



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

**Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para
controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus*
(*Litopenaeus*) *vannamei***

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGA MARINA

AUTORA:

JESSICA KARINA REYES DELGADO

TUTOR UPSE:

HBLGO. DANIEL RUILOVA DÁVILA, MSC.

TUTOR EXTERNO:

AC. MARIA AUXILIADORA SOTOMAYOR MACÍAS, MSC.

**LA LIBERTAD – ECUADOR
2018**

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

**Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para
controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus*
(*Litopenaeus*) *vannamei*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Previa a la obtención del Título de:

★ **BIÓLOGA MARINA**

AUTORA:
JESSICA KARINA REYES DELGADO

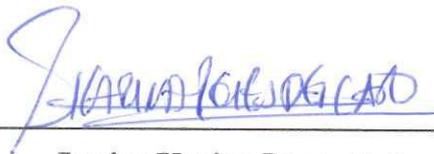
TUTOR UPSE:
HBLGO. DANIEL RUILOVA DÁVILA, MSC.

TUTOR EXTERNO:
AC. MARIA AUXILIADORA SOTOMAYOR MACÍAS, MSC.

**LA LIBERTAD – ECUADOR
2018**

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por hechos, ideas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, me corresponden exclusivamente y el patrimonio intelectual al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM- ESPOL y a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

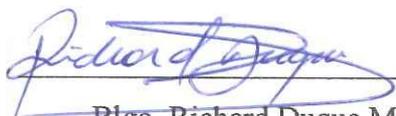


Jessica Karina Reyes Delgado
C.I. 092726474-7

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado primeramente a Dios por darme la vida para poder llevar a cabo todas mis metas, a mis padres por su dedicación, a mi esposo por su apoyo y ayuda incondicional y a mi hijo por ser el motor y mi alegría de cada día.

TRIBUNAL DE GRADUACION



Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.

**DECANO (E) FACULTAD CIENCIAS
DEL MAR**



Blga. Tanya González Banchón, Mgt.

**DIRECTORA (E) CARRERA BIOLOGIA
MARINA**



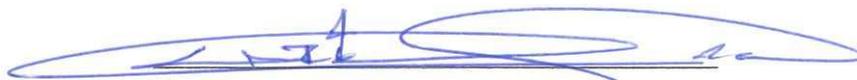
Blga. Janeth Galarza, Ph.D.

DOCENTE DE ÁREA



HBlgo. Daniel Ruilova Dávila, M.Sc.

DOCENTE TUTOR



Abg. Víctor Coronel Ortiz, Mgt

SECRETARIO GENERAL (E)

Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*

Karina Reyes ^a, Daniel Ruilova ^a, María Sotomayor ^b

^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

^b Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

Resumen

*La sensibilidad de bacterias aisladas de larviculturas de camarón *Penaeus vannamei* a diferentes antibióticos y productos comercializados en la industria acuícola ecuatoriana (ácidos orgánicos, probióticos y aceites esenciales) fue analizada a través de antibiogramas y análisis de concentración mínima inhibitoria. Los resultados mostraron baja sensibilidad en la mayoría de los aislados a muchos de los productos analizados. A nivel de probióticos, solo los productos PRO5 Y PRO10 inhibieron el 43% y 48% de los aislados. Mientras que, el aceite esencial AES1 inhibió el crecimiento del 48% de los aislados y el ácido orgánico AC10 inhibió al 95%. Sin embargo, los aislados fueron sensibles a cloranfenicol y enrofloxacin (100 y 95% de los aislados, respectivamente); en tanto que el 24% de los aislados fue sensible a furazolidona. En el caso de los antibióticos autorizados para uso en acuicultura, 43% y 100% de las bacterias fueron sensibles para oxitetraciclina y florfenicol, mediante antibiograma de discos de antibióticos. La concentración mínima inhibitoria para oxitetraciclina mostró diferencias de sensibilidades entre aislados: entre 5 a 50 ppm (29 % de las cepas), entre 100 y 500 ppm (62 % de las cepas) y >3500 ppm (9 % de las cepas). Además, el 81% y 19% de las cepas fueron sensibles a florfenicol a concentraciones <10 ppm y entre 20 y 40 ppm, respectivamente. En tanto que, el 100% de los aislados fue sensible a concentraciones de enrofloxacin de entre 0,1 y 10 ppm. La identificación molecular determinó la presencia de siete especies de *Vibrios*, con predominancia de *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, no existiendo relación a la identificación mediante la prueba de API 20 NE, que determinó predominancia de *Aeromonas*, *V. vulnificus*. La histopatología de los animales donde se aislaron las cepas de este estudio indicó que el 50% de los laboratorios analizados presentaron necrosis severa a nivel del hepatopáncreas*

Palabras claves: Sensibilidad, agentes terapéuticos, bacteria, larvicultura, *Penaeus vannamei*

ABSTRACT

*The sensitivity of isolated bacteria from *Penaeus vannamei* shrimp larvicultures to different antibiotics and products marketed in the Ecuadorian aquaculture industry (organic acids, probiotics and essential oils) was analyzed through antibiograms and tests of minimal inhibitory concentration. The results showed low sensitivity in most of the isolates to many of the tested products. Only two probiotics (PRO5 and PRO10) inhibited the 43% and 48% of the isolates. While, the essential oil AES1 inhibited the growth of 48% of the isolates and the organic acid AC10 inhibited 95% of the isolates. However, the isolates were sensitive to chloramphenicol and enrofloxacin (100 and 95% of the isolates, respectively) and 24% of the isolates were sensitive to furazolidone. In the case of antibiotics authorized for use in aquaculture, 43% and 100% of the bacteria were sensitive to oxytetracycline and florfenicol by the antimicrobial susceptibility test discs. The minimal inhibitory concentration for oxytetracycline showed differences in sensitivities between isolates: between 5 to 50 ppm (29% of the strains), between 100 and 500 ppm (62% of the strains) and > 3500 ppm (9% of the strains). In addition, 81% and 19% of the strains were sensitive to florfenicol at concentrations <10 ppm and between 20 and 40 ppm, respectively. Whereas, 100% of the isolates were sensitive at concentrations of enrofloxacin between 0.1 and 10 ppm. The molecular identification determined the presence of seven species of *Vibrios*, with predominance of *V. harveyi* and *V. alginolyticus*, without relation to the identification by the API 20 NE test, where the predominance was mainly *Aeromonas* and *V. vulnificus*. The histopathology analysis showed that larvae from 50% of the analyzed laboratories presented severe necrosis in the hepatopancreas.*

Key words: Sensitivity, therapeutic agents, bacteria, larviculture, *Penaeus vannamei*.

1. Introducción

El cultivo de camarón blanco *P. vannamei*, empezó como actividad productiva en Ecuador a finales de los años 60 e inicios de 1972 en la provincia del Oro, expandiéndose a las provincias de Guayas, Manabí y Esmeraldas. En la actualidad, es el tercer producto de exportación constituyendo una de las principales actividades económicas que enmarca el desarrollo de otros sectores como larviculturas, plantas de balanceado, empacadoras, exportadoras y distribuidora de insumos.

Más de 146 larviculturas han sido construidas desde 1979, produciendo mensualmente alrededor de 7203 millares de post larvas (PL 7-20) de forma continua al sector camaronero ecuatoriano y extranjero (Elgoul, 2016). Desde que la industria camaronera se consolidó en el país han surgido problemas asociados con varios agentes patógenos tanto en larvicultura como en los sistemas de engorde de camarón. A nivel de larviculturas se ha observado problemas de toda índole; destacándose problemas graves vinculados con brotes de enfermedades. Reportes de investigadores indican que los camarones son susceptibles a microorganismos de origen viral y bacteriano (Morales, 2012), generando grandes pérdidas económicas e impactando el nivel de producción; convirtiendo a las enfermedades causadas por bacterias en uno de los impedimentos en las etapas larvales del camarón (Coutteau, 2016) y siendo de relevancia considerable debido a los altos índices de mortalidad (Baticados, et al., 1990). Algunos autores afirman que estas enfermedades están estrechamente ligadas a las prácticas inadecuadas en el uso de productos químicos, incluyendo antibióticos, mala calidad de suelo, excesiva producción (Subasinghe, et al., 2009).

El género *Vibrio* es comúnmente reportado como agente causal de enfermedades en otros países productores (Gómez-Gil, et al., 2001). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio splendidus* son los principales causantes de vibriosis en tanques de engorde y cultivos larvarios en México. También, (Vandenbergue, et al., 1999), reportaron al *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* como causales de enfermedad en larvas de *Penaeus chinensis*. En Ecuador se ha reportado los Síndromes de Bolitas (Blancas y negras), Síndrome de Zoea, vibriosis y luminiscencia (Robertson, et al., 1998; Vandenbergue, et al., 1999 & Aguirre Guzmán, 2001). Sin embargo en camarones peneidos no todas las especies de *vibrios* son patógenos, siendo solo unos pocos los que afectan las fases de larvicultura y engorde, entre las cuales las principales especies causantes de enfermedades destaca el *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio vulnificus* (Cuellar-Anjel, 2013).

Actualmente el patógeno más emergente a nivel mundial es el *Vibrio parahaemolyticus* bacteria que causa la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Sin embargo, Esta enfermedad también puede ser causada por otras especies de *vibrios* (*V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. owensii*) (Mohney, 2015).

Dentro de las medidas empleadas para controlar problemas bacterianos destacan la aplicación de antibióticos, pero se ha comprobado que el uso indiscriminado de estos productos ha generado la existencia de cepas multi resistentes (National Institutes of Health, 2008); que propicia la transmisión horizontal de genes de resistencia; abriendo paso al uso de productos naturales como probióticos, ácidos orgánicos y fitobióticos como medidas de control más eficientes.

Los probióticos son microorganismos que suplementados modifican la microbiota intestinal beneficiando la fisiología del hospedero con el propósito de mejorar la salud y tener la capacidad de mejorar la calidad del agua y sedimentos (Reyes & Tomalá, 2011). Un buen probiótico debe poseer varias características tales como colonización y adhesión al tracto gastrointestinal, producción de antibióticos, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno (Vázquez, et al. 2005; Vázquez, et al., 2006), capacidad inmunoestimulante (Chiu, et al. 2007) o capacidad para convertir la materia orgánica en biomasa bacteriana (Salmin, et al. 2001). Los ácidos orgánicos son compuestos que contienen uno o más grupos carboxílicos pudiendo ser insaturados, hidroxílicos, fenólicos o multicarboxílicos, actúan sobre la pared celular de la bacterias, acidificando su citoplasma e incrementando la muerte celular (Lückstädt & Kühlmann, 2013). Los aceites esenciales son compuestos naturales que están constituidos por metabolitos secundarios para su defensa. Se ha determinado que estos productos poseen actividad antimicrobial, antiviral, antifungal, insecticidal, antioxidante e inmunoestimulante (Dunn, 2002; Kamboj, 2000), que degradan la pared celular, dañando la membrana citoplasmática (Wilson & Droby, 2000).

Actualmente las larviculturas de Ecuador utilizan protocolos amigables para controlar enfermedades bacterianas; pero es necesario evaluar la efectividad de los mismos con las bacterias causantes de los problemas.

El objetivo general de este estudio fue evaluar mediante pruebas *in vitro* la sensibilidad de bacterias aisladas de larviculturas de *P. vannamei* a productos disponibles en la industria, tales como: antibióticos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y probióticos.

2. Materiales y Métodos

2.1 Muestreo

Muestras de larvas enfermas de *P. vannamei* de 18 laboratorios de larvas de la provincia de Santa Elena (Ecuador) fueron transportadas a las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y analizadas mediante microbiología tradicional.

2.2 Procesamiento de muestras

En el laboratorio, un gramo por muestra fue macerado, previamente lavado en solución estéril de cloruro de sodio (2%). A partir de este macerado se realizaron diluciones seriadas de 1/10 en solución estéril de NaCl y se sembraron alícuotas duplicadas de 100 µL en agar marino Difco™ y agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS, Difco™). Todas las placas fueron incubadas a 30°C (Incubadora Thermo Scientific). Se realizaron recuentos bacterianos después de 1 a 2 días de crecimiento, a partir de placas que contenía entre 30 a 300 colonias por placa. Los recuentos bacterianos fueron expresados como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo.

2.3 Selección y aislamiento bacteriano

De un total de 125 aislados, se seleccionaron sólo 21 bacterias que cumplieron los siguientes criterios: a) Diferentes morfologías, b) Luminiscencia, c) Conteo bacteriano $>10^5$ UFC g⁻¹ (TCBS), $>10^6$ UFC g⁻¹ (Agar Marino). Estas bacterias fueron aisladas, codificadas y conservadas bajo congelación a -80 empleando glicerol al 20% como criopreservante.

2.4 Sensibilidad bacteriana

Para evaluar la eficiencia productos comerciales utilizados en larviculturas de camarón frente a las bacterias aisladas se realizaron pruebas de sensibilidad con cuatro tipos de agentes terapéuticos: antibióticos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y probióticos.

2.4.1 Antibióticos

La sensibilidad de las bacterias a cinco antibióticos [oxitetraciclina (30 µg), florfenicol (30 µg)], [cloranfenicol (30 µg), furazolidona (100 µg) y enrofloxacin (30 µg)], se determinó por: (1) método de difusión de agar usando discos BBL™ Sensi-Disc™, (2) determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) o método de dilución *in vitro*. Para el método (1), las cepas fueron activadas en agar tripticasa de soya (TSA, Difco™) e incubadas por 24 horas a

30°C. Posteriormente, fueron transferidas de forma individual a medio líquido de TSB con NaCl al 2% e incubadas por 4 horas.

Las suspensiones bacterianas fueron estandarizadas a la concentración de 10^6 bacterias mL⁻¹, utilizando patrón McFarland 0.5. Se inoculó 100 µL en agar TSA mediante hisopado antes de colocar los discos por duplicado en las placas que fueron incubadas por 48 h a 30°C. La lectura de los halos de inhibición fue realizada en milímetros (mm) e interpretada como sensible, intermedia o resistente siguiendo los patrones indicados por el distribuidor de los discos de sensibilidad. Para el método (2) se utilizaron los antibióticos permitidos en acuicultura (oxitetraciclina y florfenicol) junto a enrofloxacin antibiótico no permitido. Las bacterias aisladas fueron activadas en medio líquido TSB e incubadas a 30°C durante 4 h. Las suspensiones bacterianas fueron estandarizadas a concentración de 10^6 bacterias mL⁻¹, siguiendo el patrón de McFarland 0.5. Diez gramos de antibiótico fué diluído en 100 ml de caldo de cultivo TSB con cloruro de sodio al 2%. A partir de esta concentración se realizaron otras concentraciones en el mismo medio de cultivo (1 a 3500 ppm), siendo colocado por triplicado en una microplaca en un volumen de 200 µL. Cada pocillo fué inoculado con 20 µL de suspensión bacteriana, incluyendo el control positivo (crecimiento bacteriano en cultivo TSB, sin antibióticos), excepto el control negativo (medio de cultivo sin antibiótico). Las placas fueron incubadas a 30 °C entre 24 y 48 h. El crecimiento bacteriano fué detectado por densidad óptica a 620 nm (lector de ELISA, Thermo Scientific) y los resultados fueron transformados en porcentaje de inhibición en comparación con el control positivo (crecimiento máximo del 100%). Considerándose como cepas resistente cuando la inhibición fue superior al 12%, intermedio entre 0,1 y 11%, y sensible cuando hubo ausencia de crecimiento. Similar metodología se realizó para el florfenicol y enrofloxacin, entre las concentraciones 0,1 a 1000 ppm.

2.4.2 Probióticos

Diez probióticos denominados, como PRO1, PRO2, PRO3, PRO4, PRO5, PRO6, PRO7, PRO8, PRO9 y PRO10 fueron utilizados para determinar la sensibilidad de los aislados. Cada probiótico fué activado en medio sólido TSA por 24 h, previo su utilización. Se tomó discos de este cultivo (biofilm) por duplicado y depositados sobre cada aislado a semejanza a un antibiograma con antibióticos. La incubación y lectura fue similar al antibiograma de antibióticos. El diámetro de los halos fue medido en milímetros (mm) fué transformado a categorías, considerando como: sensible (halo ≥ 8 mm), resistente (halo ≤ 5 mm) e intermedio (halo entre 5 y ≤ 8 mm).

2.4.3 Ácidos orgánicos

Mediante el MIC, diez productos comercializados como ácidos orgánicos (AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, AC6, AC7, AC8, AC9 y AC10) fueron utilizados para determinar la sensibilidad de los aislados. El procedimiento fue similar al MIC de antibióticos. Las concentraciones analizadas fueron entre 100 a 3500 ppm.

2.4.4 Aceites esenciales

Dos aceites esenciales (AES1 y AES2) fueron utilizados para el análisis de sensibilidad por el método de difusión en agar *in vitro*, utilizando papel de filtro estéril (6 mm de diámetro) impregnados con 100 µL a una concentración de 100 ppm. La metodología de incubación, lectura e interpretación fue similar al de los probióticos. La concentración analizada de ambos productos fue 100 ppm, considerando el historial con otras bacterias donde esta concentración era la concentración mínima inhibitoria. Con *pers. Domínguez*.

2.5 Toxicidad de productos

Los posibles efectos citotóxicos de los productos con mayor actividad antimicrobiana fueron evaluados *in vitro* mediante el protocolo MTT (Domínguez, et al. 2018).

El análisis de toxicidad celular fue realizado por el departamento de cultivo celular del CENAIME-ESPOL. Las concentraciones evaluadas para oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin comprendieron desde 1000 a 6000 ppm. En el caso del producto AC10, las concentraciones fueron desde 100 a 1000 ppm.

2.6 Histopatología

Las muestras de larvas de 10 larviculturas fueron fijadas con solución Davidson (alcohol, formalina, ácido acético glacial) y posteriormente procesadas siguiendo el protocolo de Bell & Lightner, (1988). Secciones de 5 µm fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Se realizó observaciones histopatológicas por microscopia de luz blanca entre 10 a 20 larvas de forma completa. Las lesiones observadas fueron categorizadas como: normales, leves, moderadas, graves y severas, asignándoles los valores de 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Para cada muestra, se calculó la severidad promedio de las lesiones en las larvas afectadas (sumatoria de severidad en las larvas afectadas/número de larvas afectadas) y el porcentaje de las larvas afectadas en cada muestra (número de larvas afectados/número de larvas de la muestra)*100).

2.7. Identificación fenotípica y molecular

La identificación bioquímica de las bacterias se realizó mediante el kit API 20 NE. La identificación molecular

la realizó el departamento de Biología Molecular del CENAIME-ESPOL, mediante análisis de secuencias del gen 16S rARN (Avannis, et al., 1994).

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada por Macrogen Inc (Seoul, Korea). Para la identificación molecular se compararon las secuencias de 16S rARN de los aislados con las secuencias del GenBank.

Resultados

3.1 Sensibilidad bacteriana

El antibiograma para antibióticos mostró que los aislados fueron 100% sensibles a cloranfenicol y florfenicol y 95% para enrofloxacin. En contra parte, el 76% fue resistente a furazolidona y 43% a oxitetraciclina. Observándose para oxitetraciclina una sensibilidad intermedia (29% de los aislados) (Figura 1 y 2).

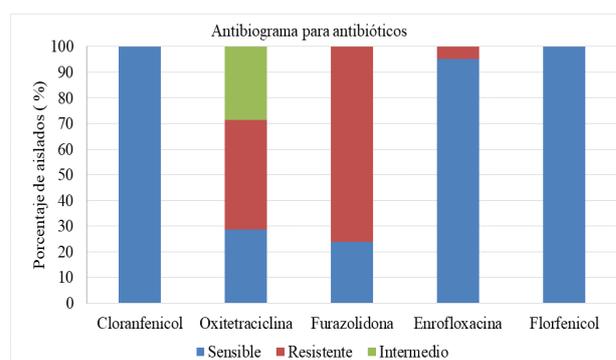


Figura 1. Sensibilidad bacteriana a antibióticos.

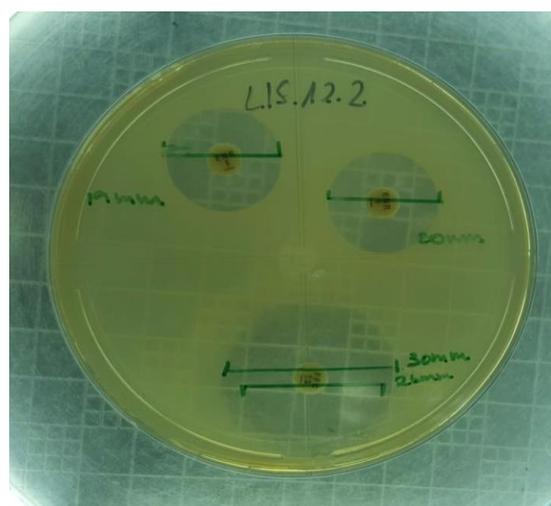


Figura 2. Antibiograma por difusión con discos de enrofloxacin y florfenicol en el que se observa la presencia de halos de inhibición.

El MIC para oxitetraciclina determinó que el 23% de las cepas fueron sensibles a 5 ppm, el 67 % a concentraciones entre 50 y 500 ppm y 10% fue resistente hasta concentraciones de 3500 ppm. La sensibilidad de las cepas a florfenicol fué del 81% a concentraciones <10 ppm y 19% a concentraciones entre 20 y 40 ppm. Mientras que, para enrofloxacin el 81% de los aislados fué sensible a concentraciones <10 ppm y 19 % a 20 ppm (Tabla 1). El 81 % de los aislados fue sensible a concentraciones de florfenicol <10 ppm y 19 % entre 20 y 40 ppm. Mientras que, para enrofloxacin el 100% de los aislados fué sensible entre 0,1 a 10 ppm (Tabla 1).

El 48 y 43% de los aislados fué sensible a los probióticos Pro5 y Pro10, respectivamente. Observándose que entre el 5 y 33% de los aislados mostraron sensibilidades intermedias a siete productos. Mientras que, el 90% fue resistente al probiótico Pro2. (Figura 3).

Tabla1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) a oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin (ppm).

Concentración mínima inhibitoria (ppm)			
Ppm	Oxit	Florf	Enrof
≤ 5	14	43	57
>6-10	5	38	24
20	5	10	19
40-50	5	10	0
100-500	62	0	0
>3500	10	0	0

Dónde: Oxitetraciclina (Oxit), Florfenicol (Florf), Enrofloxacin (Enrof)

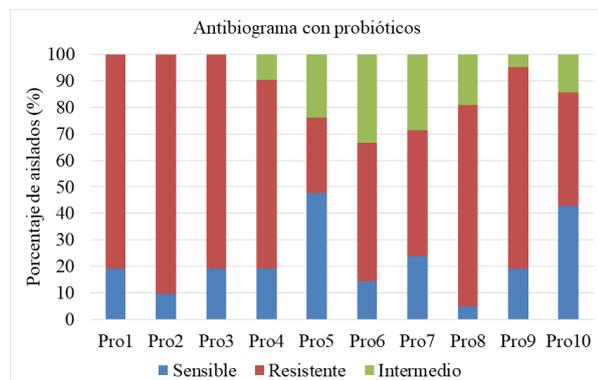


Figura 3. Sensibilidad bacteriana a probióticos comerciales.

El MIC para los ácidos orgánicos mostró que el 95% de las bacterias fueron sensibles a concentraciones

menores a 1000 ppm con el producto (AC10) y el 100% resistentes 5 productos (AC1, AC2, AC3, AC5 y AC8) hasta la concentración 3500 ppm. En tanto que, entre el 86 y 95% de las cepas mostraron sensibilidades intermedias a los productos AC4, AC6, AC7 y AC9 con concentraciones entre 1000 y 2500 ppm (Figura 4).

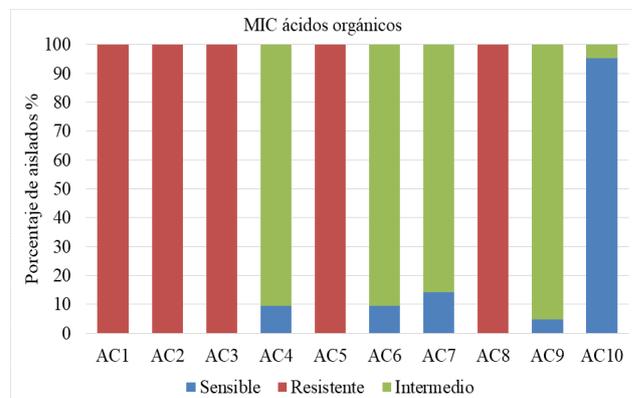


Figura 4. Concentración mínima inhibitoria (MIC) a ácidos orgánicos.

El antibiograma para los aceites esenciales reveló que el 100 y 62% de los aislados fueron resistentes a AES2 y AES1, respectivamente (Figura 5).

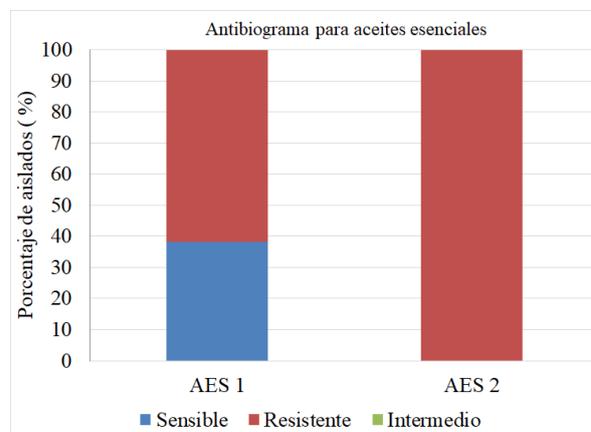


Figura 5. Sensibilidad bacteriana a aceites esenciales.

3.2 Toxicidad celular

La viabilidad *in vitro* de los hemocitos fue superior al 90% al utilizarse oxitetraciclina hasta la concentración de 4000 y florfenicol hasta 2000 ppm, reduciéndose la viabilidad al incrementarse las concentraciones de ambos antibióticos. Sin embargo, la viabilidad celular no fue afectada con enrofloxacin hasta la concentración de 6000 ppm (98% de viabilidad) (Figura 6). Con el ácido orgánico AC10 la viabilidad de los hemocitos fue reducida a todas las concentraciones analizadas (Figura 7).

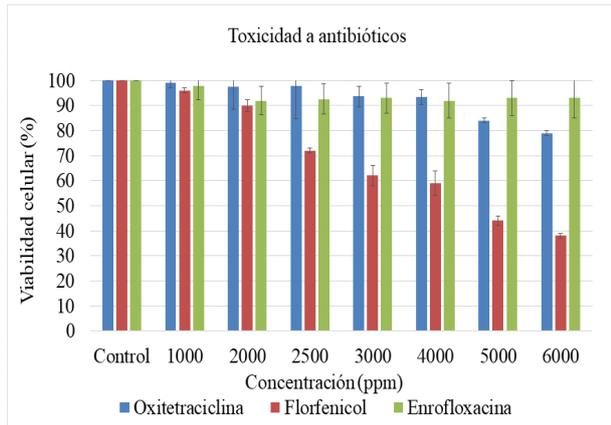


Figura 6. Porcentaje de hemocitos viables al ser expuestos *in vitro* a varias concentraciones de antibióticos

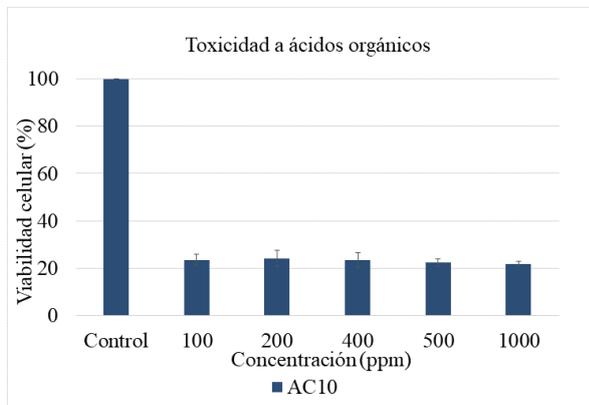


Figura 7. Porcentaje de hemocitos viables al ser expuestos *in vitro* a varias concentraciones de ácidos orgánicos.

3.3 Histopatología

La patología más recurrente en todos los animales fue necrosis en hepatopáncreas y en branquias. Las larvas de 5 de 10 laboratorios (Lab1, Lab 3, Lab 5, Lab 7 y Lab 10) presentaron necrosis en hepatopáncreas en grado grave (G3), presentando esta afectación al menos el 67,8% de los animales. A nivel de branquias, larvas de 6 de 10 laboratorios fueron afectados con una severidad moderada y grave, pero con un bajo porcentaje de animales infectados (< 15,5%), excepto Lab 5 donde el 60% de la muestra presentó necrosis en branquias en grado grave. El Lab 6 no presentó necrosis a nivel de branquias y hepatopáncreas (Tabla 2, Figura 8 y 9)

Tabla 2. Necrosis en branquias y hepatopáncreas en muestras de larvas analizadas por histopatología (grado de severidad en larvas enfermas y porcentaje de animales afectados).

Necrosis				
Branquias			Hepatopáncreas	
	Grado de severidad	Porcentaje de larvas analizadas (%)	Grado de severidad	Porcentaje de larvas analizadas (%)
Lab.1	Moderado	8	Grave	58
Lab.2	Moderado	17	Moderado	17
Lab.3	Grave	11	Grave	77
Lab.4	Normal	0	Grave	30
Lab.5	Grave	60	Severo	70
Lab.6	Normal	0	Normal	0
Lab.7	Normal	0	Grave	81
Lab.8	Leve	38	Moderado	83
Lab.9	Grave	13	Moderado	67
Lab.10	Grave	17	Grave	93



Figura 8. Corte longitudinal de larvas de *Penaeus vannamei*. Hepatopáncreas con lesiones moderadas y pérdidas de estructuras de las paredes de los túbulos del hepatopáncreas (flechas). 4X

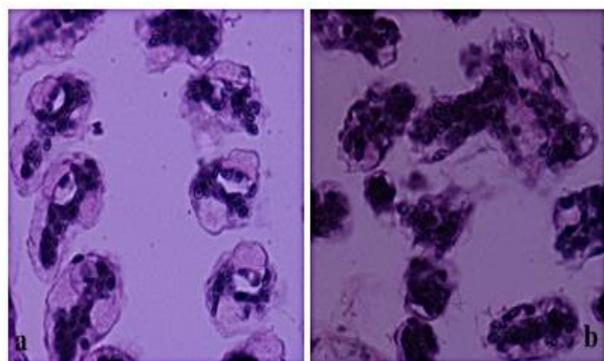


Figura 9. Corte histológico de branquias de *Penaeus vannamei*. 40X. a) lamelas branquiales normales. b) Lamelas branquiales necrosadas.

3.4 Identificación de aislados

En total se identificaron 21 aislados de los cuales, la identificación taxonómica por análisis molecular determinó similitud con 7 especies de *Vibrios*, predominando *V. harveyi* y *V. alginolyticus* con un 33 y 29% respectivamente, seguido de *V. owensii*, *V. campbellii*, con un 10% y *V. sp.*, *V. natriegens* y *V. inhibens* con un 5%.

Sin embargo el sistema API 20 NE clasificó a los aislados en dos géneros (*Aeromonas* y *Vibrios*), predominando las *Aeromonas* con un 52%, seguido del *V. vulnificus* y *parahaemolyticus* con un 14 y 10% respectivamente. No encontrándose coincidencias de identificación entre ambas metodologías. Un 5 y 19% de los aislados no fueron identificados por secuenciación de 16S rARN y API 20 NE, respectivamente (Tabla 3, Figura 10).

Tabla 3. Cuadro comparativo entre sistema de identificación API 20NE versus secuenciación del gen 16S rARN.

16S rARN			API 20 NE		
Especie	%	N° aislados	Especie	%	N° aislados
<i>V. harveyi</i>	33	7	<i>Aeromonas salmonicida</i>	5	1
<i>V. alginolyticus</i>	29	6	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	48	10
<i>V. owensii</i>	10	2	<i>V. vulnificus</i>	14	3
<i>V. campbellii</i>	10	2	<i>V. parahaemolyticus</i>	10	2
<i>V. sp.</i>	5	1	<i>V. alginolyticus</i>	5	1
<i>V. natriegens</i>	5	1	No identificada	19	4
No identificada	5	1			
<i>V. inhibens</i>	5	1			

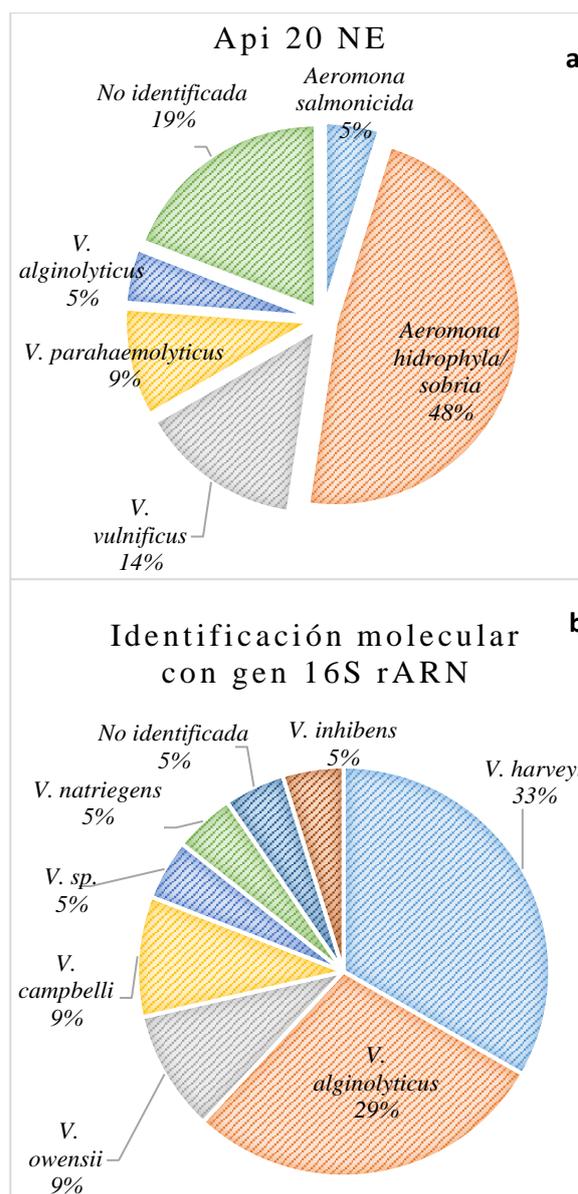


Figura 10. Porcentaje de identificación de especies mediante dos técnicas a) API 20NE y b) Secuenciación por 16S rARN.

4. Discusión

La sensibilidad bacteriana a los productos utilizados para controlar los problemas bacterianos es uno de los puntos más críticos y menos considerados en la toma de decisiones dentro de los procesos de producción. El uso prolongado de oxitetraciclina en la acuicultura ha generado pérdida de sensibilidad bacteriana. Roque et al. (2011), con aislados de México encontró un 29% de sensibilidad a este antibiótico, mientras que Reboucas et al. (2001) con aislados de Brazil encontró un 58% y Vaseeharan et al. (2005) con aislados de India reportó un 10%.

En este estudio los resultados del antibiograma indican que el 29% de los aislados fueron sensibles a oxitetraciclina a 30 µg, con un MIC entre 50 y >3500 ppm (71% de las cepas), lo que confirma la pérdida de sensibilidad de las comunidades bacterianas a este antibiótico. En el caso de florfenicol, la sensibilidad de los aislados fue del 100% de las cepas a 30 µg, a semejanza de Roque et al. (2011), Reboucas et al. 2011 y Pitayachamrat et al. (2006), quienes encontraron entre el 85 y 100% de sensibilidad a este antibiótico. El MIC de florfenicol en el 81% de las cepas analizadas en este estudio varió entre 5 y 10 ppm, similar a lo indicado por Roque et al. (2001) y Bermúdez-Almada et al. (2014).

Entre el 95 y 100% de los aislados fueron sensibles a cloranfenicol y enrofloxacina a las concentraciones analizadas. Este porcentaje es superior a lo reportado para cloranfenicol; así Vaseeharan et al. (2005) y Zhang et al. (2001) mostraron que un 41% y 75% de las cepas fueron sensibles a este antibiótico. En el caso de enrofloxacina, Roque et al. (2001) reporta una sensibilidad del 89% y un MIC de 0,45 ppm, mientras que en el presente estudio se determinó un MIC de entre 0,1 y 20 ppm, aunque no podemos inferir que esta pérdida de sensibilidad este vinculada directamente a su uso en estos sistemas.

La baja sensibilidad (24%) de las bacterias a furazolidona no implica necesariamente la aplicación directa de este antibiótico en los sistemas de producción. Nygaard et al. (1992) quienes encontraron alta resistencia a este antibiótico en comunidades bacterianas obtenidas de sedimentos expuestos a oxitetraciclina ácido oxolínico; lo que pudo propiciar la resistencia a otros antibióticos.

El análisis *in vitro* de oxitetraciclina en este estudio indica que concentraciones superiores a 4000 ppm son tóxicas a nivel celular afectando hasta un 15 % la viabilidad de los hemocitos. Para florfenicol esta viabilidad afectó paulatinamente la viabilidad de los hemocitos a partir de 2500 ppm hasta un 28%. Sin embargo, para enrofloxacina ninguna de las concentraciones evaluadas afectaron a los hemocitos. Domínguez et al. (2018) evaluó la toxicidad para oxitetraciclina y florfenicol en concentraciones de 4000 y 2000 mg / ml respectivamente viéndose afectada la viabilidad en un 15%.

El análisis *in vitro* con los productos tipo probióticos indicó que el 43% y 48% de los aislados son sensibles al 20% de los productos (Pro5 y Pro10). Esta baja sensibilidad al número de productos también fue encontrada por Nimrat & Vuthiphanchai, (2011) al analizar *in vitro* 12 productos probióticos frente a *V. harveyi*.

La aplicación de técnicas *in vitro* para evaluar probióticos resulta ser limitada ya que estas

metodologías están destinadas a determinar el grado de inhibición que pueda tener sobre una cepa en particular (cepa patógena). Sin embargo, la efectividad de un probiótico tiene que ver con otras características tales como la biorremediación lo cual es también importante dentro de los sistemas de cultivo en lo que concierne al mantenimiento de la calidad de agua y suelo.

Además las bacterias probióticas en ciertos casos, no son capaces de inhibir la proliferación de cepas patógenas pero resultan ser efectivas porque limitan la expresión de genes relacionados con patogenicidad (desarrollo de quorum quenching). Por tal razón es mejor realizar evaluación *in vivo* en donde se pueda analizar estos criterios. Sin embargo, es importante recalcar la necesidad del estudio continuo de otros métodos como colonización, inmunoestimulación, y producción enzimática, con la finalidad de que el sector escoja la alternativa correcta basadas en sus necesidades particulares.

La alta sensibilidad de los aislados a sólo un ácido orgánico, y la respuesta intermedia a cuatro de ellos, nos indica que la mitad de los productos muestreados testeados no tienen actividad bactericida. Sin embargo, la literatura reporta efecto inhibitorio de algunos ácidos orgánicos contra bacterias. El ácido fórmico es el ácido orgánico con mayor inhibición de bacterias *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Mine y Boopathy, 2013). Otros ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento bacteriano son los ácidos acético, propiónico y butírico (Mine & Boopathy, 2011).

Defoirdt et al. (2006) indica que utilizándose 4000 ppm de ácido fórmico, propiónico, butírico, o valérico el crecimiento del *Vibrio campbelli* puede ser inhibido completamente. Con nuestros resultados no es posible descartar completamente la efectividad de los ácidos orgánicos, ya que no disponemos de información de grado de pureza y composición exacta de los constituyentes de cada producto. A demás las concentraciones recomendadas por los proveedores oscilan entre 2-5 ppm por lo cual la concentraciones encontradas en este estudio no son convenientes para ser aplicadas en tanques de larvicultura.

El uso de aceites esenciales ha generado buenas expectativas por ser productos, que a baja concentración reducen la proliferación de microorganismos patógenos. Sin embargo de los dos productos analizados, sólo AES1 inhibió el 48% de las cepas a la concentración testada de 100 ppm. Domínguez et al. (2018) indica que productos basados en aceite de orégano pueden ser tóxicos a concentraciones superiores a 10 ppm para hemocitos de camarón. Sería necesario evaluar otros aceites esenciales que permitan obtener valores de MIC a concentraciones menores a 10 ppm. El grado de necrosis G3 en el hepatopáncreas, en el 50% de las larvas y la presencia del género *Vibrio* en el 95%

de los aislados, indican que las mortalidades observadas en los laboratorios fueron causadas por bacterias patógenas para larvicultura de *P. vannamei*.

Las especies identificadas en este estudio (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbelli*) han sido previamente reportadas como patógenos en larvicultura y causales de mortalidades. (Vandenbergue, et al. 1999; Hameed, 1996 & Lavilla-Pitogo, et al. 1999).

5. Conclusiones

El presente trabajo de investigación genera las siguientes conclusiones:

- Las bacterias utilizadas en este estudio *in vitro* son resistentes a la oxitetraciclina siendo necesario utilizarse concentraciones de 50 y 500 ppm para su inhibición.
- La sensibilidad del 100% de las bacterias al florfenicol y a la enrofloxacin, se encuentra en concentraciones inferiores a 50 ppm.
- De todos los ácidos orgánicos evaluados, sólo el ácido orgánico AC10 fué eficiente para inhibir el crecimiento del 95% de los aislados, a concentraciones menores a 1000 ppm, pero el mismo es tóxico a nivel celular a concentración de 100 ppm, afectando la viabilidad de los hemocitos.
- El aceite esencial AES1 inhibió el 38% de los aislados a concentración de 100 ppm.

7. Referencias

1. Adams, D., & Boopathy, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biología, Section Cellular and Molecular Biology*, 68(6), 1017-1021. doi:10.2478/s11756-013-0251-x
2. Aguirre Guzmán, G., Vázquez Juárez, R., & Felipe, F. (2001). Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* Species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(4), 215-219. doi:https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5073
3. Avannis-Aghajani, E., Jones, K., Chapman, D., & Brunk, C. (1994). A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17, 144-149.

- La viabilidad celular de hemocitos no es afectada al ser expuesta a antibióticos como la oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin a concentraciones de 4000, 2000 y 6000 ppm respectivamente.
- Las patologías observadas en el 50% de los laboratorios analizados muestran necrosis grave de hepatopáncreas y branquias.
- Mediante el análisis de secuencias del gen 16S ARN ribosomal, las especies *V. harveyi* y *V. alginolyticus* son predominantes entre los aislados utilizados en este estudio. La identificación a nivel de 16S ARN ribosomal es más sensible y permite identificar de manera confiable los aislados en comparación al Kit bioquímico API 20NE.

6. Agradecimientos

Este 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 maricultura o repoblación”. Se agradece a todos quienes conforman el grupo de Salud Animal de CENAIM ESPOL; en especial a los Departamentos de Microbiología, Histopatología, Biología Molecular y Cultivo Celular. Al M.Sc Daniel Ruilova, de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE) por contribuir con la revisión de este artículo.

4. Baticados, M., Lavilla Pitogo, C., Cruz Lacierda, E., Pena, L., & Sunaz N.A, N. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing. *Dis Aquat Org*, 9, 133-139.
5. Bell, T. A., & Lightner, D. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp. Histology. Kansas: World Aquaculture Society. *World Aquaculture Society*.
6. Bell, T., & Lightner, D. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp. Histology*. Kansas: World Aquaculture Society.
7. Chiu, C. H., Guu, Y. K., Pan, T. M., Liu, C. H., & Cheng, W. (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. Coutteau, P. (2016). Alimentos funcionales supresores de organismos nocivos para reducir el impacto de enfermedades en el cultivo de camarón. Congreso Ecuatoriano de Acuicultura (Aquaexpo), Ecuador
 9. Dalmin, G., Kathiresan, K., & Purushothaman, A. (2001, Sep.). Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 939-942.
 10. del Carmen Bermúdez-Almada, M., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-Hernández, M. L., Barajas-Borgo, C. J., & Acedo-Félix, E. (2014). Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Biocencia*, 16(3), 29-37.
 11. Dominguez, C., Chalén Alvarado, B., & Rodriguez, J. A. (2018). A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, 5, 90-95.
 12. Dunn, J. (2002). *Natural additives*. Retrieved from <http://www.thepetcenter.com/imtop/natural.html>.
 13. Elgoul, A. (2016, Diciembre). Retos de la producción de larvas del Ecuador. Salinas, Ecuador.
 14. Gómez-Gil, Bruno; Roque, Ana; Guerra, F.A. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. 315-346. (F. Páez-Osuma, Ed.) Mazatlán, México: Universidad Autónoma.
 15. Hameed, A. S. (1996). Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like bacterium. *Oceanographic Literature Review*, 43, 823.
 16. Kamboj, V. P. (2000). Herbal medicine. *Current Science*, 78(1), 35-39.
 17. Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C., Cruz-Lacierda, E. R., & Leobert, D. (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91(1-2), 1-13.
 18. Lückstädt, C., & Kühlmann, K. (2013). *Efecto del diformiato de potasio (KDF, AQUAFORM®) sobre el crecimiento y la mortalidad en juveniles de camarón Litopenaeus vannamei*.
 19. Mine, S., & Boopathy, R. (2011, Julio). Effect of Organic Acids on Shrimp Pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, 63, 1-7. doi:10.1007/s00284-011-9932-2
 20. Mohny, H. J., Leone, Tang, K., Pantoja, C., & Lightner, D. (2015, Nov). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2, 17-21.
 21. Morales, C.Y. (2012). Evaluación del crecimiento y del contenido de hemocitos circulantes totales en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuestos a dietas experimentales con diferentes niveles de probióticos. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma De Baja California Sur, La Paz. México.
 22. National Institutes of Health. (2008). National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). *Community Immunity ("Herd" Immunity)*.
 23. Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2011). In vitro evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4643-4650.
 24. Nygaard, K., Lunestand, B., Hektoen, H., & Berg, J. (1992). Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, 104(1-2), 31-36. doi:10.1016/0044-8486(92)90135-8
 25. Rao, S. (2012, August 17). *Zone diameters of antimicrobial agents according to CLSI guidelines 2011*. Retrieved 2017, from microrao.com/micronotes/pg/kirby_bauer.pdf
 26. Reboucas, R., Viana de Sousa, O., Sousa Lima, A., Vasconcelos, F., Barroso de Carvalho, P., & Silva dos Fernandes Vieira, R. (2011). Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. *Environmental Research*, 111, 21-24. doi:10.1016/j.envres.2010.012
 27. Reyes, A. & Tomalá, C. (2011). Tesis de grado: Análisis de la composición de productos probióticos comerciales empleados

- en la larvicultura de camarón *Penaeus Litopenaeus vannamei*, usando una metodología de análisis molecular. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
28. Ringø, E. (1999). Does *Carnobacterium divergens* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., colonize the gut of early developing turbot, *Scophthalmus maximus* L., larvae? *Aquaculture research*, 30(3), 229-232.
 29. Robertson, P., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J., Zherdmant, M., & Austin, B. (1998, March 5). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(2), 151-155. doi:10.3354/dao03251
 30. Roque, A., Molina, A., Bolán, M., & Gómez Gil, B. (2001). In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaid shrimps in Northwestern México. *International Journal of Antimicrobial Agents*(17), 383-387.
 31. Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Aquaculture and its role in sustainable development en reviews in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 2-9.
 32. Tendencia, E. A., & De la Peña , L. D. (n.d.). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195(3-4), 193-204. doi:10.1016/S0044-8486(00)00570-6
 33. Vandenbergue, J., Verdonk, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., . . . Swings, J. (1999, June). Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2592-2597.
 34. Vaseeharan , B., Ramasamy , P., Murugan, T., & Chen , J. C. (2005). In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. Isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(4), 285-91. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.07.005
 35. Vázquez, J. A., Docasal, S. F., Mirón, J., González, M., & Murado, M. A. (2006). Proteases production by two *Vibrio* species on residuals marine media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 661-668.
 36. Vázquez, J. A., González, M., & Murado, M. A. (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245((1-4)), 149-161.
 37. Wilson, C. L., & Droby, S. (2000). *Microbial food contamination*.
 38. Zang, Y., Li, Y., & Li Sun , X. (2011). Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2299-2307.

ANEXOS

Objetivos específicos:

- Determinar la sensibilidad de bacterias seleccionadas mediante pruebas *in vitro* a cuatro tipos de agentes terapéuticos: antibióticos, ácidos orgánicos, probióticos y aceites esenciales.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los productos terapéuticos que resulten efectivos contra los aislados bacterianos y para los dos antibióticos permitidos en acuicultura.
- Evaluar los efectos citotóxicos de los productos con mayor actividad antimicrobiana, mediante pruebas *in vitro* de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) en hemocitos de camarón.
- Identificar molecularmente las cepas bacterianas evaluadas mediante secuenciación del gen 16S rRNA.

Hipótesis:

Ho =Los productos aplicados en larviculturas ecuatorianas tales como antibióticos, probióticos , aceites esenciales y ácidos orgánicos pueden mostrar efectividad antimicrobiana y ser inocuos a nivel celular en el camarón.

H1 =Los productos aplicados en larviculturas ecuatorianas tales como antibióticos, probióticos , aceites esenciales y ácidos orgánicos pueden mostrar efectividad antimicrobiana y no ser inocuos a nivel celular en el camarón.

Table 1. Descripción de los ácidos orgánicos, probióticos y aceites esenciales utilizados en este estudio.

Código de producto	Composición declarada	Dosis declarada	Presentación	País de origen
PRO1	Microorganismos probióticos: Aerobios totales. Concentración: $> 4 \times 10^9$ UFC g ⁻¹	2 – 10 µg mL ⁻¹	Polvo seco	USA
PRO2	Microorganismos probióticos: Aerobios totales. Concentración: $\geq 2 \times 10^9$ UFC g ⁻¹	2-20 µg mL ⁻¹	Polvo seco	USA
PRO3	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Bacillus pumilus</i> . Concentración: mínima 2×10^{10} UFC g ⁻¹	1 to 5 g kg ⁻¹	Polvo seco	USA
PRO4	<i>Bacillus spp.</i> Concentración: 5×10^{10} UFC g ⁻¹	100 – 200 g ha ⁻¹	Polvo seco	USA
PRO5	<i>Vibrio alginolyticus</i> . Concentración: 1×10^8 UFC mL ⁻¹	10 mL t ⁻¹	Líquido	Ecuador
PRO6	<i>Bacillus spp.</i> Concentración: 1×10^8 UFC mL ⁻¹		Líquido	Ecuador
PRO7	<i>Bacillus spp.</i> Concentración: 2×10^{10} UFC g ⁻¹	1 to 2 g kg ⁻¹	Polvo seco	USA
PRO8	Mix de cepas específicas de <i>Bacillus spp.</i> Concentración: 5×10^{10} UFC g ⁻¹	100 – 200 g ha ⁻¹	Polvo seco	USA
PRO9	cultivos microbianos naturales, no tóxicos con estabilizadores y estimulantes de crecimiento 2×10^9 UFC g ⁻¹	5 – 10 Kg ha ⁻¹	Polvo seco	USA

PRO10	<i>Pseudovibrio</i> 1 x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹		Líquido	Ecuador
AC1	Sales orgánicas, vitaminas, biotin, inositol, minerales, beta-glucanos, nucleótidos, y extractos de plantas.	1-7 kg t ⁻¹ de alimento	Polvo seco	Ecuador
AC2	Mezcla de ácidos orgánicos y fitoquímicos.	1 g t ⁻¹ de alimento	Líquido	Alemania
AC3	Ácido fórmico, ácido propanoico, ácido acético, ácido málico, ácido láctico, y otras sales, paraformaldehído.	1-2 kg t ⁻¹	Polvo seco	Ecuador
AC4	Ácido propanoico 25%, ácido fórmico 25%, y formaldehído 15%	1-3 L ha ⁻¹	Líquido	Ecuador
AC5	Ácido fórmico, ácido propanoico, Formiato de calcio, Propanoato de calcio y citrus.	2-3 kg t ⁻¹ de alimento	Polvo seco	España
AC6	Ácido láctico 23%, Ácido fumárico 20%, ácido cítrico 20%, ácido málico 25%, Ácido succínico 10%.	5 µg mL ⁻¹	Polvo seco	Ecuador
AC7	Ácido fórmico 35.4 %, formato 34.6%, diformato de potasio 30.0%	2-5 kg t ⁻¹ o de alimento	Polvo seco	Noruega
AC8	Ácido fórmico, ácido propanoico y fformaldehído estabilizado	1 kg t ⁻¹ de alimento	Polvo seco	España
AC9	Ácido láctico 23%, Ácido fumárico 20%, ácido cítrico 20%, Ácido succínico 10%.	5 µg mL ⁻¹	Polvo seco	Ecuador

AC10	Ácido acético, ácido fórmico y formaldehido.	0,5-2 kg t ⁻¹ de alimento	Polvo seco	España
AES1	Extracto de aceite de orégano.	1-5 mL t ⁻¹	Líquido	USA
AES2	Mix de altas concentraciones de aceites esenciales.	1-10 mL t ⁻¹	Líquido	España