

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Estandarización de un método *in vitro* para medir la viabilidad de bacterias patógenas de *Penaeus vannamei* adaptando el ensayo de reducción del MTT

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Carla Katiusca Constante Catuto

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

Dedicada a mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, Jenny Rodríguez y Cristóbal Domínguez, por haberme permitido participar en este proyecto y por toda la ayuda brindada para su realización.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Carla Katusca Constante Catuto y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Carla Katusca Constante Catuto

EVALUADORES

Msc. Diego Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

Jenny Rodríguez, Ph. D.

PROFESOR TUTOR

Msc. Cristóbal Domínguez Borbor

INVESTIGADOR COTUTOR

RESUMEN

Recientemente, los vibrios patógenos del camarón de cultivo han adquirido resistencia a los antibióticos comunes, conduciendo a la búsqueda permanente de nuevos productos que resulten ser eficaces para su control. Los métodos *in vitro* usados actualmente para evaluar productos son costosos, tediosos y lentos para obtener los resultados. En contraste, el ensayo de metil tiazol tetrazolio (MTT), ampliamente usado en líneas celulares de mamíferos para medir el efecto citotóxico de medicamentos, es económico y reproducible. El objetivo de este estudio es estandarizar un método *in vitro*, basado en la reducción del compuesto MTT, para la medición de la viabilidad de vibrios y evaluación del efecto antivibrio de bioproductos. Inicialmente, se evaluó la capacidad de reducción del MTT mediante la formación de los cristales de formazán de *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Determinando que todos los vibrios fueron capaces de reducir el MTT a formazán. Posteriormente, se validó el método usando aceite esencial de orégano a concentraciones diferentes a fin de obtener un efecto dosis-respuesta. Como control negativo se usó oxitetraciclina, a dosis microbicidas. Como era de esperar el antibiótico afectó la viabilidad de los cuatro vibrios en todas las concentraciones evaluadas. En cuanto al aceite esencial, las concentraciones evaluadas fueron las adecuadas para ver el efecto dosis-respuesta en *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. En conclusión, el método de reducción del MTT fue adaptado satisfactoriamente para medir la viabilidad de los vibrios y constituye una alternativa eficaz para evaluar productos de una manera más rápida y sencilla.

Palabras Clave: Reducción del MTT, vibrios patógenos, cultivo de camarón, viabilidad de vibrios.

ABSTRACT

*Recently, the pathogenic vibrios of farmed shrimp have acquired resistance to common antibiotics, leading to a permanent search for new products that are effective for their control. The in vitro methods currently used to evaluate products are expensive, tedious, and time consuming to obtain results. In contrast, the methyl thiazole tetrazolium (MTT) assay, widely used in mammalian cell lines to measure the cytotoxic effect of drugs, is inexpensive and reproducible. The objective of this study is to standardize an in vitro method, based on the reduction of the MTT compound, for the measurement of vibrios viability and evaluation of the antivibrio effect of bioproducts. Initially, the reduction capacity of MTT was evaluated by the formation of formazan crystals of *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*. All vibrios were found to be capable of reducing MTT to formazan. Subsequently, the method was validated using oregano essential oil at different concentrations to obtain a dose-response effect. Oxytetracycline was used as a negative control, at microbicidal doses. As expected, the antibiotic affected the viability of the four vibrios at all concentrations evaluated. As for the essential oil, the concentrations evaluated were adequate to see the dose-response effect in *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*. In conclusion, the MTT reduction method was successfully adapted to measure vibrio viability and constitutes an effective alternative to evaluate products in a faster and easier way.*

Keywords: *MTT reduction, pathogenic vibrios, shrimp culture, vibrio viability.*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco teórico	4
1.4.1 Vibrios asociados con enfermedades en el camarón	4
1.4.2 Descripción general de los métodos <i>in vitro</i> comúnmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana	5
1.4.3 Método basado en la reducción de sales de tetrazolio: Ensayo de reducción del MTT	7
CAPÍTULO 2	10
2. Metodología	10
2.1 Bacterias y condiciones de cultivo.....	10
2.2 Reducción del MTT por los <i>Vibrio</i> spp.....	11

2.3	Validación del método de reducción del MTT por los vibrios para evaluar productos activos.....	11
2.4	Análisis estadístico	13
CAPÍTULO 3		14
3.	Resultados y análisis	14
3.1	Reducción del MTT por los <i>Vibrio</i> spp.....	14
3.2	Validación del método de reducción del MTT por los vibrios para evaluar productos activos: natural y sintético.....	16
3.2.1	Aceite esencial de orégano	16
3.2.2	Antibiótico oxitetraciclina (Control negativo).....	18
3.3	Dosis letal del 50% evaluadas de aceite esencial de orégano.....	20
CAPÍTULO 4		23
4.	Conclusiones y recomendaciones	23
	Conclusiones	23
	Recomendaciones	24
BIBLIOGRAFÍA.....		26
APÉNDICES		33

ABREVIATURAS

MTT	Metil tiazol tetrazolio o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro
DMSO	Dimetilsulfóxido
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MBC	Concentración mínima bactericida
QS	Quorum sensing
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
TSA	Agar tripticasa soya
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	Dosis letal media
NaCl	Cloruro de sodio

SIMBOLOGÍA

mg	Miligramo
μL	Microlitro
nm	Nanómetro
DO	Densidad óptica

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana usando el método de difusión en disco donde se observa los halos de inhibición de crecimiento. Fuente: Balouiri et al., 2016	6
Figura 1.2 Representación gráfica del método de dilución en caldo para encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC). Fuente: https://ebrary.net/67975/health/factors_micmbc	7
Figura 1.3 Reducción del MTT a cristales de formazán. Fuente: Grela et al., 2018.....	8
Figura 2.1 Diseño experimental para determinar la viabilidad de los vibrios frente a diferentes concentraciones de Aceite esencial de orégano, con n = 7.....	12
Figura 3.1 Ensayo de reducción del MTT de <i>Vibrio</i> spp.	14
Figura 3.2 Densidad óptica de los vibrios expuestos al MTT.	15
Figura 3.3 Viabilidad (expresada como porcentaje) de las cepas de vibrios después de 4 horas de incubación con diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano.....	17
Figura 3.4 Viabilidad (expresada como porcentaje) de las cepas de vibrios después de 4 horas de incubación con diferentes concentraciones del antibiótico oxitetraciclina.	19
Figura 3.5 Curvas de mortalidad de <i>Vibrio</i> spp. cultivados con aceite esencial de orégano.....	21

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Densidad óptica $_{620 \text{ nm}}$ de las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano evaluadas contra cuatro cepas de vibrios patógenos de camarón	16
Tabla 3.2 Densidad óptica $_{620 \text{ nm}}$ de las diferentes concentraciones de antibiótico oxitetraciclina evaluadas contra cuatro cepas de vibrios patógenos de camarón	18

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El camarón de cultivo es el recurso marino comercializado más valioso a nivel mundial y su producción ha ido en aumento en las últimas cuatro décadas, alcanzando casi 4 000 000 de toneladas en el año 2018 a nivel mundial (FAO, 2019; Li et al., 2018). Además, este recurso es el principal producto de exportación no petrolero para el Ecuador. No obstante, el cultivo de camarón enfrenta problemas debido a distintas enfermedades, principalmente causadas por virus y bacterias (FAO, 2014; Raja et al., 2017), que ocasionan pérdidas a nivel global estimadas en \$ 3 000 millones por año (Durvasula et al., 2019). Los vibrios están entre los principales patógenos bacterianos causantes de enfermedades a los camarones de cultivo. La enfermedad que provocan es conocida como vibriosis (Borges et al., 2020), pudiendo afectar a larvas y juveniles en camarones Peneidos y que a menudo resultan en una mortalidad masiva en los sistema de cultivos, generando grandes pérdidas económicas en los países productores de camarón (Dash et al., 2017; Dong et al., 2017; Shinn et al., 2018).

Diversos agentes terapéuticos como antibióticos y ácidos orgánicos son ampliamente utilizados para el control de la vibriosis, como estrategias preventivas o curativas en el cultivo de camarón. Los vibrios están en constante evolución, adquiriendo resistencia a los productos desinfectantes y/o antibióticos. Dando como resultado una disminución de la eficacia de los productos terapéuticos actuales. En consecuencia, las investigaciones enfocadas en el hallazgo de nuevos agentes terapéuticos para el control de la vibriosis se intensifican. Así en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de agentes antivirulencia que, a diferencia de los antibióticos, son productos que no matan las bacterias sino que inhiben la producción de toxinas y factores de virulencia causantes de enfermedades (Shoham, 2013). Teniendo en cuenta que estos productos activos sean eficientes, sin riesgo para los consumidores, de bajo impacto ambiental y de baja incidencia a resistencia antibacteriana.

Es necesario recalcar que, para descubrir estos agentes terapéuticos las pruebas *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana constituye el primer paso (Ramirez & Castaño, 2009). Sin embargo, los métodos para la realización de estas pruebas pueden presentar muchas desventajas, sobre todo cuando se pretende realizar un cribado a gran escala

debido a la demanda de recursos económicos, espacio físico, materiales, reactivos, número de técnicos para el procesamiento de las muestras y el tiempo que se tarda en conocer los resultados. Llegados a este punto es indispensable la adopción de métodos sencillos y fiables que minimicen la necesidad de recursos físicos y económicos. El método de reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT) es una prueba colorimétrica comúnmente usada para determinar la proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular. En este contexto, el método de reducción del MTT podría constituirse en una alternativa para la evaluación de bioproductos activos para el cultivo de camarón debido a su alta sensibilidad y no presentar limitaciones que los métodos microbiológicos tradicionales poseen.

Por consiguiente, la propuesta de este trabajo es la estandarización de un método que mida la viabilidad de bacterias patógenas del camarón, específicamente vibrios, basado en la reducción del MTT con el objetivo de evaluar productos efectivos para el control de este patógeno. Cabe señalar, además, que el método de reducción del MTT permite determinar si los productos a evaluar cumplen con los siguientes requisitos: efectos microbicidas, mínima concentración inhibitoria (MIC), máxima concentración bactericida (MBC), dosis letal que mata el 50% (LD₅₀) y lo más relevante, dosis que afectan la viabilidad para enfoques de investigación en búsqueda de productos con actividad anti-virulencia.

1.1 Descripción del problema

Los principales métodos *in vitro* usados para medir la viabilidad microbiana y la detección y/o cuantificación del efecto antibacteriano de un compuesto, tanto en salud animal como humana, se basan comúnmente en la capacidad de reproducción de los microorganismos (porcentaje de células capaces de dividirse) y generalmente incluyen difusión en disco y dilución de caldo o agar (Balouiri et al., 2016; Benov, 2019). Sin embargo, realizar estas técnicas implican una tediosa tarea manual, alto riesgo de errores en la preparación de soluciones antimicrobianas para cada prueba y elevado costo por la gran cantidad de reactivos usados. Se requiere además el uso de gran espacio y mucho tiempo de espera para obtener los resultados (Bursle & Robson, 2016; Reller et al., 2009). Con estas pruebas es difícil realizar un cribado a gran escala con compuestos activos diferentes a concentraciones variables (Requena et al., 2019). Por

lo tanto, es conveniente el uso de nuevas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana que no presenten los inconvenientes y limitaciones de los métodos microbiológicos tradicionales.

1.2 Justificación del problema

El método colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT a cristales de formazán es una prueba cuantitativa que ha sido ampliamente usada en líneas celulares desde el año 1983 para evaluar el efecto citotóxico de drogas o medicamentos. Mide la viabilidad celular en términos de la actividad reductora (Wachsmann & Lamprecht, 2012), debido a que es un indicador muy sensible y confiable de la actividad metabólica celular y está mediada por enzimas deshidrogenasas. Durante el proceso de reducción de la sal de tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT), ocurre un cambio de coloración, el compuesto inicialmente soluble amarillo pálido se convierte en un precipitado insoluble de color púrpura, denominado formazán. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

La estandarización de un método basado en la reducción del MTT que mida la viabilidad bacteriana de patógenos del camarón permitirá a los investigadores evaluar productos con posible actividad antimicrobiana de una manera más sencilla, rápida y económica, agilizando el proceso de descubrimiento de nuevos tratamientos contra los vibrios que afectan el cultivo de camarón a fin, de paliar las pérdidas económicas del sector camaronero. Cabe destacar que este método es altamente sensible y reproducible en comparación con los otros métodos microbiológicos. Además, con su aplicación se podrán verificar muchos compuestos activos y diferentes concentraciones en un corto periodo de tiempo para una amplia variedad de microorganismos (Requena et al., 2019; Sefton et al., 1994).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Estandarizar un método *in vitro* sencillo y sensible, basado en la reducción del compuesto MTT, para la medición de la viabilidad de vibrios y evaluación del efecto antivibrio de bioproductos.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad de reducción del compuesto MTT por parte de los vibrios mediante la detección de la absorbancia.
2. Validar la prueba usando productos con capacidad antimicrobiana: Antibiótico oxitetraciclina y aceite esencial de orégano, en vibrios patógenos de camarón, para determinar el efecto dosis-respuesta.
3. Determinar la dosis letal que afecta al 50% de la población de vibrios (DL_{50}) para cada uno de los productos evaluados usando pruebas de regresión lineal.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Vibrios asociados con enfermedades en el camarón

Vibrio spp. son bacterias gramnegativas que habitan ambientes marinos y estuarinos a nivel global, por lo tanto, forman parte de la flora bacteriana común de los animales acuáticos incluyendo corales, moluscos, crustáceos, peces y zooplancton (Teng et al., 2017). Se ha documentado que existen 100 especies de vibrios, identificados entre patogénicos y no patogénicos (Jones, 2014). Las especies patógenas del camarón de cultivo *Penaeus vannamei*, son consideradas generalmente oportunistas que se aprovechan de eventos estresantes, como variaciones súbitas de temperatura o de salinidad, para romper la primera barrera de defensa del organismo, el exoesqueleto, e infectarlo (Cuéllar, 2013; Vaseeharan & Ramasamy, 2003). Las principales especies incluyen *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. campbellii*.

La afección causada por los vibrios se denomina vibriosis, considerada una de las principales enfermedades que afecta al sector camaronero (Rao, 2009). Esta enfermedad ataca a varios órganos del camarón, incluyendo la cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, glándula antenal, corazón, hemolinfa y músculo. Los camarones infectados se caracterizan por nadar en la superficie de los estanques, cerca de la orilla. En la primera etapa de la enfermedad presentan músculo opaco e intestino vacío, posteriormente, se observa expansión de los cromatóforos, hepatopáncreas inflamados y en ciertos organismos luminiscencia. La enfermedad termina con la muerte de hasta

un 90% de postlarvas y juveniles tempranos en las camaronas (Morales-Covarrubias, 2008).

Por otro lado, la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), descrita inicialmente en Asia en 2009, se ha esparcido hasta América en los últimos años, y puede causar hasta un 100% de mortalidad de los camarones de cultivo (Han et al., 2018). En los primeros estudios se identificó que el agente causante de esta enfermedad es una cepa específica de *V. parahaemolyticus* (V_{pAHPND}) (Han et al., 2015; Tran et al., 2013). Mediante análisis genómicos, se determinó que la virulencia en *V. parahaemolyticus* se debe a toxinas binarias PirAB codificada por genes PirAB contenidos en plásmidos (Sirikharin et al., 2015), que pueden transferirse de manera horizontal a otros vibrios. Por lo que se han identificado más especies de vibrios causantes de AHPND, incluido *V. campbellii* (Han et al., 2017), *V. harveyi* (Kondo et al., 2015), *V. owensii* (Liu et al., 2018) y *V. punensis* (Restrepo et al., 2018). El principal signo clínico de AHPND que se observa en los camarones infectados es un hepatopáncreas pálido y atrofiado (Lai et al., 2015). En la etapa inicial de la enfermedad se desprenden las células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas y en la etapa terminal, el hepatopáncreas muestra una infiltración hemocítica intra-tubular extensa y el desarrollo de una infección bacteriana secundaria masiva (Caro et al., 2020; Soto-Rodriguez et al., 2015).

1.4.2 Descripción general de los métodos *in vitro* comúnmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana

En la actualidad, existen diversos métodos *in vitro* usados para la investigación de agentes terapéuticos con actividad antimicrobiana. Entre los principales métodos destacan difusión de discos y dilución seriada. El método de difusión de discos fue desarrollado en 1940 por Heatley (1944) y el procedimiento se basa en colocar el inóculo bacteriano por toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton, sobre la cual, posteriormente, se colocan discos de papel filtro con diferentes concentraciones del producto a evaluar (Reller et al., 2009). En general, el producto se difunde fuera del disco inhibiendo la proliferación del microorganismo, formando halos de inhibición de crecimiento, como se observa en la Figura 1.1. Estos halos son medidos a fin de obtener resultados semicuantitativos, clasificando a las bacterias como susceptibles, intermedias

o resistentes de acuerdo con el tamaño del halo de inhibición según lo establecido por del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2015; NCCLS, 2002).

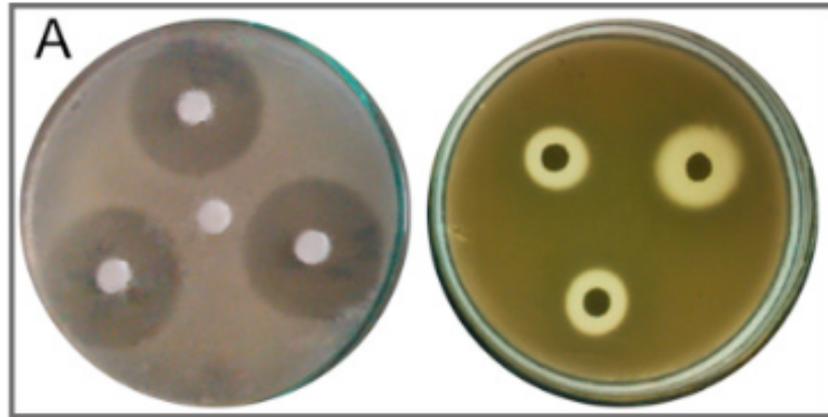


Figura 1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana usando el método de difusión en disco donde se observa los halos de inhibición de crecimiento. Fuente: Balouiri et al., 2016

El método de dilución es cuantitativo debido a que determina la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de microorganismos en condiciones de crecimiento definidas, es decir la concentración mínima inhibitoria (MIC), ya sea en medio de caldo o en agar (Wiegand et al., 2008). Con respecto a la dilución en caldo, el proceso consiste en realizar diluciones dobles del agente antimicrobiano (por ejemplo, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$) en un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 mL (macro dilución) (Balouiri et al., 2016). Después de la incubación, se examinan las pruebas y el MIC se determina generalmente por espectrofotometría (Yam & Lee, 2012). De modo similar ocurre cuando se realiza por agar, se añaden diferentes concentraciones del producto al medio de cultivo antes de su solidificación, seguido de la siembra del inóculo microbiano en la superficie de la placa. El MIC se determina observando la carencia de crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) luego de la incubación en las condiciones adecuadas (Balouiri et al., 2016).

Mediante este método también se puede conocer la concentración mínima bactericida (MBC), definida como la concentración más baja de un producto antimicrobiano necesaria para matar las bacterias de un cultivo, en otras palabras, la concentración mínima del agente, que es bactericida (Abedon et al., 2011). Para conocer

el MBC se parte de las diluciones del caldo con la que se determinó el MIC, se vuelven a cultivar sembrando las diluciones que inhibieron el crecimiento bacteriano (es decir, aquellos en o por encima del MIC) en placas de agar sin agente antimicrobiano de prueba. El MBC será la dilución de caldo más baja que impide el crecimiento de UFC en la placa (Sykes & Rankin, 2013). Dicho proceso se ejemplifica mejor en la Figura 1.2.

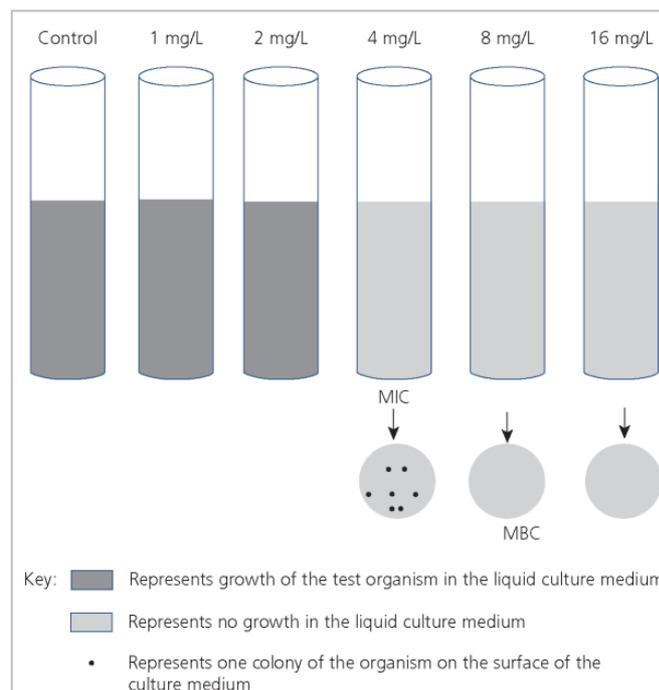


Figura 1.2 Representación gráfica del método de dilución en caldo para encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC).

Fuente: https://ebrary.net/67975/health/factors_micmbc

1.4.3 Método basado en la reducción de sales de tetrazolio: Ensayo de reducción del MTT

Las pruebas a base de sales de tetrazolio han sido ampliamente usadas desde el año 1960, incorporándose en muchos protocolos los cuales son aplicados para medir la actividad de la enzima oxidoreductasa, para detectar radicales superóxido, entre otros (Atterwill et al., 1993; Bernas & Dobrucki, 2000; Mosmann, 1983). Una de las sales de tetrazolio más usada en el laboratorio para realizar bioensayos es 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro, comúnmente abreviado MTT, el método fue desarrollado por Mosmann en el año 1983. Los ensayos de reducción del MTT se aplican principalmente a líneas celulares de mamíferos para medir la proliferación celular y

citotoxicidad (Jo et al., 2015). Esta prueba se basa en la reducción del MTT, inicialmente de color amarillo y soluble en agua, a cristales de formazán de color púrpura insoluble en agua, mediadas por enzimas celulares (Patravale et al., 2012), químicamente, la reacción se representa en la Figura 1.3.

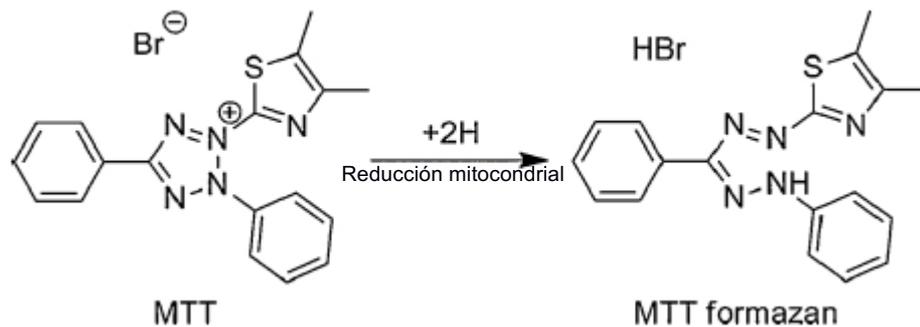


Figura 1.3 Reducción del MTT a cristales de formazán. Fuente: Grela et al., 2018

Las principales enzimas implicadas en la reducción del MTT en las células son las deshidrogenasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que se producen en las mitocondrias (Kwete et al., 2017), aunque existen otras enzimas que también cumplen esta función, pero que están localizados en otros organelos como el retículo endoplasmático (Lü et al., 2012; Stockert et al., 2012). Debido a que el MTT es reducido en mitocondrias activas, la reacción solo puede ocurrir en células vivas, por tanto, la cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables (Mosmann, 1983).

De manera general el proceso de esta prueba consiste en cultivar las células en placas de 96 pocillos. Posteriormente se cambia el medio por el agente a evaluar a diferentes concentraciones y se incuba. Después se agrega el MTT y se vuelve a incubar. Se elimina el sobrenadante y se agrega algún solvente orgánico como DMSO para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se cuantifica la absorbancia midiendo a una longitud de onda entre 500 y 620 nm usando un espectrofotómetro para conocer la cantidad de cristales de formazán generada (Kwete et al., 2017). En este ensayo debe existir un control positivo, que corresponde a pozos de células no tratadas debido a que los resultados se calculan como el porcentaje de viabilidad en relación con las células no tratadas (Wachsmann & Lamprecht, 2012).

El ensayo de reducción del MTT también ha sido adaptado con éxito para evaluar productos tóxicos para los camarones (Domínguez-Borbor et al., 2018). Es un método bastante versátil que puede ser adaptado a otras células con éxito por lo que a lo largo de los últimos años han surgido diversos estudios, aplicando el método en células procariotas. El objetivo de estos estudios ha sido determinar bacterias resistentes a múltiples fármacos (Montoro et al., 2005), evaluación de la formación de biopelículas (Brambilla et al., 2014) y cuantificación indirecta de compuestos antibacterianos (Wang et al., 2007). A diferencia de las células eucariotas, existe poca información sobre el mecanismo de reducción en las bacterias (Tachon et al., 2009), pero se cree que están involucradas las NADH deshidrogenasas (Grela et al., 2018).

La implementación del método de reducción del MTT permite incrementar la sensibilidad del método de dilución en medio líquido de evaluación de actividad antimicrobiana por lo cual puede ser usado como método alternativo o adicional para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Shi et al., 2007). En resumen, el proceso consistiría en agregar el MTT al cultivo bacteriano de las diluciones seriadas del antimicrobiano, seguido de la adición de solventes orgánicos para disolver los cristales de formazán y realizar las mediciones de absorbancia. Una ventaja de este método sobre el método de dilución de caldo es que las bacterias muertas no interfieren en el resultado al momento de hacer la medición de la densidad óptica, pues las células muertas son incapaces de reducir el MTT (Grela et al., 2018) . Además, por ser realizado en placas de 96 pocillos, posee otras ventajas como la reproducibilidad y el ahorro de los reactivos y el espacio (Benov, 2019; Domínguez-Borbor et al., 2018).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Bacterias y condiciones de cultivo

Para este estudio se usaron cuatro especies de vibrios patógenos del camarón: *Vibrio harveyi* (cepa E22), *Vibrio campbellii* (cepa LM2013), *Vibrio parahaemolyticus* (cepa ATCC27969) y *Vibrio vulnificus* (cepa S2), del Centro Nacional de Acuicultura e investigaciones Marina (CENAIM). Las cepas de vibrios fueron descongeladas y viabilizadas en medio de cultivo agar tripticasa soya (TSA) + 2% de NaCl. Inicialmente, se determinó la curva de crecimiento de cada cepa de *Vibrio* mediante regresión lineal, a través de los datos de absorbancia y las unidades formadoras de colonias crecidas en placas de Petri de TSA + 2% de NaCl. Los muestreos se realizaron cada hora (lecturas de absorbancia y siembra de una muestra), obteniendo datos de la equivalencia de la densidad óptica medida a 620 nm ($DO_{620\text{ nm}}$) con las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los modelos de regresión lineal se seleccionaron con una bondad de ajuste ($r^2 > 0,95$), para las curvas de crecimiento de los cuatro vibrios. (Ver apéndice A)

Establecidas las ecuaciones de regresión para cada *Vibrio* spp., se procedió a determinar si los vibrios tienen capacidad de reducir el MTT de color amarillo a cristales de formazán color púrpura. Los vibrios fueron viabilizados como se describió anteriormente. Brevemente, se seleccionó una colonia de cada bacteria y se cultivaron en tubos de ensayo en caldo Luria-Bertani (LB) + 2% de NaCl, incubando a 28°C hasta obtener un valor de absorbancia ($DO_{620\text{ nm}}$) 0.25, 0.31, 0.23, y 0.3, para *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, respectivamente, lo que equivale a una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL. Dato, estimado de la curva de calibración previamente realizada. Del inóculo bacteriano ajustado se realizó una dilución de 1:10 en solución salina (2% NaCl), para obtener una concentración final de 1×10^7 UFC/mL de inóculo bacteriano para cada cepa de *Vibrio*.

2.2 Reducción del MTT por los *Vibrio* spp.

Para determinar si los vibrios tienen capacidad de reducir el MTT de color amarillo a cristales de formazán de color púrpura se adaptó la metodología previamente descrita por Beltrán et al., (2018). Brevemente, en este ensayo se usó placas estériles de 96 pocillos (Corning CLS3595). Donde, 180 µl de medio de cultivo LB + 2% NaCl fueron dispensado por pocillo en la microplaca y se agregó de inmediato 20 µl del inóculo de *Vibrio* previamente ajustado la concentración, se incluyeron siete réplicas para cada cepa evaluada. Empleando placas individuales para cada *Vibrio*. Como control negativo se empleó 180 µl LB + 2% NaCl y 20 µL de solución salina al 2% NaCl por pocillo, con siete repeticiones. Las placas se incubaron a 30 °C por 4 horas. Se añadió 10 µL de solución de MTT a una concentración de (5 mg/mL, en tampón PBS) a cada pocillo de la microplaca y se incubó por 2 horas a 30 °C. Las microplacas fueron centrifugadas por 20 minutos a 2 500 g a una temperatura de 24 °C, en una centrifuga de microplacas (Thermo Scientific™ Megafuge 40R). Posteriormente, se retiró cuidadosamente el sobrenadante de cada pocillo de la microplaca sin coger el pellet bacteriano. Para disolver la membrana de los vibrios y los cristales de formazán se colocó 200 µL de etanol absoluto en cada pocillo y se homogenizó vigorosamente todos los pocillos por pipeteo. Finalmente, la absorbancia se midió a DO_{620 nm} usando el lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan© EX. Este proceso se aplicó para cada *Vibrio* spp. evaluado en este estudio.

2.3 Validación del método de reducción del MTT por los vibrios para evaluar productos activos

Para este propósito, se usó un producto de fuente natural (aceite esencial de orégano) a seis concentraciones diferentes, a fin de obtener un efecto dosis-respuesta en función de la cantidad de producto evaluado, respecto a la viabilidad y la cantidad de cristales de formazán formado por las bacterias. Como control negativo se usó un producto sintético (Oxitetraciclina) permitido para uso acuícola, a dosis microbicidas. Ambos productos fueron diluidos en solución salina al 2% NaCl a diferentes concentraciones. Para el aceite esencial las dosis finales evaluadas fueron: 1125, 562.5, 281.3, 140.6, 70.3 y 35.2 µg/mL. Para el control negativo (antibiótico) las concentraciones fueron: 7500, 3750, 1875, 937.5 y 468.75 µg/mL. En una microplaca de 96 pocillos se dispensaron 160 µL de medio de cultivo LB + 2% NaCl y se agregó 20 µL de los productos

a las concentraciones antes declaradas y 20 μL de inóculo bacteriano previamente ajustado (volumen final por pocillo 200 μL). Como control positivo se usó 20 μL de solución salina más 20 μL de suspensión bacteriana y como blanco se usó 40 μL de solución salina, sin bacteria. El diseño aplicado se detalla mejor en la Figura 2.1.

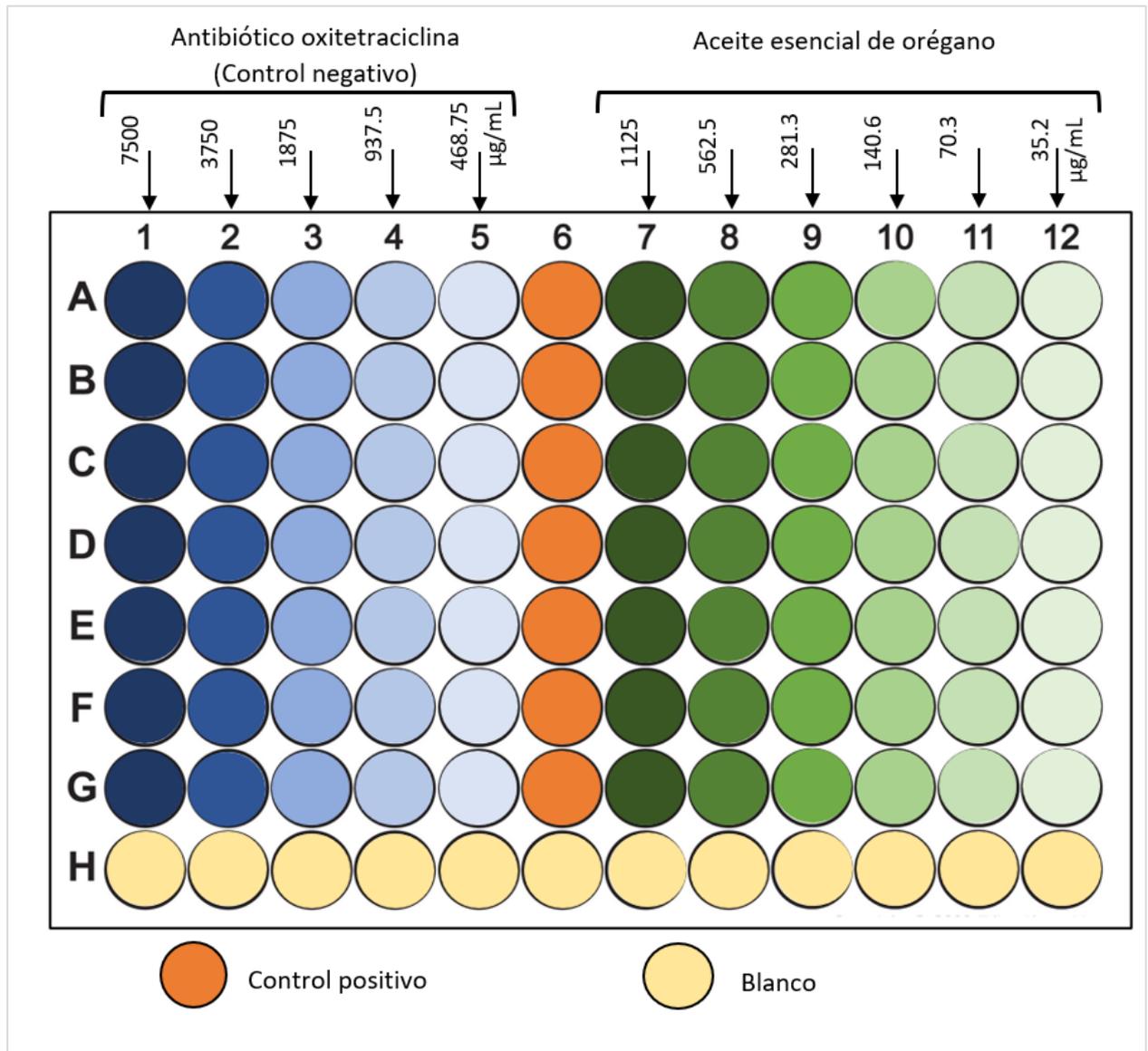


Figura 2.1 Diseño experimental para determinar la viabilidad de los vibrios frente a diferentes concentraciones de Aceite esencial de orégano, con $n = 7$.

Las placas se incubaron a 30 °C por 4 horas. Luego, se agregó a todos los pocillos 10 μL de solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL. Se incubó durante 2 horas a 30 °C. Se centrifugó por 10 minutos a 2500 g a una temperatura de 24 °C.

Posteriormente, se retiró cuidadosamente el sobrenadante de cada pocillo de la microplaca sin coger el pellet bacteriano. Los cristales formazán fueron solubilizados con 200 µL de etanol absoluto en todos los pocillos, homogenizando la solución por pipeteo. Finalmente, se midió la densidad óptica a 620 nm usando el lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan© EX. El porcentaje de viabilidad bacteriana fue obtenido mediante la siguiente formula:

$$\text{Viabilidad bacteriana} = \frac{\text{DO de bacterias expuestas al tratamiento}}{\text{DO de bacterias no expuestas}} \times 100\% \quad (2.1)$$

DO = Densidad óptica a 620 nm

Este mismo proceso se repitió para cepa de *Vibrio*. Todas las pruebas se llevaron a cabo en condiciones estériles dentro de una cabina de flujo laminar tipo IIA y todos los medios de cultivo empleados, se esterilizaron por autoclave.

Adicionalmente, con los resultados obtenidos para la dosis-respuesta del aceite esencial, se estimó la dosis que mata el 50% (LD₅₀) de células bacteriana, para cada una de las especies de vibrios evaluado.

2.4 Análisis estadístico

En todos los experimentos se usaron 7 réplicas. Los resultados se expresaron como un promedio (± desviación estándar) de las réplicas. Los análisis estadísticos se realizaron para determinar diferencias significativas (P < 0.05) usando ANOVA de una vía, después de la verificación de los supuestos de homogeneidad de la normalidad y la varianza. Cuando se detectaron diferencias significativas, se aplicó un análisis de Dunnett (grupos de control y tratados). Los datos expresados en porcentajes se transformaron (usando arcoseno), y los supuestos se cumplieron antes de realizar el análisis estadístico. La dosis que causa el 50% de mortalidad (LD₅₀), se estimó mediante regresiones de probit. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico SPSS (versión 21).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Reducción del MTT por los *Vibrio* spp.

Las cuatro especies de vibrios patógenos de camarón transformaron eficazmente el compuesto metil tiazol tetrazolio (MTT) a cristales de formazán. Esto se verificó, ya que en todos los pocillos donde se expusieron vibrios al MTT, estos se tornaron a color purpura (Figura 3.1 A), por el contrario, en los controles (medio de cultivo sin bacteria) no se observó ningún cambio de color en los pocillos, manteniéndose de color amarillo una vez, culminado el tiempo de exposición del MTT (Figura 3.1 B). Los valores de la densidad óptica medidos a 620 nm (DO_{620nm}) equivalente a la cantidad de formazán producido por las bacterias viables, fueron significativamente mayores con respecto al control para cada cepa de *Vibrio* (Fig. 3.2).

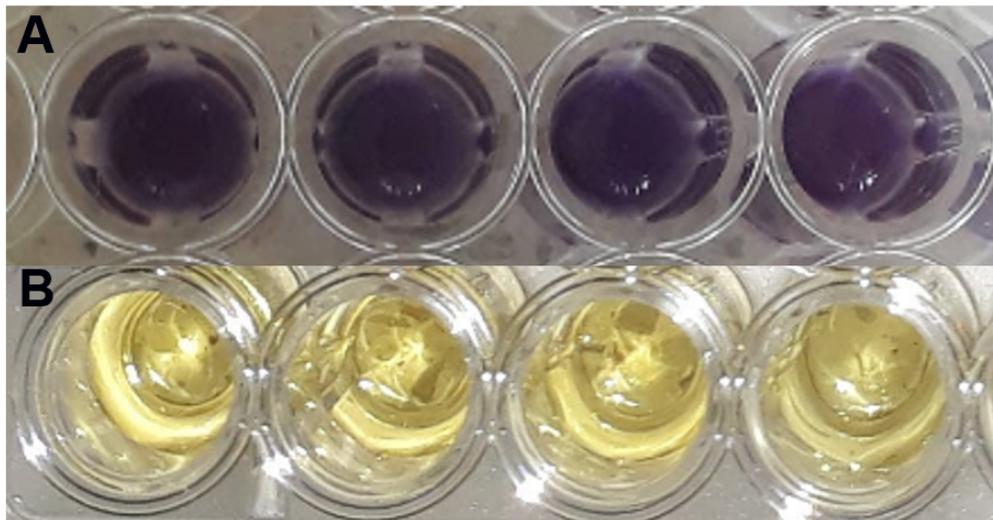


Figura 3.1 Ensayo de reducción del MTT de *Vibrio* spp.

Después de 2 horas de exposición al MTT, se observa que los pocillos de medio de crecimiento con bacterias se tornaron purpura (A), mientras que los pocillos sin bacteria se mantuvieron de color amarillo (B).

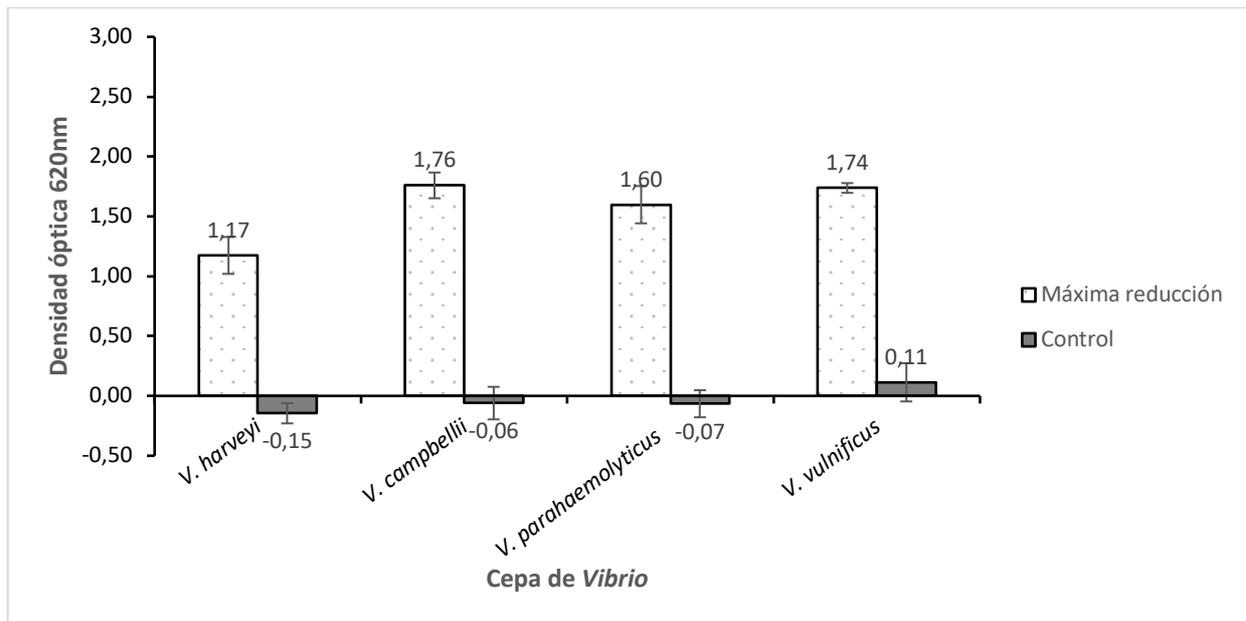


Figura 3.2 Densidad óptica de los vibrios expuestos al MTT.

Capacidad de transformar el MTT a cristales de formazán por los vibrios. Exposición por dos horas. Valores representados como el promedio \pm DESVEST de 7 réplicas.

El análisis cuantitativo mostró que *V. campbellii* fue la cepa de *Vibrio* que mayor capacidad tuvo de reducir el MTT a cristales de formazán debido a que tuvo el valor más alto de DO_{620nm} . El *Vibrio* que menor capacidad tuvo de convertir el compuesto fue el *V. harveyi* y comportándose de valor intermedio, estuvieron *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Es importante mencionar que, en este ensayo, los vibrios tuvieron dos horas de exposición al MTT, por lo que no se destaca que entre más tiempo de exposición al MTT, los vibrios tendrían mayor capacidad de reducir el MTT a formazán. Otro aspecto que se debe considerar es la longitud de onda con la que se mide la absorbancia o densidad óptica. De modo que, es muy probable que, al aumentar la longitud de onda a 650 nm, los valores se incrementen, porque aumenta el paso de la luz al momento de leer la muestra, sin embargo, eso no implica que exista más cantidad de cristales de formazán producidos.

3.2 Validación del método de reducción del MTT por los vibrios para evaluar productos activos: natural y sintético

3.2.1 Aceite esencial de orégano

La técnica de reducción del MTT, permitió evaluar el efecto de las concentraciones del aceite esencial del orégano sobre los vibrios, observándose un efecto dosis-respuesta, es decir, las cantidades de cristales de formazán estuvieron en función de la cantidad de vibrios viables. Este comportamiento fue mayormente apreciado o visible para *V. harveyi*, debido a que a medida que disminuía la dosis, los valores de densidad óptica (DO_{620nm}), iban aumentando (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Densidad óptica 620 nm de las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano evaluadas contra cuatro cepas de vibrios patógenos de camarón

Vibrios patógenos		Concentraciones de aceite esencial de orégano ($\mu\text{g/mL}$)						
		1 125	562,5	281,3	140,6	70,3	35,2	Control
<i>V. harveyi</i>	Prom DO	0,31	0,37	0,43	0,54	0,78	0,87	1,17
	SD	0,11	0,15	0,22	0,23	0,25	0,18	0,26
<i>V. campbellii</i>	Prom DO	-0,03	1,16	1,69	1,60	1,67	1,58	1,76
	SD	0,08	0,12	0,05	0,21	0,17	0,19	0,11
<i>V. parahaemolyticus</i>	Prom DO	0,21	0,62	0,69	0,60	0,53	0,38	1,60
	SD	0,07	0,11	0,21	0,08	0,10	0,08	0,16
<i>V. vulnificus</i>	Prom DO	-0,04	1,70	1,66	1,71	1,63	1,52	1,74
	SD	0,08	0,06	0,07	0,06	0,08	0,26	0,04

Valores representados como el promedio de $DO \pm$ desviación estándar (SD) de 7 réplicas.

Los resultados del porcentaje de viabilidad bacteriana (cociente entre la DO_{620nm} de vibrios tratados y la DO_{620nm} de vibrios no tratados, por 100), mostraron que para *V. harveyi*, a medida que la concentración del aceite esencial disminuía, la viabilidad aumentaba, además hubo diferencias significativas en cada una de las concentraciones empleadas respecto al grupo control, a excepción de la concentración más baja, 195.31 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.3 A). De manera similar, ocurrió para *V. parahaemolyticus*, todas las concentraciones evaluadas fueron significativamente diferentes con respecto al control (Figura 3.3 B). En cuanto a *V. campbellii* los resultados mostraron que solo a las concentraciones de 1 125 y 562.5 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad disminuyó con respecto al grupo control en un grado estadísticamente significativo (Figura 3.2 C). Por último, *V. vulnificus*

registró disminución significativa en la viabilidad, solo cuando las bacterias se incubaron con una concentración de 1 125 $\mu\text{g/mL}$ del aceite de orégano (Figura 3.2 D)

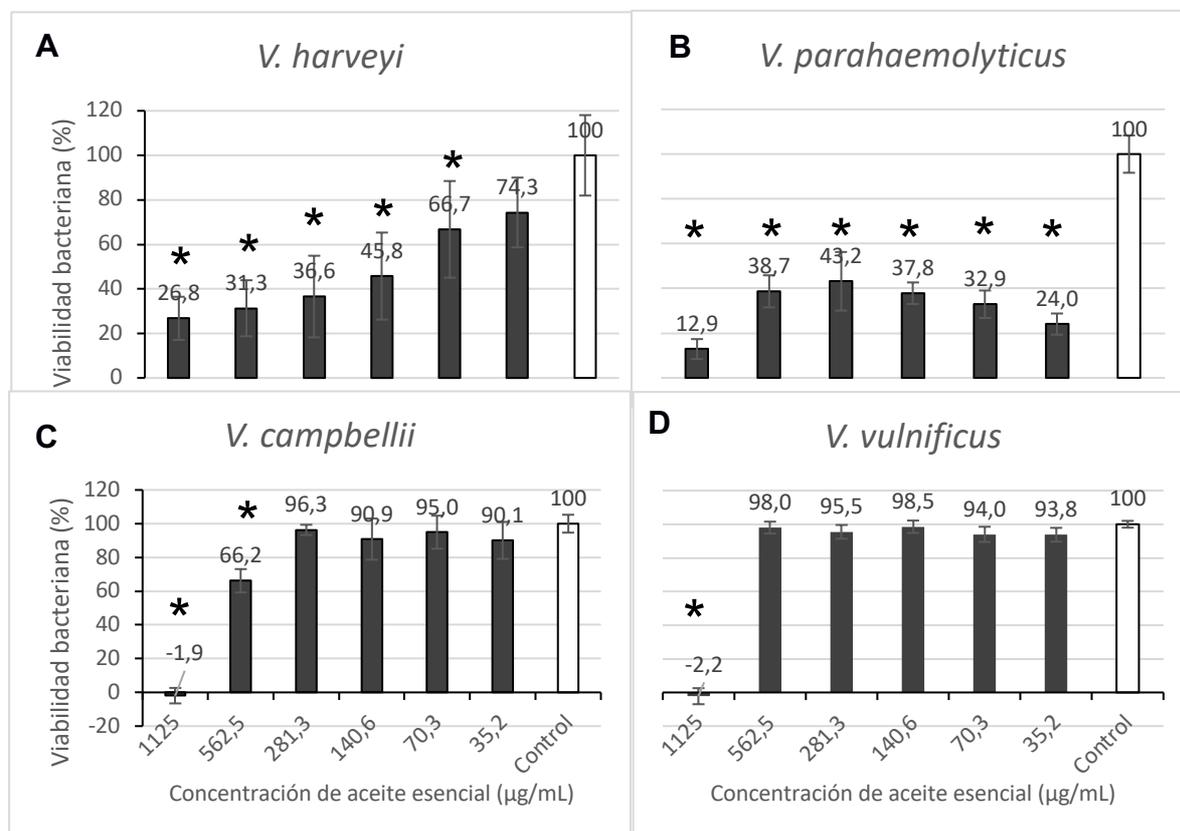


Figura 3.3 Viabilidad (expresada como porcentaje) de las cepas de vibrios después de 4 horas de incubación con diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano.

El control representa las bacterias no tratadas (100% de viabilidad). La viabilidad se obtuvo del cociente de la $\text{DO}_{620\text{nm}}$ de bacterias tratadas entre $\text{DO}_{620\text{nm}}$ de bacterias no tratadas $\times 100$. Las concentraciones que son significativamente diferentes con el control ($p < 0.05$) se representan por un asterisco (*).

El análisis de los resultados tanto de densidad óptica como de viabilidad mostraron que las concentraciones de aceite esencial de orégano, evaluadas en *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* fueron las adecuadas porque permitieron ver este efecto dosis-respuesta. Por el contrario, para *V. campbellii* y *V. vulnificus* no se observó este efecto, porque es muy probable que se encuentre entre la dosis 1 125 y 562,5 $\mu\text{g/mL}$ debido a que la dosis mayor afectó el 100% de viabilidad, mientras que, a las dosis restantes, la viabilidad de las bacterias no fue afectada y pudieron reducir el MTT a cristales de formazán eficientemente.

El aceite esencial de orégano es un bioproducto conocido por tener propiedades de antivirulencia, siendo eficaz en inhibir los procesos mediados por el quorum sensing (QS), como la formación de biopelícula, motilidad en enjambre y bioluminiscencia, en vibrios patógenos del camarón de cultivo (Domínguez-Borbor et al., 2020). Por todo esto, cabe destacar que, a pesar de que este bioproducto no haya afectado la viabilidad de *V. campbellii* y *V. vulnificus* a las dosis más bajas, sí tienen un efecto sobre la virulencia. Debido a que, Domínguez-Borbor et al. (2020) determinó que a partir de una concentración de 1 µg/mL hay un efecto sobre el QS de vibrios patógenos del camarón, causante de enfermedades del camarón de cultivo.

3.2.2 Antibiótico oxitetraciclina (Control negativo)

La técnica de reducción del MTT, permitió determinar que las cuatro cepas de vibrios fueron afectadas significativamente por la cantidad de antibiótico suministrados debido a que se observaron valores de DO inferiores a 0.06, leídos a una longitud de onda de 620 nm, lo que indica que no hubo formación de cristales de formazán. (Tabla 3.2)

Tabla 3.2 Densidad óptica $_{620\text{ nm}}$ de las diferentes concentraciones de antibiótico oxitetraciclina evaluadas contra cuatro cepas de vibrios patógenos de camarón

Vibrios patógenos		Concentraciones de antibiótico oxitetraciclina (µg/mL)					
		7 500	3 750	1 875	937,5	468,75	Control
<i>V. harveyi</i>	Prom DO	-0,02	-0,09	-0,09	-0,10	-0,02	1,17
	SD	0,06	0,03	0,05	0,03	0,01	0,26
<i>V. campbellii</i>	Prom DO	0,02	0,00	-0,06	-0,04	-0,02	1,76
	SD	0,03	0,03	0,06	0,02	0,01	0,11
<i>V. parahaemolyticus</i>	Prom DO	-0,04	-0,15	-0,17	-0,18	-0,17	1,60
	SD	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,16
<i>V. vulnificus</i>	Prom DO	-0,03	-0,04	-0,02	-0,02	0,03	1,74
	SD	0,01	0,06	0,05	0,06	0,02	0,04

Valores representados como el promedio de DO ± desviación estándar (SD) de 7 réplicas.

Los mismos datos fueron transformados a la viabilidad de los vibrios. Los resultados mostraron que todas las concentraciones evaluadas disminuyeron la viabilidad para cada cepa de *Vibrio* estudiada con respecto al control en un grado estadísticamente significativo. Además, cabe recalcar que, entre las concentraciones evaluadas en los vibrios no hubo diferencias significativas (Figura 3.4).

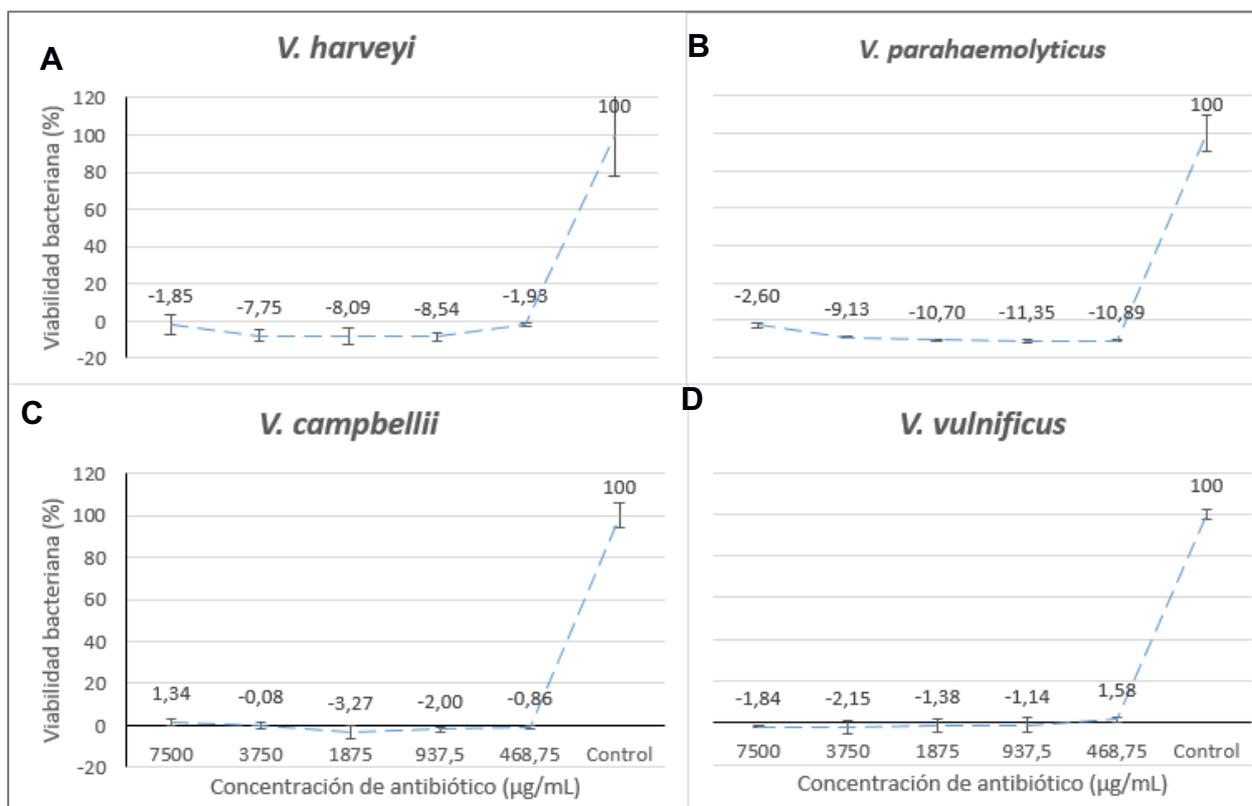


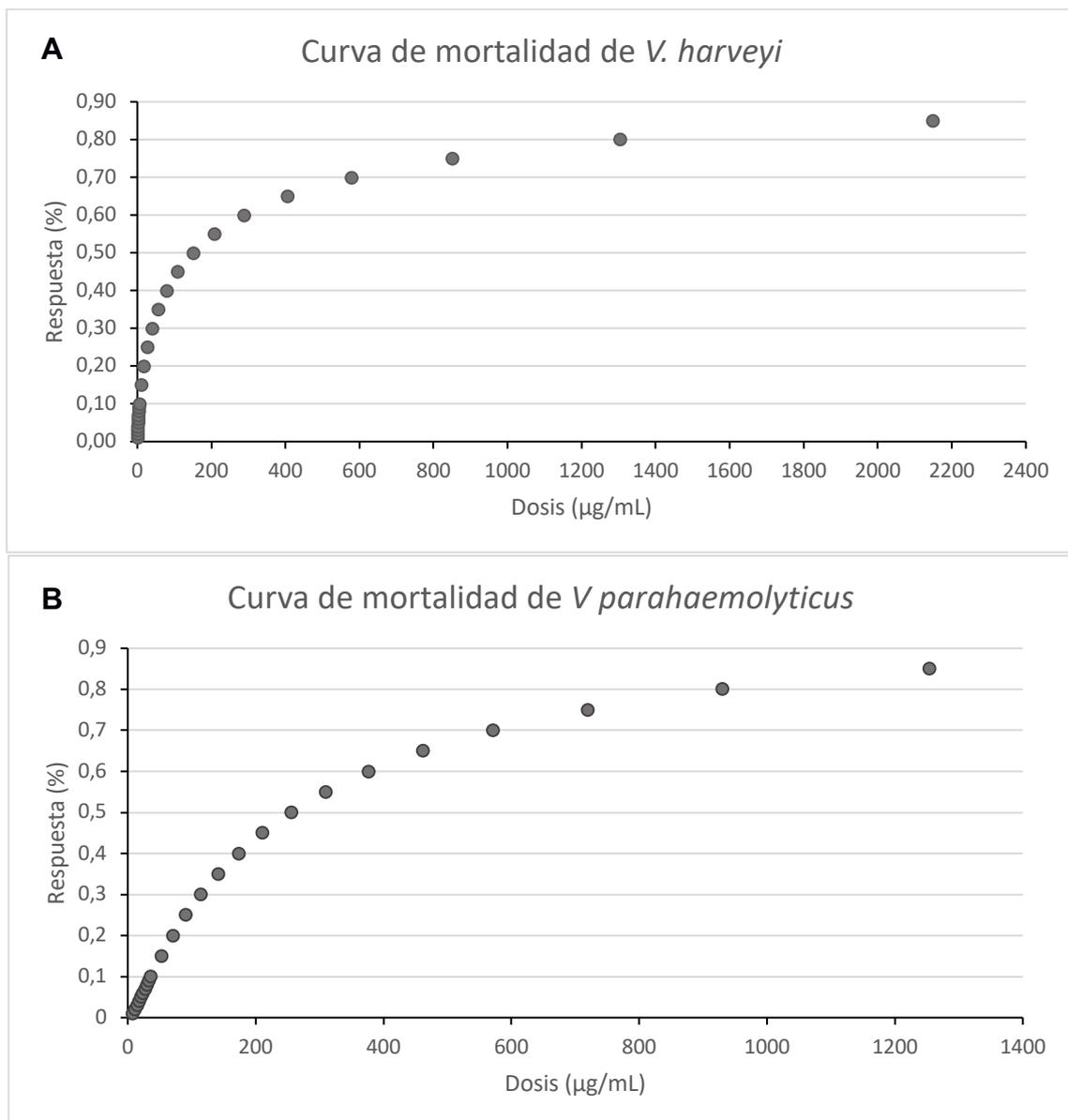
Figura 3.4 Viabilidad (expresada como porcentaje) de las cepas de vibrios después de 4 horas de incubación con diferentes concentraciones del antibiótico oxitetraciclina.

El control representa las bacterias no tratadas (100% de viabilidad). La viabilidad se obtuvo del cociente de la $DO_{620\text{ nm}}$ de bacterias tratadas entre $DO_{620\text{ nm}}$ de bacterias no tratadas $\times 100$. En todas las gráficas, perteneciente a cada cepa de *Vibrio*, se muestra que todas las concentraciones evaluadas son significativamente diferentes con respecto al control y las diferencias entre las concentraciones no son representativas ($p < 0.05$).

La oxitetraciclina, es uno de los antibióticos de amplio espectro para bacterias grampositivas y gramnegativas, ampliamente utilizado en la acuicultura debido a que es permitido en ciertos países, además es un producto eficiente y con un precio accesible (Neela et al., 2007). Un estudio realizado por Rebouças et al., (2011), determinó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la oxitetraciclina evaluada en vibrios, no excede los 400 mg/mL. De manera que se confirma que las concentraciones evaluadas en este ensayo, 7 500 – 468.75 µg/mL, fueron letales para todas las cepas de vibrios.

3.3 Dosis letal del 50% evaluadas de aceite esencial de orégano.

Los valores de la dosis que mata el 50% (LD_{50}) de las células bacterianas estimados a partir de los resultados obtenidos para la dosis-respuesta del aceite esencial de orégano, fueron 150.9, 255.3, 814.1 y 6 924.4 para *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. vulnificus*, respectivamente. Adicionalmente, con los datos generados por el análisis probit, se graficó las curvas de mortalidad de los *Vibrio* spp. (Figura 3.4).



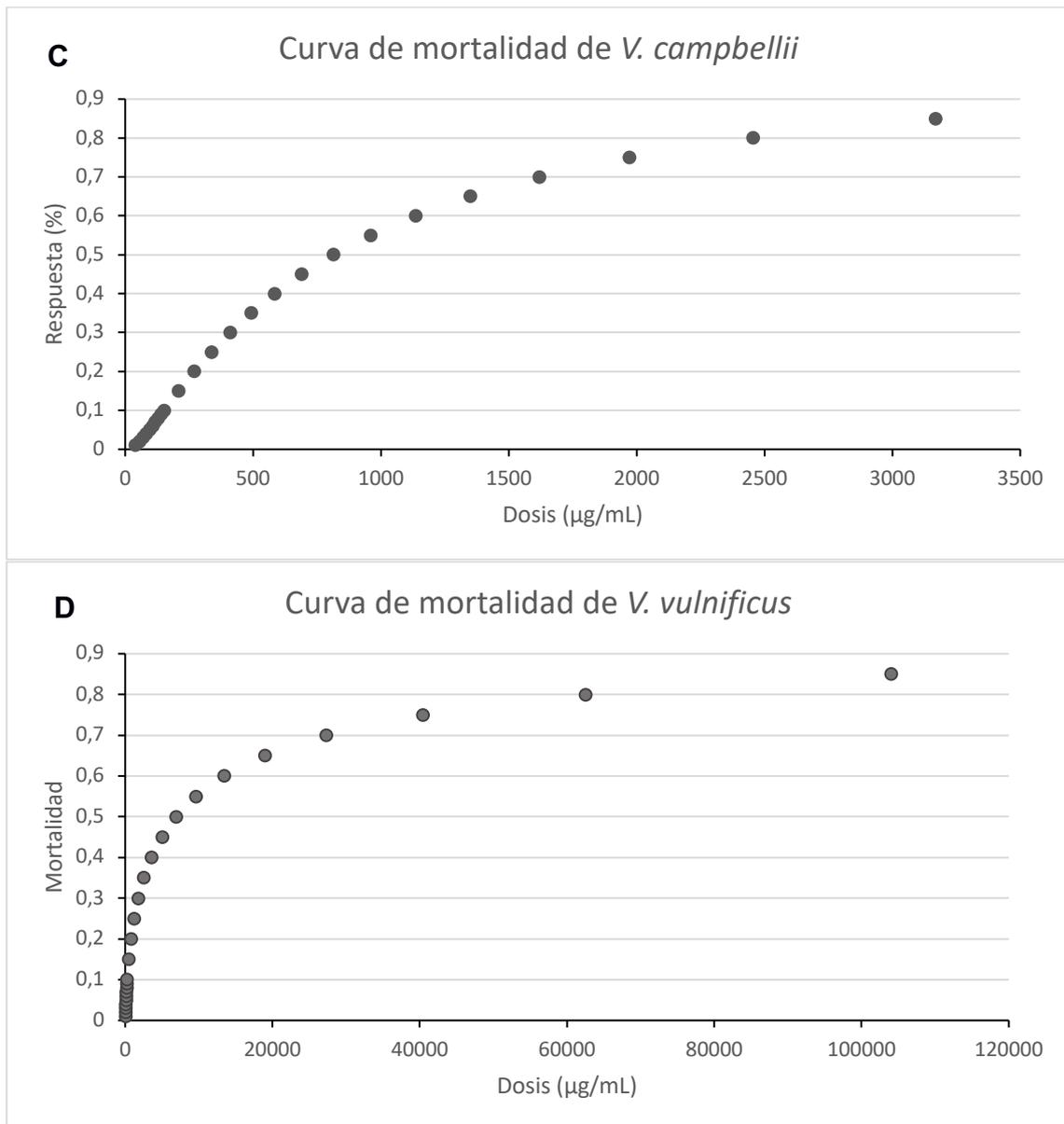


Figura 3.5 Curvas de mortalidad de *Vibrio* spp. cultivados con aceite esencial de orégano.

El LD₅₀ es la dosis administrada de una sustancia que se puede esperar que cause la muerte del 50% de la población dosificada (Gad, 2014). El análisis cuantitativo de los valores de LD₅₀ calculados, mostraron un menor valor para *V. harveyi*, lo que indica que este *Vibrio* es más sensible al aceite esencial de orégano en relación a las otras cepas analizadas, seguido por *V. parahaemolyticus*. Por el contrario *V. campbellii*, fue la cepa que obtuvo un valor de LD₅₀ más alto en comparación a las otras cepas, es decir, se necesita administrar una dosis más alta para matar la mitad de la población

bacteriana. Cabe recalcar que, a pesar de que el LD₅₀ de *V.vulnificus* fue la mayor de todas, el valor excede por mucho la dosis esperada, por lo que es necesario evaluar concentraciones que estén entre un rango de 1125 a 562 µg/mL para poder estimar de forma correcta el valor del LD₅₀.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Con la finalidad de evaluar bioproductos con posible actividad antivirulencia, reduciendo costos y tiempo, en este trabajo se estandarizó con éxito un método basado en la reducción del compuesto MTT que mida la viabilidad de vibrios patógenos del camarón (Ver apéndice B), tomando como referencia la metodología de estudios previamente realizados, por lo que se concluye que:

1. Las cuatro cepas de vibrios estudiadas tienen la capacidad de reducir el compuesto MTT a cristales de formazán, determinando así que *V. campbellii*, es la cepa que mayor formazán genera con respecto a los otros vibrios evaluados.
2. La cantidad de formazán producido por los vibrios, generalmente cuantificado por espectrofotometría, corresponde la cantidad de células vivas en el cultivo bacteriano.
3. La validación de la prueba usando un producto natural con propiedades de antivirulencia (aceite esencial de orégano) a distintas concentraciones, permite observar el efecto dosis-respuesta, es decir, muestra cómo la viabilidad bacteriana es afectada de forma diferente dependiendo de la dosis de producto añadido en el cultivo bacteriano.
4. *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* son las cepas de vibrios que mejor muestra el efecto de dosis-respuesta a las concentraciones evaluadas en este estudio.
5. Los valores de viabilidad al evaluar el aceite esencial de orégano difieren para cada cepa de vibrios lo que indica la sensibilidad del método de

reducción del MTT para evaluar el efecto de bioproductos frente a vibrios patógenos del camarón.

6. Las concentraciones de antibiótico oxitetraciclina evaluadas en este estudio, fueron letales para todas las cepas vibrios, de modo que, no se observó la formación de cristales de formazán en los cultivos bacterianos.
7. Mediante el método de reducción del MTT también es posible calcular el LD₅₀ determinando que, *V. harveyi* es la cepa de vibrio más sensible al aceite esencial de orégano en relación con las otras cepas estudiadas.
8. El método de reducción del MTT, constituye una alternativa eficaz a las pruebas microbiológicas tradicionales para evaluar el efecto antibacteriano de productos naturales y sintéticos de manera más simple, rápida y económica.

Recomendaciones

1. Aplicar la técnica de reducción del MTT a los ensayos microbiológicos de rutina para evaluar productos con actividad antimicrobiana.
2. Para estimar correctamente los valores de LD₅₀ de *Vibrio* spp., es importante que se evalúen concentraciones que estén entre un rango de 0 a 100% de afectación de la viabilidad bacteriana.
3. Es imprescindible que todos los pasos del método de reducción del MTT se realicen correctamente y con las condiciones de esterilidad adecuados para obtener los resultados deseados.
4. Al momento de retirar el sobrenadante de los pocillos después de la centrifugación es importante que se evite extraer el pellet bacteriano

para así mantener la cantidad total de formazán generado y no obtener datos atípicos de densidad óptica.

5. La etapa de solubilización de los cristales de formazán usando etanol absoluto (100%) podría mejorarse probando otros solventes orgánicos más eficaces para disolver los cristales de formazán bacterianos, a fin de agilizar el proceso del método de reducción del MTT.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Atterwill, C. K., Davenport-Jones, J., Goonetilleke, S., Johnston, H., Purcell, W., Thomas, S. M., West, M., & Williams, S. (1993). New models for the *In vitro* assessment of neurotoxicity in the nervous system and the preliminary validation stages of a “tiered-test” model. *Toxicology in Vitro*, 7(5), 569–580. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(93\)90090-R](https://doi.org/10.1016/0887-2333(93)90090-R)
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Beltrán, J. M. G., Espinosa, C., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2018). *In vitro* effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 79, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.005>
- Benov, L. (2019). Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. *PLoS ONE*, 14(8), e0219713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219713>
- Bernas, T., & Dobrucki, J. W. (2000). The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380(1), 108–116. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1907>
- Borges, B. A. A., Rocha, J. L., Pinto, P. H. O., Zacheu, T., Chede, A. C., Magnotti, C. C. F., Cerqueira, V. R., & Arana, L. A. V. (2020). Integrated culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and mullet *Mugil liza* on biofloc technology: Zootechnical performance, sludge generation, and *Vibrio spp.* reduction. *Aquaculture*, 735234. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735234>
- Brambilla, E., Ionescu, A., Cazzaniga, G., Edefonti, V., & Gagliani, M. (2014). The influence of antibacterial toothpastes on *in vitro* *Streptococcus mutans* biofilm formation: a continuous culture study. *American Journal of Dentistry*, 27(3), 160–166.
- Bursle, E., & Robson, J. (2016). Non-culture methods for detecting infection. *Australian Prescriber*, 39(5), 171. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2016.059>

- Caro, L. F. A., Mai, H. N., Noble, B., & Dhar, A. K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP AHPND), a chronic disease in shrimp *Penaeus vannamei* population raised in latin America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107424. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>
- CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fifth informational supplement. M100-S25. In *CLSI document M100-S16CLSI*, Wayne, PA (Vol. 32, Issue 1). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cuéllar. (2013). Vibriosis. In *The Center for Food Security & Public Health* (p. 691). Accedido el 4 de junio, 2020, desde <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Dash, P., Avunje, S., Tandel, R. S., Sandeep, K. P., & Panigrahi, A. (2017). Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 25(3), 245–255. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1277973>
- Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., & Rodríguez, J. A. (2018). A simple *in vitro* method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, 5, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., Yang, Q., Zhu, Y., Chen, M., Guo, C., Liu, Z., Wang, W., & Huang, J. (2017). pirABvp-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the Same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1859. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01859>
- Durvasula, R., Subhadra, B., Matthews, S., Hurwitz, I., & Rao, D. V. S. (2019). Paratransgenic Approaches to the Control of Infections of Shrimp: Prospects for Use of *Dunaliella*. In *The Alga Dunaliella*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429061639-16>.
- FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture: Challenges and Opportunities. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://doi.org/92-5->

105177-1

- FAO. (2019). *GLOBEFISH - Información e Análisis Comercial en Pesquerías*. Accedido el 4 de junio, 2020, desde <http://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/1241043/>
- Gad, S. C. (2014). *LD50/LC50 (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50)* (P. B. T.-E. of T. (Third E. Wexler (ed.); pp. 58–60). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00867-8>
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Aranguren, L. F., & Piamsomboon, P. (2017). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 470, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.022>
- Han, Jee Eun, Tang, K. F. J., & Corbin, A. (2018). *Posibles aplicaciones de bacteriófagos para el control de AHPND* « *Global Aquaculture Advocate*. Accedido el 4 de junio, 2020, desde <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/posibles-aplicaciones-de-bacteriofagos-para-el-control-de-ahpnd/>
- Han, Jee Eun, Tang, K. F. J., & Lightner, D. V. (2015). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(3), 245–251. <https://doi.org/10.3354/dao02906>
- Heatley, N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, 38(1), 61–65. <https://doi.org/10.1042/bj0380061>
- Jo, H. Y., Kim, Y., Park, H. W., Moon, H. E., Bae, S., Kim, J., Kim, D. G., & Paek, S. H. (2015). The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. *Experimental Neurobiology*, 24(3), 235–245. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.3.235>
- Jones, J. L. (2014). *Vibrio*. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Third Edit, Vol. 3, pp. 691–698). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00345-1>
- Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., & Hirono, I. (2015). Draft Genome Sequence of Non-*Vibrio parahaemolyticus* Acute Diseased Shrimp in Vietnam. *Genome*

- Announcements*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00978-15>. Copyright
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 271–297). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang, S. H., Yeh, M. De, Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H. o., Lo, C. F., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006-1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., Qin, J. G., & Chen, L. (2018). Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 26(3), 381–399. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1440530>
- Liu, L., Xiao, J., Zhang, M., Zhu, W., Xia, X., Dai, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>
- Lü, L., Zhang, L., Wai, M. S. M., Yew, D. T. W., & Xu, J. (2012). Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*, 26(4), 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.02.006>
- Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., & Palomino, J. C. (2005). Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4), 500–505. <https://doi.org/10.1093/jac/dki023>
- Morales-Covarrubias, M. S. (2008). Enfermedades Bacterianas. In *Guía técnica-patología e inmunología de camarones penaeidos*. (pp. 117–134). Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- NCCLS. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition. *Approved Standards*.
- Neela, F. A., Nonaka, L., & Suzuki, S. (2007). The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. *Journal of Microbiology*, *45*(1), 64–68.
- Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In *Nanoparticulate Drug Delivery* (pp. 123–155). <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>
- Raja, R. A., Sridhar, R., Balachandran, C., Palanisammi, A., Ramesh, S., & Nagarajan, K. (2017). Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, *67*, 368–381. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.020>
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, *15*(42), 263–268.
- Rao, A. V. (2009). *Vibriosis en la acuicultura del camarón*. <https://aquahoy.com/nocategorizado/7165-vibriosis-en-la-acuicultura-del-camaron>
- Rebouças, R. H., de Sousa, O. V., Lima, A. S., Vasconcelos, F., de Carvalho, P. B., & Vieira, R. H. (2011). Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. *Environmental Research*, *111*(1), 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.09.012>
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Requena, R., Vargas, M., & Chiralt, A. (2019). Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *LWT*, *101*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.093>
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Reyes Muñoz, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–

14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- Sefton, M. V., Uludag, H., Babensee, J., Roberts, T., Horvath, V., & De Boni, U. (1994). Microencapsulation of Cells in Thermoplastic Copolymer (Hydroxyethyl Methacrylate–Methyl Methacrylate). In *Methods in Neurosciences* (pp. 371–386). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-185291-7.50028-X>
- Shi, L., Ge, H. M., Tan, S. H., Li, H. Q., Song, Y. C., Zhu, H. L., & Tan, R. X. (2007). Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chlorosalicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *42*(4), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.11.010>
- Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Griffiths, D., Trong, T. Q., Vu, N. T., Jiravanichpaisal, P., & Briggs, M. (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fisheries Science*, *31*, 29–58.
- Shoham, M. (2013). *Antivirulence agents against bacterial pathogens*. 20-11-2013. Accedido el 4 de junio, 2020, desde <https://www.longdom.org/proceedings/antivirulence-agents-against-bacterial-pathogens-1936.html>
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, *10*(5), e0126987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, *114*(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

- Sykes, J. E., & Rankin, S. C. (2013). Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria. In *Canine and Feline Infectious Diseases* (pp. 17–28). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-X>
- Tachon, S., Michelon, D., Chambellon, E., Cantonnet, M., Mezange, C., Henno, L., Cachon, R., & Yvon, M. (2009). Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, *155*(9), 2941–2948. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029678-0>
- Teng, T., Liang, L., Chen, K., Xi, B., Xie, J., & Xu, P. (2017). Isolation, identification and phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from *Litopenaeus vannamei*. *PLoS ONE*, *12*(10), e0186135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186135>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, *105*(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. (2003). Abundance of potentially pathogenic microorganisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiological Research*, *158*(4), 299–308. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00208>
- Wachsmann, P., & Lamprecht, A. (2012). Polymeric nanoparticles for the selective therapy of inflammatory bowel disease. In *Methods in Enzymology* (pp. 377–397). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391860-4.00019-7>
- Wang, F., Cao, L., & Hu, S. (2007). A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *8*(8), 549–554. <https://doi.org/https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0549>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Yam, K. L., & Lee, D. S. (2012). *Emerging food packaging technologies: Principles and practice*. Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095664>

APÉNDICES

APÉNDICE A: Curvas de calibración de *Vibrio* spp.

Tabla: Recuentos en placa y densidad óptica de *V. harveyi* en el tiempo

Tiempo (hora)	O.D. _{620 nm}	Recuentos
0	0,079	2,41E+03
1	0,082	6,46E+03
2	0,094	3,15E+04
3	0,091	5,91E+04
4	0,101	1,02E+05
5	0,134	8,88E+05
6	0,174	3,49E+06
7	0,21	8,27E+07
8	0,27	5,36E+08
9	0,399	1,95E+09
10	0,439	4,25E+09

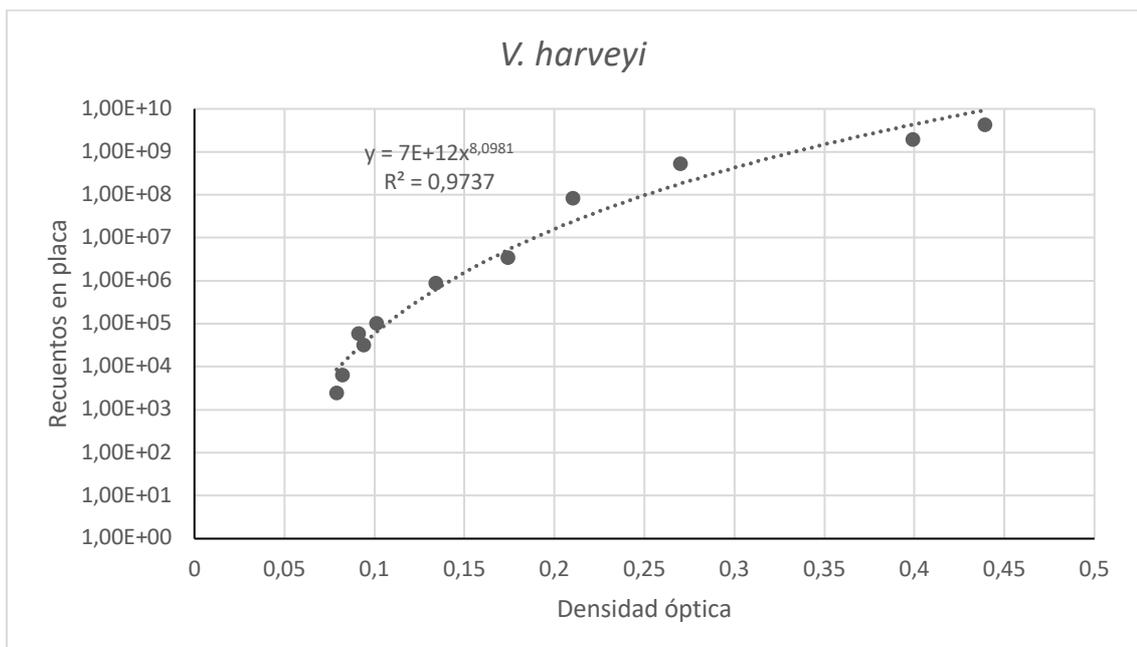


Figura. Curva de calibración (Densidad óptica vs Conteo en placa) para *V. harveyi*

Tabla: Recuentos en placa y densidad óptica de *V. campbellii* en el tiempo

Tiempo (hora)	O.D. 620 nm	Recuentos
0	0,079	1,41E+03
1	0,082	2,46E+03
2	0,094	3,15E+04
3	0,111	7,91E+04
4	0,131	1,02E+05
5	0,164	8,88E+05
6	0,201	3,49E+06
7	0,26	2,17E+07
8	0,31	1,36E+08
9	0,399	1,95E+09
10	0,439	3,35E+09

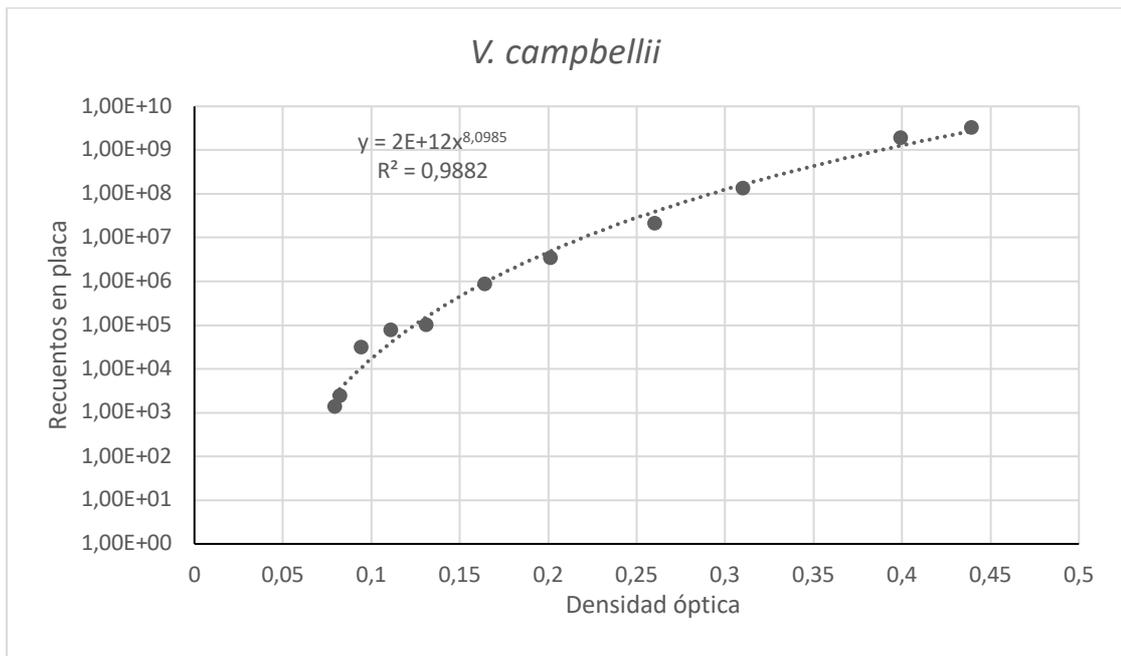


Figura. Curva de calibración (Densidad óptica vs Conteo en placa) para *V. campbellii*

Tabla: Recuentos en placa y densidad óptica de *V. parahaemolyticus* en el tiempo

Tiempo (hora)	O.D. _{620 nm}	Recuentos
0	0,079	4,10E+02
1	0,082	2,46E+03
2	0,094	2,75E+04
3	0,091	7,91E+04
4	0,101	1,02E+05
5	0,134	5,58E+05
6	0,174	3,49E+06
7	0,232	1,03E+08
8	0,276	5,36E+08
9	0,332	1,95E+09
10	0,411	7,25E+09

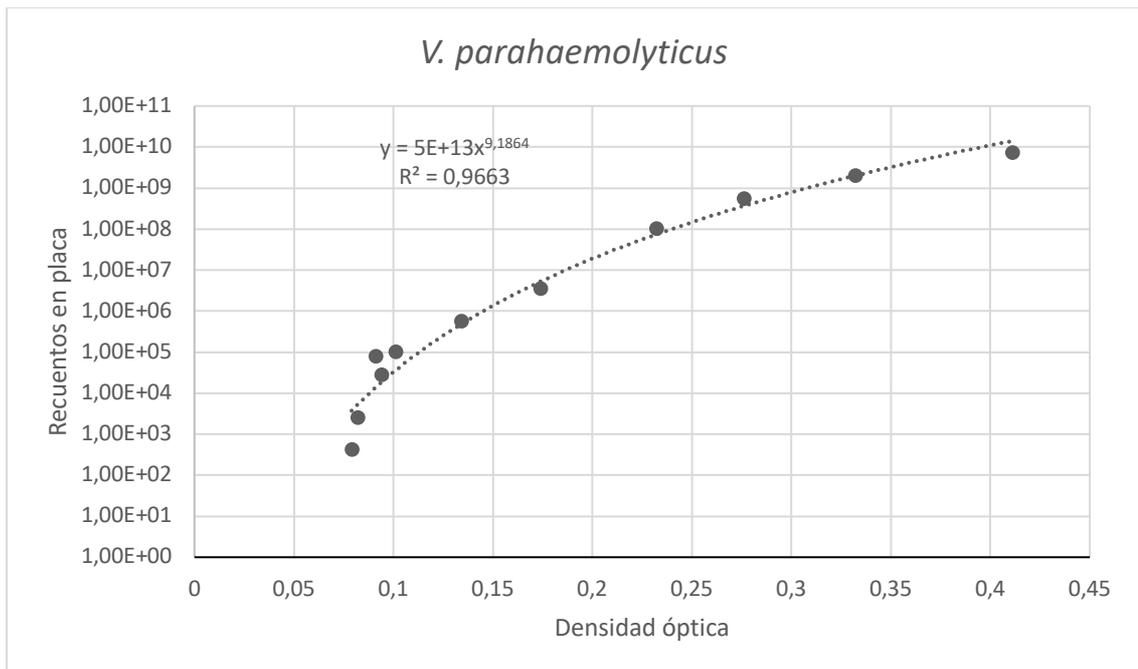


Figura. Curva de calibración (Densidad óptica vs Conteo en placa) para *V. parahaemolyticus*

Tabla: Recuentos en placa y densidad óptica de *V. vulnificus* en el tiempo

Tiempo (hora)	O.D. _{620 nm}	Recuentos
0	0,069	4,10E+02
1	0,077	7,46E+03
2	0,084	3,15E+04
3	0,101	3,91E+04
4	0,101	1,02E+05
5	0,134	8,88E+05
6	0,174	3,49E+06
7	0,299	1,03E+08
8	0,34	4,36E+08
9	0,399	1,95E+09
10	0,439	4,25E+09

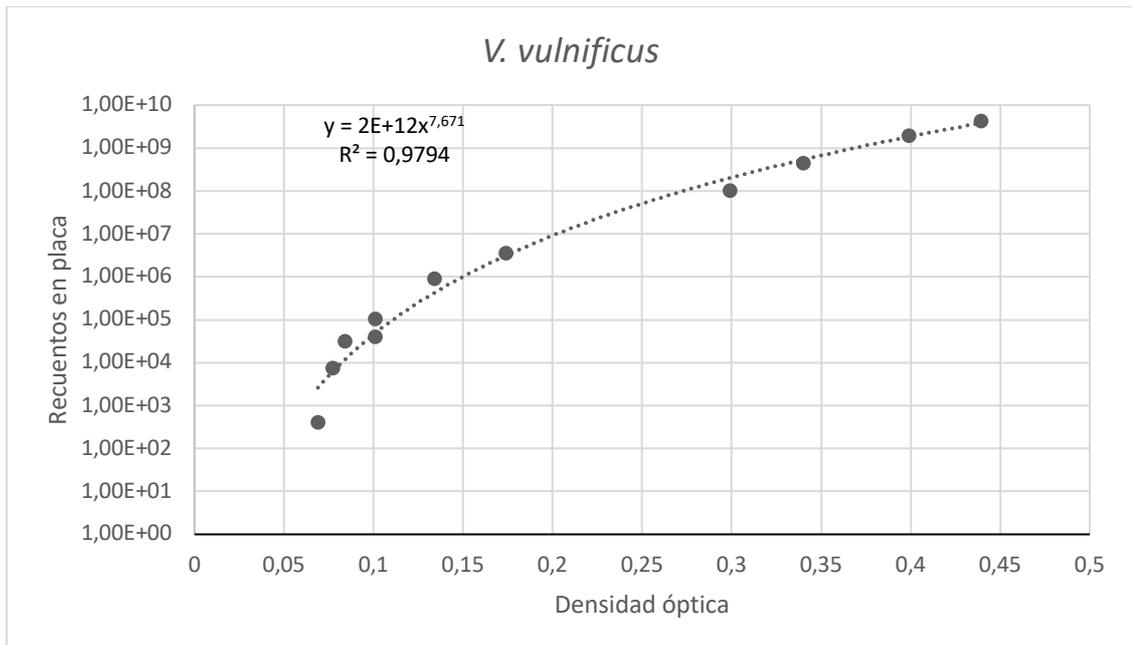


Figura. Curva de calibración (Densidad óptica vs Conteo en placa) para *V. vulnificus*

APÉNDICE B

Protocolo para medir la viabilidad bacteriana a fin de evaluar productos contra vibrios patógenos del camarón

1. Preparar las diferentes concentraciones del producto a evaluar (dosis subletales), usando solución salina (2% NaCl) como solvente, para observar un efecto de dosis respuesta en función de la cantidad de producto evaluado, respecto a la viabilidad y la cantidad de cristales de formazán formado por las bacterias.
2. En una microplaca de 96 pocillos, dispensar 160 μL de medio de cultivo LB + 2% NaCl en cada pocillo.
3. Agregar 20 μL del producto a evaluar a las concentraciones previamente preparadas (una concentración diferente por columna).
4. Añadir 20 μL de inóculo de *Vibrio* a una concentración de 1×10^7 UFC/mL (volumen final por pocillo 200 μL).
5. Para el control positivo, en lugar de añadir el producto, colocar 20 μL de solución salina.
6. Para el blanco añadir 40 μL de solución salina, en lugar de la suspensión bacteriana y del producto.
7. Realizar 7 réplicas por tratamiento y controles.
8. Incubar la placa a 30 °C por 4 horas.
9. Agregar a todos los pocillos 10 μL de solución de MTT (5 mg/mL).
10. Incubar la placa por 2 horas a 30 °C.
11. Centrifugar la placa por 10 minutos a 2 500 g a una temperatura de 24 °C.
12. Retirar cuidadosamente el sobrenadante de cada pocillo de la microplaca sin coger el pellet bacteriano ubicado en el fondo de cada pocillo.
13. Solubilizar el pellet bacteriano con 200 μL de etanol absoluto en todos los pocillos, homogenizando la solución por pipeteo.
14. Medir la densidad óptica a 620 nm usando un lector de microplacas.
15. Calcular el porcentaje de viabilidad bacteriana, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad bacteriana} = \frac{\text{DO de bacterias expuestas al tratamiento}}{\text{DO de bacterias no expuestas}} \times 100\%$$

DO = Densidad óptica a 620 nm