cainii*, Austin 2002). *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 2(2).
3. Bálcazar , J., & Rojas Luna, T. (Dec. de 2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). (Springer-Verlag, Ed.) *Current microbiology*, 55(5), 409-412.
4. Balcázar, J. L. (Enero de 2002). *Evaluación de mezclas de cepas probióticas en juveniles de Penaeus vannamei*. Tesis de Pre grado Ingeniero Acuicultor, Universidad Técnica de Machala UTM, Facultad de Ciencias Agropecuarias-Escuela de Acuicultura, Machala.
5. Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M., & Lu, L. (2011). *Bacillus amyloliquefaciens* G1: a potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. (H. P. Corporation, Ed.) *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 111.
6. Cedeño Campuzano, R. (30 de Mayo de 2009). Evaluacion de nuevas cepas probioticas Inv.116 e Inv.165 en el engorde del camaron *Penaeus vannamei*. *CENAIM IMFORMA*(152).
7. Chiu, C. H. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. (A. Press, Ed.) *Fish & Shellfish Immunology*, 23(2), 364-377.
8. Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (31 de May de 2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. (Elsevier, Ed.) *Aquaculture*, 208(1-2), 1-10.
9. CNA. (Abri-Mayo de 2017). Exportaciones de camarón ecuatoriano. *Aquacultura*, 117, 54.
10. Cuevas Tominaga, A. (Julio de 2008). *Importancia de los plásmidos en la transferencia de resistencia a los antimicrobianos*. Universidad Veracruzana, Facultad de Bioanálisis.
11. Dalmin, G, Kathiresan, K, & Purushothaman, A. (Sep. de 2001). Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 939-942.
12. Diaz Palacios, M. A., & G., R. M. (2012). *Efecto de Probiótico a base de Bacillus sp., Enterococcus sp., Pediococcus sp.y Lactobacillus sp., en la sobrevivencia y crecimiento larval del camarón blanco Litopenaeus vannamei, en la Estación de Maricultura Los Cóbanos, Sonsonate*. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Salvador, San Salvador.
13. Gullian Klanian, M. (2001). *Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de Penaeus vannamei*. Tesis Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil.
14. Han, J., Mohny, L., Tang, K., Pantoja, C., & Lightner, D. (Nov de 2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2, 17-21.
15. Hassaan, M. S., Soltan, M., & Ghonemy, M. M. (2014). Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(2), 199-208.

16. Kumar, V. R. (June de 2016). Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24.
17. Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Yuan, J., Zhang, G., & Hong, H. (2007). Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. (K. A. Publishers, Ed.) *Biotechnology letters*, 29(4), 525-530.
18. Lightner, D. V., Bell, T. A., Redman, R. M., Mohney, L., J.M., N., Rukyani, A., & Poernomo, A. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indo Pacific. En I. Shariff, R. Subasinghe, & J. Athur (Ed.), *Diseases in Aisan Aquaculture*, (pág. 57). Manila.
19. Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L., & Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of applied microbiology*, 107(3), 1031-1041. (B. P. Ltd, Ed.) *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1031-1041.
20. Morales, I. (1992). Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolititas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. *Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, (págs. 203-207). Guayaquil.
21. Morales-Covarrubias, M., Ruiz-Luna, A., Pereira Moura-Lemus, A., Solis Montiel, V., & Conroy, G. (Septiembre-Octubre de 2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamerica. *Revista Científica*, 11(5), 434-446.
22. Musliu Abdulkadir, S. W. (2012). Screening and isolation of the soil bacteria for ability to produce antibiotics. (N. Rivers State University of Science and Technology, Ed.) *BOOK OF*, 76.
23. National Institutes of Health. (2008). National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). *Community Immunity ("Herd" Immunity)*.
24. Nivedita, S., Kapur, G., & Neopaney, B. (May de 2006). Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. (Springer, Ed.) *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 337-343.
25. Prentu, B. (2016). *Aplicación de un probiótico compuesto por Bacillus amyloliquefaciens para mejorar el sistema inmunológico del camarón blanco Litopenaeus vannamei en sistemas de bioflóculos*. Universidad Politécnica de Valencia-Escuela Politécnica Superior de Gandia.
26. Reglamento (CE), 7. (2007). *EUR-lex*. Recuperado el 2 de Agosto de 2017, de eur-lex.europa.eu/legal/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02007R0786-20130225&from=EN
27. Rengipat, S. A. (8 de July de 2003). Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(2), 169-173.
28. Ruiz, C., Roman, G., & Sánchez JL. (Sep. de 1996). A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Aquaculture International*, 4(3), 289-291.
29. Sánchez Ortiz, A. (2015). En S. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (Ed.), *Evaluación del potencial probiótico de bacterias aisladas del tracto digestivo de la almeja pata de mula andara tuberculosa en el cultivo de invertebrados marinos de importancia comercial*. La Paz, México. Obtenido de GOOGLE ACADEMICO.
30. SENASA. (2012). *Programa Nacional de Sanidad Acuicola*. Obtenido de <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/index.php/paginas/view/147>
31. Silva, E., Soares Calazans, M., Calazans, N., Vogeley, J., do Valle, B., Soares, R., & Peixoto, S. (Dec. de 2012). Effect of probiotic (*Bacillus spp.*) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 44(1), 13-21.
32. Sivakumar, N., Sundararaman, M., & Selvakumar, G. (13 de Nov. de 2012). Probiotic effect of *Lactobacillus*

- acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). (A. J. (Kenya), Ed.) *African Journal of Biotechnology*, 11(91), 15811-15818.
33. Sotomayor, M. (Julio de 2009). Uso de cepas ácido lácticas como probióticas en sistemas acuícolas. Evaluación *in vivo*. *CENAIM INFORMA*(155).
 34. Swain, S. M., Singh, C., & Arul, V. (2009). Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. (Springer, Ed.) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 697-703.
 35. Taroco, R. S. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En *Técnicas de Bacteriología y Virología Médica* (Segunda ed., págs. 663 - 671). Uruguay.
 36. Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. (B. S. Ltd, Ed.) *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83-87.
 37. Xu, H.-M., Rong, Y.-J., Zhao, M.-X., Song, B., & Chi, Z.-M. (January de 2014). Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio spp.* isolated from diseased marine animals. (S. Heidelberg, Ed.) *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 127-136.
 38. Zhang, C.-N., Li, X.-F., Xu, W.-N., Jiang, G.-Z., Lu, K.-L., & Wang, L.-N. (Nov. de 2013). Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(5), 1380-1386.
 39. Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Qinghui, A., . . . Zhiguo, L. (11 de June de 2011). Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). (B. P. Ltd, Ed.) *Aquaculture Research*, 42(7), 943-952.