



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
SEDE MANABÍ
CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS DE ANTAGONISMO DE
BACTERIAS PROBIÓTICAS FRENTE A *Vibrio parahaemolyticus* y
Pseudomona aeruginosa

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS

SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MICROBIOLOGÍA

PREVIO AL TÍTULO DE
BIÓLOGA

AUTOR
GLEDYDYS LILIBETH INTRIAGO CEDEÑO

TUTORA
FRANCISCO POZO MIRANDA, M SC

BAHÍA DE CARÁQUEZ – ABRIL 2023

Certificación

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo los requisitos establecidos por la Dirección de Investigación; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

Francisco Pozo Miranda, M. Sc.

Director del trabajo de titulación

CI: 0918330952

Aprobación del tribunal

El jurado examinador, aprueba el presente manuscrito de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

Evelyn Arias Cedeño, *M. Sc*

Primer Lector

Kruger Iván Loor Santana, *M. Sc.*

Segundo Lector

Francisco Pozo Miranda, *M. Sc.*

Tercer Lector

Bahía de Caráquez, abril 2023

Declaración de originalidad

Este manuscrito no contiene ningún tipo de material que ha sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de soporte que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad de autor, quien declara bajo juramento que ninguna sección de este trabajo de integración curricular infringe los derechos de autor de nadie.

Glendys Lilibeth Intriago Cedeño

CI: 1314489293

Teléfono: 0982516291

lilibethintriago96@hotmail.com

Declaración de derechos de autor

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

Glendys Lilibeth Intriago Cedeño

CI: 1314489293

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios porque me permitió llegar hasta aquí, también me lo dedico a mí ya que esto es algo de las muy pocas cosas que me he propuesto y que hoy he logrado llegar hasta el final, también se la dedico a todas las personas que fueron parte de este proceso de aprendizaje y a mi familia.

Esta tesis también está dedicada para la persona que siempre estuvo conmigo, que me lanzo a esta carrera que con el pasar del tiempo me apasiono y que hoy me llena de emoción cada vez que escucho su nombre Biología, por eso te la dedico a ti David Solís fuiste quien me encaminaste y quiero que estés en mi vida muchos años más siendo mi fortaleza.

Agradecimiento

Hoy quiero agradecer a Dios porque él es el único que hace que todo se dé, también quiero agradecer a mi familia a mis hijos y a mi esposo por haber sido mi fortaleza. También quiero agradecer a mi tutor M. Sc Francisco Pozo Miranda que sin él hubiese podido ser posible haber terminado mi trabajo de titulación, también agradezco a mis profesores como son la M. Sc Evelin Arias Cedeño y M. Sc Iván Loor Santana todos ellos fueron parte de mi aprendizaje a lo largo de mi carrera.

También agradezco a la profesora María José Brito quien fue quien me mostro que todo es posible, a esforzarme por lo que quiero, además me enseñó que debo poner todo en manos de Dios porque solo es sabe que es bueno para cada uno de nosotros. Así mismo, a las doctoras Blanca Zeas Ramírez, Mariuxi Mejía Farez y Ivonne Vera Villón quienes fueron mi apoyo psicológico en todo este proceso y me han ayudado a superar mis crisis gracias a ustedes hoy estoy redactando esta tesis.

No puedo terminar mi carrera sin agradecer a mis compañeros porque gracias a ellos tuve la experiencia de poder conocer otras costumbres y otra manera de ver las cosas, en especial le agradezco a Katheryn Mendoza, Brigitte Zambrano, Marina Navarrete y Oswaldo Tejada por apoyarme siempre y ser mi apoyo, ¡gracias!

Resumen

Se realizó esta investigación mixta en la cual se probó la acción antagónica entre bacterias, como respuesta a la escasa información sobre este tema, puesto que solo se registran experimentos de bacterias con hongos, pero no entre bacterias. Consecuentemente, en este estudio exploratorio ejecutado durante noviembre y diciembre de 2022, se usó el método Tukey ($p \leq 0.05$) en el análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$) para evaluar los datos. Para el trabajo experimental-explicativo, se trabajó con las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* que afectan frecuentemente los cultivos acuícolas, enfrentándolas a la bacteria probiótica comercial Embio Plus en el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, Campus Bahía de Caráquez. Se probó la dureza del agar (consistencia) y la forma de aplicación del inóculo microbiano en el cultivo para establecer el antagonismo dual y de rayado. Los resultados para establecer el antagonismo dual comprueban que la consistencia adecuada corresponde al 1% de agar. En cuanto a la forma del inóculo, se observan mejores resultados con depósito directo cuya movilidad es de 85.0 ± 5.0 mm. Considerando el ensayo antagonismo por medio de rayado, la técnica usada con hisopo muestra mejores resultados con movilidad de 5.6 ± 1.2 mm. Aun así, los resultados son más claros en la evaluación del antagonismo con depósito directo del inóculo microbiano para ambas bacterias. En conclusión, la estandarización del método de antagonismo dual por inóculo directo facilita los procesos de pruebas de antagonismos de bacteria a bacteria.

Palabras clave: *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, antagonismo, bacterias probióticas

ABSTRAC

This mixed research study was carried out to evaluate the antagonistic action between bacteria, regarding the scarce information on this subject, since there are only records of experiments between bacteria and fungi, but there is no record between bacteria. Accordingly, this exploratory research study was carried out from November through December 2022, and the Tukey's test ($p \leq 0.05$) was used in analysis of variance (ANOVA) ($p \leq 0.05$) to evaluate the collected data. *Vibrio parahaemolyticus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were used for the experimental-explanatory part of this research, as they frequently infect aquaculture systems, so that they were confronted with the commercial probiotic bacterium Envio Plus at the microbiology laboratory at Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, Bahía de Caráquez Campus. The hardness of agar (consistency) and the application of the microbial inoculum in the culture were tested to screen dual and scratch antagonism. The findings to identify dual antagonism prove that the adequate consistency corresponds to 1% agar. About the shape of inoculum, better results are observed with direct application whose mobility corresponds to 85.0 ± 5.0 mm. Regarding the antagonist-scratching test, the cotton swab technique reveals better results with direct application whose mobility corresponds to 5.6 ± 1.2 mm. In spite of that, the findings are clearer in the antagonism evaluation with direct application of microbial inoculant for both bacteria. In conclusion, the standardization of the dual antagonistic method by direct inoculum simplifies antagonism testing processes from bacterium to bacterium.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, antagonism, probiotic bacteria

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	1
Metodología	5
Activación de las bacterias y aislamiento	5
Cultivo en medio líquido	5
Determinación de la reacción antagónica por estrías.....	6
Competencia por espacio en cultivos duales	6
Validación del modelo	7
Acción inhibitoria	7
Análisis estadístico	7
Resultados	9
Determinación de la reacción antagónica dual.	9
Volumen de inóculo.....	9
Forma de inóculo	10
Consistencia del agar	11
Antagonismo cruzado	13
Validar el modelo experimental.....	15
Acción inhibitoria	16
Conclusión	20
Bibliografía	21

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1:

Análisis de acción inhibitoria de la bacteria probiótica césped bacteriano de *V. parahaemolyticus* y *P. aeruginosa*.10

Gráfico 1:

Análisis de la forma del inculo de la suspensión bacteriana en cajas Petri (directo – indirecto) para determinar la movilidad bacteriana.....11

Gráfico 2:

Análisis de movilidad de *V. parahaemolyticus* con inculo directo a tres durezas del agar (0,6%, 1,0% y 2,0%). DV=Depósito directo de Vibrio. 12

Gráfico 3:

Análisis de movilidad y recubriendo de *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones de agar. DP=Depósito directo de *P. aeruginosa*13

Gráfico 4:

Análisis de antagonismo cruzado. a) *V. parahaemolyticus* y b) *P. aeruginosa* 14

Gráfico 5:

Análisis de la validación de dos ensayos en diferentes tiempos para corroborar la repetitividad de los resultados de antagonismo. a) *V. parahaemolyticus*. b) *P. eruginosa*.....16

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:

Análisis de acción inhibitoria de la bacteria probiótica césped bacteriano de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>P.aeruginosa</i>	17
--	----

Introducción

El Ecuador es reconocido a nivel mundial por la exportación de calidad de productos derivados del mar entre ellos el camarón, nuestro territorio se caracteriza por tener un amplio desarrollo de actividades acuícolas, que con el pasar de los años ha evolucionado y mejorado sus tácticas, fomentando a la economía del país (Ullsco et al., 2021). A pesar del éxito en actividades acuícolas, se presentan situaciones que traen consigo pérdidas económicas significativas causadas por bacterias patógenas, entre las más comunes encontradas en granjas de camarones se encuentran *Pseudomonas spp.* y *Vibrio parahaemolyticus*, siendo esta última la responsable de necrosis hepatopancreática (Saavedra-Olivos et al., 2018; Galaviz-Silva et al., 2021).

La bacteria patógena *Vibrio parahaemolyticus*, es gram negativa, pertenece al ambiente marino, y se transmite a los organismos de los estanques a través del alimento contaminado perjudicando al organismo que lo consume (Galaviz-Silva et al., 2021). Esta especie constituye aproximadamente el 60% de las bacterias halófilas, cuyo requerimiento para su desarrollo requiere de concentraciones mínimas de NaCl de 1%. La temperatura para la proliferación es de 5 a 43°C, esta bacteria requiere que el medio tenga un pH de 7,0 a 8,6 debido a sus condiciones de vida está presente en la microflora de crustáceos; los *Vibrio* son oportunistas que se replican con mayor facilidad en condiciones de estrés.

En tanto que las bacterias del género *Pseudomonas* con característica patógena son gram negativas, pueden desarrollarse en ambientes aerobio y anaerobio distribuyéndose en todos los ambientes terrestres, su transmisión se da por contacto directo y presenta resistencia a varios antibióticos por la adquisición de plásmidos de resistencia (Alvarado et al., 2020).

Habitualmente el tratamiento más eficaz para el control o prevención de las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* es el uso de bacterias probióticas. Estas poseen la capacidad de colonizar el tracto digestivo sin ser destruidas por los jugos gástricos y a su vez compiten y desplazan bacterias patógenas que perjudican la salud del organismo (Romero et al., 2022), por lo cual es necesario primero evaluar la calidad del probiótico para establecer su efectividad mediante la estandarización de pruebas de antagonismo ante bacterias patógenas (Jiménez, 2020).

Los microorganismos antagónicos pueden ser hongos, levaduras y bacterias, poseen la capacidad de controlar biológicamente bacterias patógenas, considerada como un método efectivo para el control de la colonización de bacterias patógenas, ya que se basa en evitar el asentamiento de organismos patógenos a la superficie del tejido epitelial de un órgano (Villasanta, 2022). Estos microorganismos poseen la capacidad de generar sustancias como metabolitos secundarios ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno e incluso producir bacteriocinas polipéptidos con efecto antimicrobiano que reducen el crecimiento microbiano lo que permite obtener nuevas vías de combate ante organismos patógenos (Salcedo Marcelo, 2021).

Las bacterias antagónicas poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de otro microorganismo en un mismo espacio, así son ampliamente utilizadas en el tratamiento y mejoramiento de ambientes ya sean estos marinos o terrestres, estos se aplican como control de patógenos que desequilibran la salud del animal. Así, se ha demostrado que diferentes especies del género *Pseudomonas* son capaces de controlar enfermedades que deterioran los cultivos (Fravel, 2005), esta ha sido identificada como productora de pirrolnitrinas, diacetilfloroglucinol, fenacinas, pioluteorina y Nmercapto-4-formilcarbostiril (Cbs) (Alvarado et al., 2020).

El antagonismo puede ser directo o indirecto, el modo directo consiste en una alta afinidad de organismos patógenos y organismos antagónicos que implementan mecanismos de depredación a través del contacto directo. El antagonismo de manera indirecto es aquel en el que no existe contacto alguno entre los agentes microbianos, aunque si posee efecto supresor por la secreción de compuestos antimicrobianos, también por la competencia de espacio y de nutrientes disponibles en el medio (Tilocca et al., 2020) lo cual permite medir la inhibición del crecimiento de una bacteria patógena a través de una bacteria probiótica.

Otra forma de provocar antagonismo es mediante el método de estrías, aunque su mayor uso es en el aislamiento de bacterias, por agotamiento progresivo o continuo aplicado en medio sólido (Sanz, 2011). Esta técnica pretende mejorar el crecimiento de las colonias que luego de la incubación nos proporciona una fácil revisión e identificación de manera macroscópica, también podemos usar el método de colonias aisladas para medir la acción antagónica que existe entre bacterias (Bromatolog et al., 2021). Así existe una diversidad de insumos probióticos que buscan mejor mejorar las condiciones de los cultivos acuícolas. Este producto se oferta en diversidad de marcas y características, generando el problema de no saber cuál es más efectivo contra el patógeno presente en el cultivo. De allí es importante conocer una forma confiable de establecer la calidad del producto mediante la estandarización de una técnica de antagonismo para *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En este contexto la presente investigación tiene como objetivo general estandarizar la técnica del antagonismo de bacterias probióticas frente a *Vibrios parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y los objetivos específicos; Comparar dos volumen y forma de inculo de bacterias en el medio de cultivo; definir la consistencia adecuada del agar que permita tiempos de movilidad bacteriana; y finalmente validar el

modelo experimental de los parámetros del antagonismo bacteriano para la estandarización de la técnica.

Así probar la hipótesis de que la estandarización de la técnica del antagonismo de bacterias probióticas frente microorganismos patógenos por el método competencia dual con depósito directo, presentan mayor confiabilidad en el resultado, logrando responder a la pregunta de investigación relacionado a ¿Se podrá realizar la estandarización de la técnica del antagonismo que presente menor variabilidad en los resultados? de esta forma lograr establecer la confiabilidad de método al usarse en la evaluación de productos comerciales.

Metodología

Activación de las bacterias y aislamiento

Se usó una cepa de *V. parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* que se encuentran presente en el Laboratorio de Microbiología de la carrera de Biología de la PUCE Sede Manabí Campus Bahía.

La activación de las bacterias se lo realizó por la metodología modificada de Hernández, (2021), se preparó una solución salina al 2% y se esterilizo con luz ultravioleta UV.

El agua estéril se dividió para tres vasos de precipitación (200 ml) y a cada uno se le colocó 2,0 g de vitamina C y 2,0 ml de melaza para que las bacterias tengan un buen desarrollo, luego le agregó 0,010g de la bacteria comercial, Embio Plus, posteriormente se colocó en incubación a temperatura de 30° C. en agitación continua y se esperó cuatro días para la activación.

Para el aislamiento bacterias EMBIO PLUS se preparó medios de cultivos en cajas Petri con 8,8 g de agar LB y 200ml de agua destilada, luego las bacterias se sembraron por el método de estrías, el cual se revisó luego de 24 horas de incubación a 30° C.

Una vez aislada se realizó cultivos puros por el método de agotamiento con cinco replicas cada una.

Cultivo en medio liquido

El cultivo en medio liquido se utilizó para determinar el crecimiento de la cepa y evaluar el nivel de actividad antibacteriana probiótica o patógena. Se tomó una colonia de bacteria activada fresca y se la colocó en medio LB (2% NaCl), la cual se incubó por 24 horas a 30o C, hasta que alcanzó una densidad óptica de DO 1,0 de acuerdo con la metodología descrita por Añazco & Pozo, (2021).

Determinación de la reacción antagónica por estrías.

Se activó cepas del producto y bacteria patógena en placas de LB Agar (2% NaCl) estas se incubaron por 24 horas y se tomó una colonia microbiana, se preparó una suspensión de 1 ml con medio LB (2% NaCl) hasta que se obtuvo una densidad de 1,0.

Se preparó las cajas Petri con LB (2% Agar), para la preparación se usó 7,5 g de agar LB y 6 g de bacto agar el cual se diluyó en 300ml de agua destilada, en el ensayo con asa de platino estándar, se tomó 10 ± 1 μ l de suspensión microbiana. Mientras que el ensayo con hisopo se embebió con 141 ± 5 μ l de suspensión microbiana del probiótico y se usó para la siembra por estrías de forma individual. Luego con una segunda asa de platino/hisopo se tomó una segunda suspensión microbiana (patógeno) y se procedió a realizar una estría que atravesase el rayado anterior. Se incubó a 30° C, durante 48 Horas. La reacción antagónica se definió midiendo (mm) el área cruzada de inhibición de crecimiento entre las bacterias.

Competencia por espacio en cultivos duales

Para la comparación de la velocidad de crecimiento entre el antagonista y los patógenos, a partir de suspensión bacteriana, se evaluó de dos formas:

- 1) Siembra por discos, se tomó discos de papel (5 mm de diámetro) embebido con 11 μ l de suspensión microbiana de las cepas de estudio.
- 2) Siembra directa del inóculo bacteriano de 3 μ l en el medio de cultivo semisólido, se depositó en puntos equidistantes (2 cm) en cajas Petri (90 mm de diámetro).

Ambas formas de inoculación fueron realizadas en medios de cultivo LB (2% NaCl) a tres concentraciones de agar (0,6%, 1,0% y 2,0%). Para la concentración al 0,6% se usó 3,75g de LB agar y 0,9 de Bacto agar diluidos en 150 ml de agua destilada, para el agar con concentración al 1,0% de uso 3,75g LB agar y 1,5 g de Bacto agar diluidos en 150 ml de agua destilada, y para la concentración 2,0% usamos 3,75 de LB agar y 3 g de

Bacto agar. Todas estas preparaciones se llevaron a ebullición por calentamiento directo para luego llevar a cajas Petri.

Se consideraron cinco réplicas por tratamiento en enfrentamiento dual y los respectivos controles sin el antagonista. Las placas se mantuvieron a $30\pm 1^\circ\text{C}$, se tomó el registro del crecimiento a partir de las seis horas (Añasco y Pozo, 2021).

Validación del modelo

Para la validación de la estandarización del antagonismo se realizó la evaluación de repetitividad y reproducibilidad en tres ensayos independientes. Se usaron cinco réplicas para cada protocolo estandarizado según Domínguez-Borbor et al., (2019) modificado y los criterios establecidos por la revista MethodsX.

Acción inhibitoria

Se tomó una alícuota de suspensión bacteriana a D.O. 0,1 medida en el espectrofotómetro (Spectroquant ® NOVA60) a 600 nm de longitud de onda ($\text{DO}_{600} = 0,1$) de bacteria probiótica y patógena, la cual se distribuyó en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro embebidos con $141\pm 5\mu\text{l}$, luego fueron depositados en medio de cultivo LB 2,0% agar (NaCl 2%).

Las cajas Petri fueron inoculadas con un hisopo extendido en la caja mediante barrido, una suspensión bacteriana de 0,1% de densidad óptica y se incubó por 24 h a $29\pm 1^\circ\text{C}$. Los análisis se realizaron con cinco réplicas por concentración, la acción inhibitoria se midió con una regla con escala milimétrica (Añasco-Sánchez y Pozo-Miranda, 2021)

Análisis estadístico

A través de las pruebas de Shapiro Wilks y Levene ($\alpha = 0,05$) respectivamente, se comprobaron la normalidad de los datos y la homocedasticidad de varianzas a los valores registrados de consistencia del agar y antagonismo. Posteriormente se aplicaron un ANOVA, para determinar que las diferencias observadas eran estadísticamente

significativas. Complementario a ello se realizó la prueba de contrastes de Tukey determinando las diferencias específicas entre los grupos de datos

Para datos de forma de inóculo y validación del método se usó la prueba de T Students a nivel alfa 0,05. Los análisis se desarrollaron mediante el software SPSS versión 25.

Resultados

Determinación de la reacción antagónica dual.

Se basa en la evaluación de dos inóculos en posición equidistante para su confrontación, para esta actividad se estandarizó: volumen, forma del inóculo y consistencia del agar (%) que permita medir de forma correcta el antagonismo.

Volumen de inóculo.

Se realizó la evaluación de capacidad de volumen de inóculo previo al desarrollo de los ensayos, con el fin de aplicar dos técnicas de inóculo en la prueba de antagonismo.

En el ensayo con inóculo directo, se estableció que 3 μ l mantenían en forma circular y al inóculo en el sitio exacto del depósito en la caja Petri.

En la evaluación del volumen para el uso en el disco de papel filtro, se determinó que con 11,0 μ l de inóculo provocan un crecimiento circular uniforme en los ensayos. Los volúmenes 12,0 μ l, 13,0 μ l y 14,0 μ l provocan colonia deformadas, mientras que volúmenes 9 μ l y 10 μ l no provocan crecimiento en los platos Petri con agar (figura 1).

Figura 1

Pruebas de inóculos a partir de suspensión bacteriana usados en discos de papel para evaluar antagonismo. 9 μ l de inóculo sobre disco de papel no cubre y ni humedece el área del disco, 11 μ l de inóculo sobre disco de papel SI cubre y humedece el área del disco, 14 μ l de inóculo sobre disco de papel NO cubre y ni humedece el área del disco.

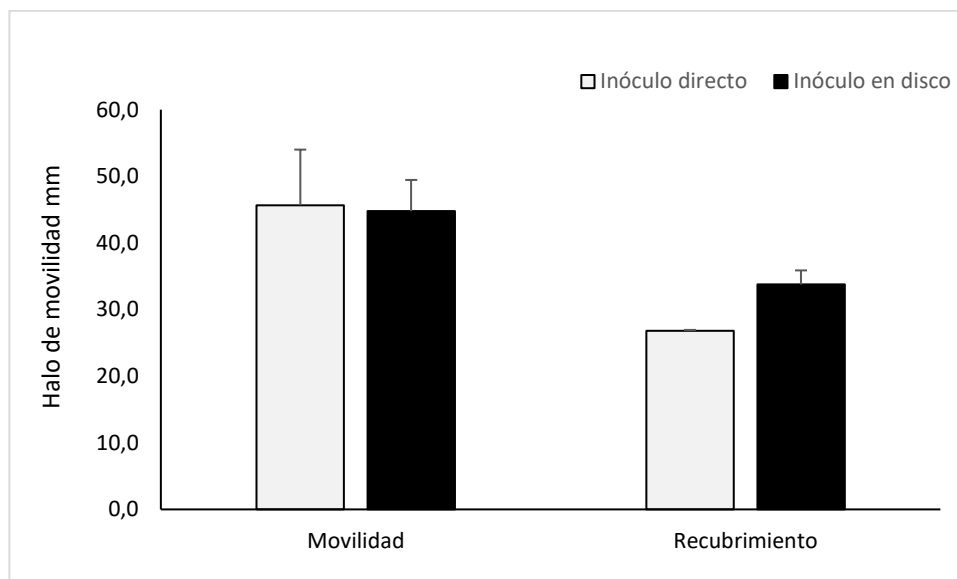


Forma de inóculo

Al evaluar la forma del método de depósito de la muestra por inóculo directo e inóculo en disco, los resultados se describieron como la movilidad en milímetros que posee el patógeno frente al probiótico. Una vez evaluado los resultados mediante T student ($p \leq 0,05$) de las dos cepas evaluadas (*V. parahaemolyticus* y *P. aeruginosa*), podemos establecer que no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los métodos utilizados basado en la movilidad (inoculo directo $45,7 \pm 4,7$ mm; inoculo indirecto $44,88 \pm 8,4$ mm), mientras que en el recubrimiento si existe diferencias significativas (T student $p \leq 0,05$) entre ellas [inoculo directo $26,8 \pm 2,1$ mm; inoculo indirecto $33,8 \pm 0,1$ mm (Gráfico 1)].

Gráfico 1

Análisis de la forma del inóculo de la suspensión bacteriana en cajas Petri (directo – indirecto) para determinar la movilidad bacteriana.



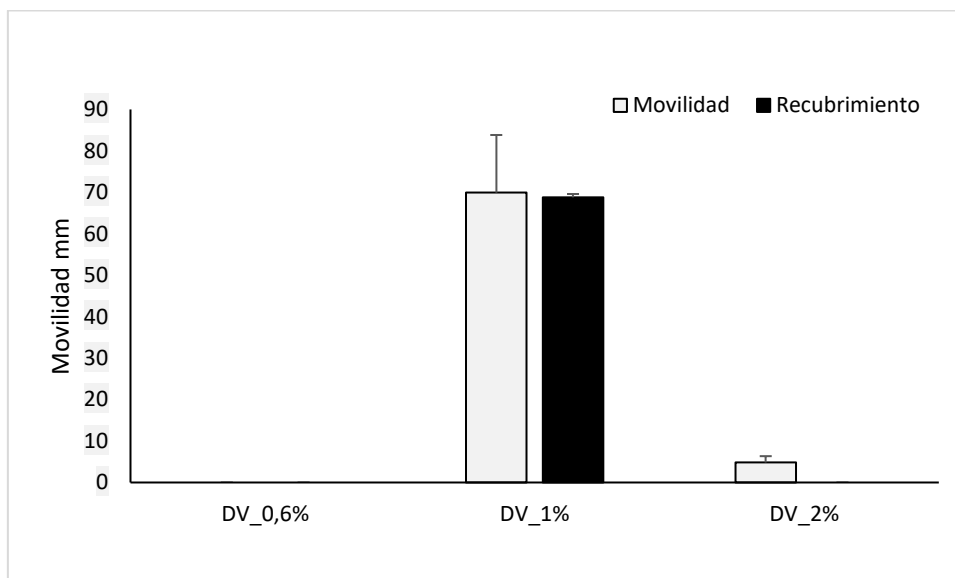
Consistencia del agar

Una vez establecido que el método más apropiado fue inóculo directo, se evaluó la movilidad y recubrimiento de la bacteria probiótica sobre *V. parahaemolyticus* en medio de cultivo a diferentes concentraciones de agar, el análisis de varianza ANOVA ($p \leq 0,05$) se observó diferencias significativas entre los tratamientos, la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), se pudo establecer que la consistencia del agar al 1% significativamente más alta comparado a 0,6% y 2,0 % de agar.

V. parahaemolyticus presentó una movilidad promedio de $69,9 \pm 13,9$ mm, mientras que el recubrimiento fue de $68,8 \pm 0,8$ mm. Se observó que tratamiento con 0,6% de agar no se presentó movilidad de la colonia y en 2,0 % de agar el crecimiento fue mínimo (de $4,8 \pm 1,5$ mm) como se muestra en gráfico 2.

Gráfico 2.

Análisis de movilidad de *V. parahaemolyticus* con inóculo directo a tres durezas del agar (0,6%, 1,0% y 2,0%). DV=Depósito directo de Vibrio.

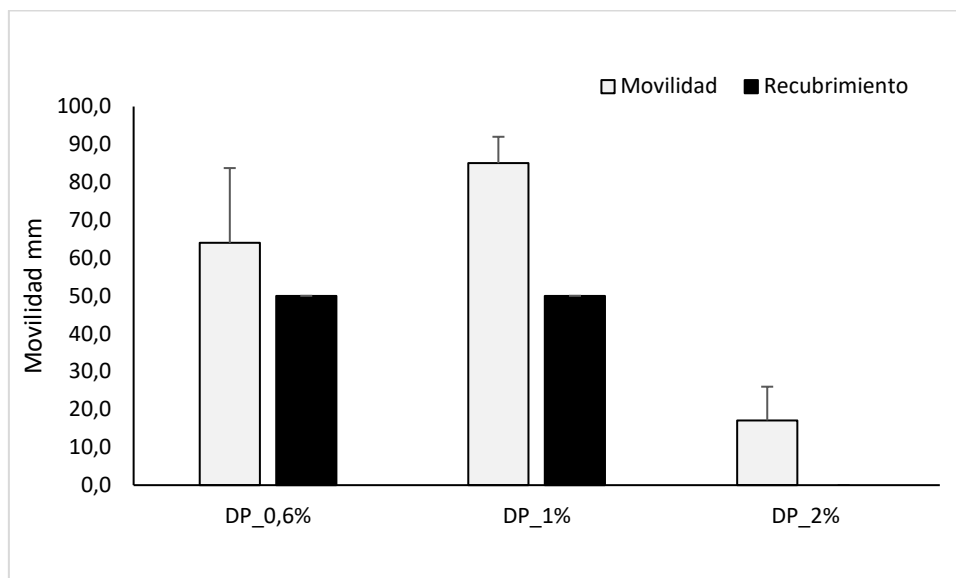


En los ensayos con *P. aeruginosa* el análisis de varianza ANOVA ($p \leq 0,05$) muestran diferencias significativas entre los tratamientos (consistencia 0,6%, 1,0% y 2,0%) para movilidad y recubriendo. Según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) tanto movilidad y recubrimiento fue significativamente bajo en el tratamiento a 2,0% de agar comparados con los otros tratamientos. En el caso de medio de cultivo con 0,6% y 1,0% estas no presentaron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$).

Sin embargo, se pudo observar que el tratamiento con 1% agar mostro menor variación entre las réplicas obteniendo una movilidad promedio de $85,0 \pm 5,0$ mm (ver gráfico 3) mientras que al 0.6% la movilidad promedio fue de $64,0 \pm 19,8$ mm, por lo que existe mayor confiabilidad en el ensayo realizado a 1,0% agar.

Gráfico 3

Análisis de movilidad y recubriendo de *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones de agar. DP=Depósito directo de *P. aeruginosa*.



Antagonismo cruzado

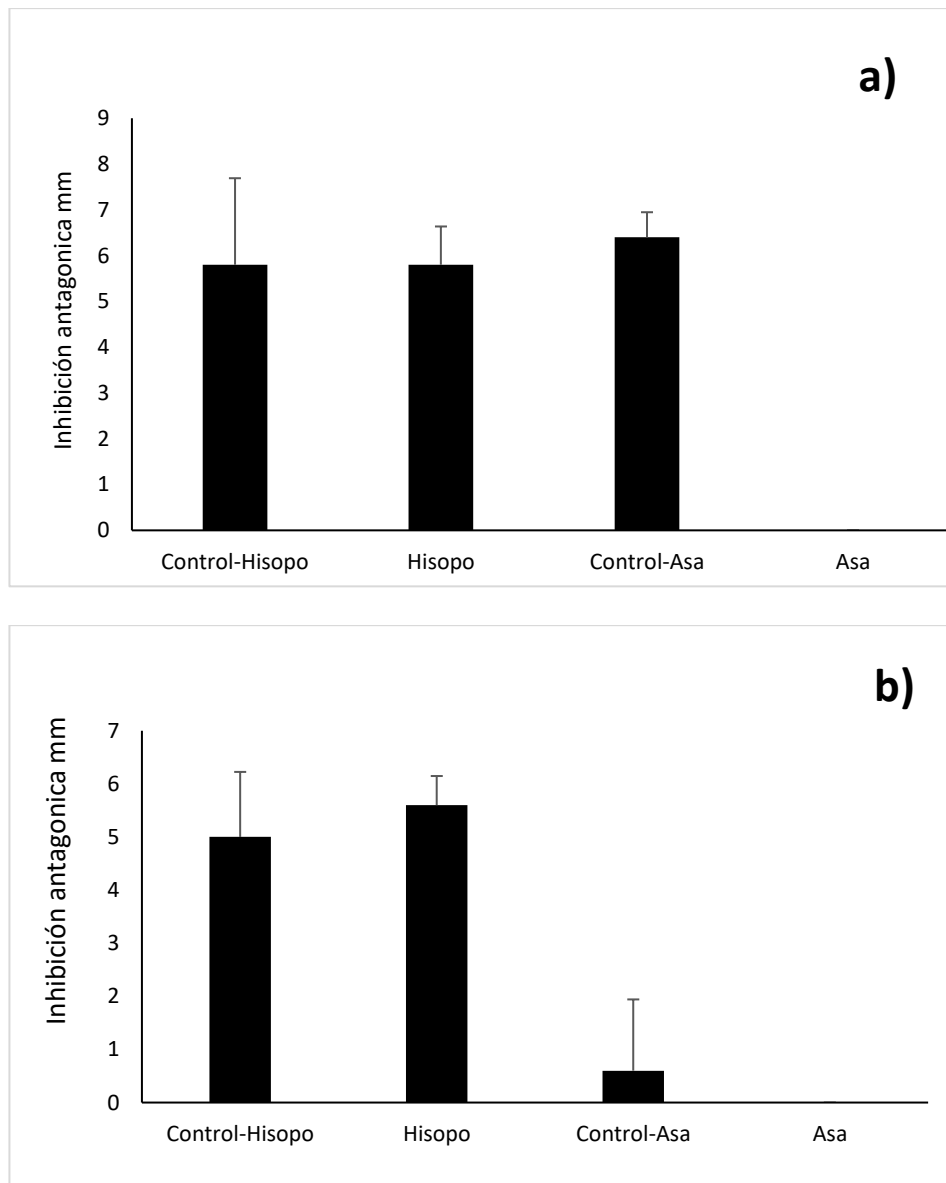
El ANOVA de los datos del ensayo de siembra por estrías cruzadas determino que si existen diferencias significativas ANOVA ($p \leq 0,05$) entre los cuatro tratamientos evaluados para cada especie bacteriana (gráfico 4 a-b).

En ensayos con *V. parahaemolyticus* observamos antagonismo medible tanto en el tratamiento como en el control al usar el hisopo embebido, ambos antagonismos presentaron igual nivel de inhibición ($5,8 \pm 1,9$ mm) (Tukey $p > 0,05$). Mientras al usar un asa para generar las estrías, el antagonismo pudo ser medible solo cuando se usó a la misma bacteria para generar la estría (control), mientras que al evaluar el antagonismo entre bacteria patógena y probiótica no se observó antagonismo (Tukey $p \leq 0,05$) (ver gráfico 4a).

En *P. aeruginosa*, no se observó diferencias significativas ANOVA ($p > 0,05$) entre cada tratamiento (hisopo / Asa). Aunque se pudo cuantificar de mejor manera cuando se usó el hisopo embebido (ver gráfico 4b), con antagonismo promedio fue de $5,6 \pm 1,2$ mm.

Gráfico 4.

Análisis de antagonismo cruzado. a) V. parahaemolyticus y b) P. aeruginosa .

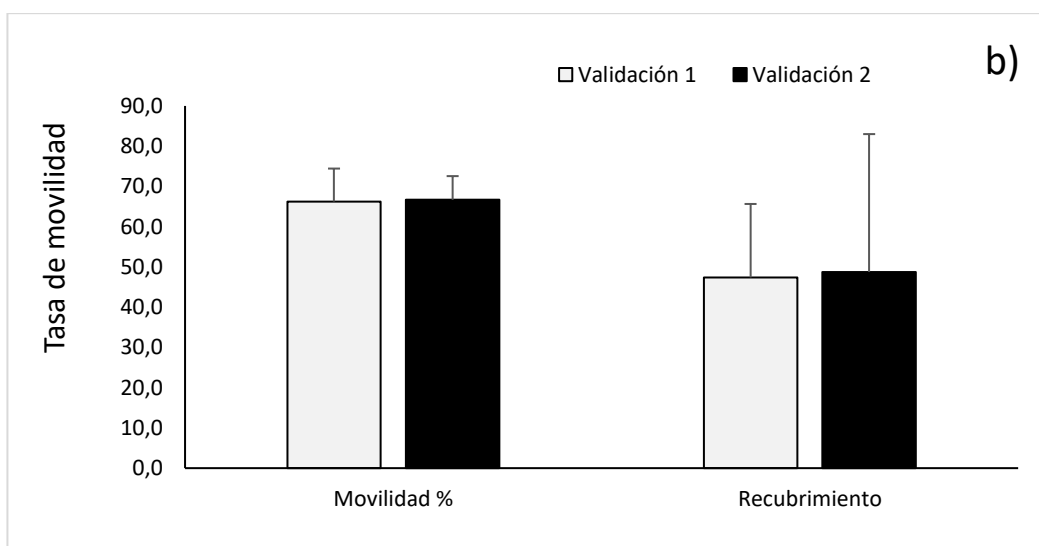
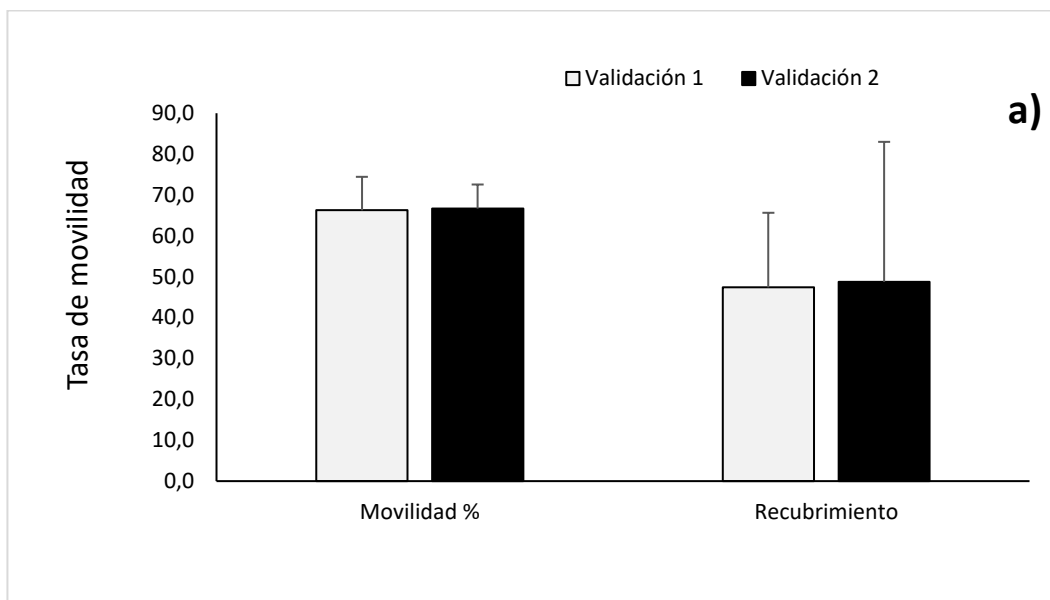


Validar el modelo experimental

En la validación de la estandarización del método de antagonismo se consideró la reproducibilidad de los resultados a los mismos parámetros estandarizados (Antagonismo dual 1% de agar y depósito directo). Según la evaluación mediante T student ($p \leq 0,05$) se determinó que no existen diferencias significativas entre cada validación. La movilidad promedio para *V. parahaemolyticus* en la validación uno fue $63,2 \pm 17,47$ mientras que la validación dos fue de 53.3 ± 10.27 (gráfico 5a). De igual manera *P. aeruginosa* no presento diferencias significativas (t Student $p \leq 0,05$) cuyos valores promedios para cada ensayo fueron muy similares (validación uno= $66,3 \pm 8,18$ mm y validación dos= $66,7 \pm 5,89$ mm) (gráfico 5b). En cuanto al recubrimiento, la variación de los resultados en cada ensayo muestra que no es un indicador confiable para establecer el antagonismo.

Gráfico 5.

Análisis de la validación de dos ensayos en diferentes tiempos para corroborar la repetitividad de los resultados de antagonismo. a) *V. parahaemolyticus*. b) *P. aeruginosa*



Acción inhibitoria

Los resultados no mostraron efecto inhibitor por parte de la bacteria probiótica, por lo cual no fue posible la cuantificación. Contrariamente, al usar un disco impregnado

con oxitetraciclina la inhibición de las dos bacterias patógenas fue evidente (15 ± 1 mm) como se muestra en Tabla 1.

Tabla 1.

Análisis de acción inhibitoria de la bacteria probiótica césped bacteriano de V. parahaemolyticus y P. aeruginosa.

Tratamiento	Halo de inhibición mm
Disco Oxitetraciclina	15,0 \pm 1,0
Bacteria Probiótica/césped <i>V. parahaemolyticus</i>	0
Bacteria Probiótica/césped <i>P. aeruginosa</i>	0

La acuicultura es una actividad altamente productiva que se da a nivel mundial, esta actividad crece puesto que la demanda ha aumentado, necesitando estricto control pues el manejo inadecuado puede dar origen a infecciones y la aparición de bacterias que estropean y reducen la calidad del producto, si bien es cierto, la aplicación de muchos antibióticos aumenta el cuidado del camarón, pero también tiene desventajas porque genera consecuencias en las personas que lo consumen por ello nace la necesidad de usar organismos probióticos que son bacterias o microorganismos que brindan beneficios si se administran en la cantidad adecuada, estos mejoran el estado de salud de los organismos pues estos colonizan el tracto digestivo y desplazan a las bacterias patógenas (Feria et al., 2019).

En este contexto, es importante conocer el nivel de eficacia del microorganismo probiótico contra bacterias patógenas comunes que afectan a larvas de camarón, como

son *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*. De aquí es interesante establecer condiciones adecuadas para definir el antagonismo, en el presente estudio se establece que la mejor forma de realizar antagonismo es mediante inoculación directa de un volumen de 3 μ l de suspensión bacteriana en un medio de cultivo con 1% de agar (peso volumen p/v) logrando la consistencia adecuada que permitió ver resultados fiables. Esto podría explicarse porque las bacterias del género *Vibrio* trabajan en conjunto para lograr la movilidad, esto se ha observado en medios de cultivos a concentraciones de agar al 1% (Miyata et al., 2020). Resultado similar se observó en el estudio de Palma (2021), con el agar al 1%, las pruebas realizadas permitieron comprobar que las bacterias tienen mayor motilidad en agares semisólidos o blandos, pero no inferior al 0.4% debido a que no se gelifica y no permite tomar datos u observar de manera macroscópica, en contraste, las concentraciones mayores al 1% dificultan la movilidad de las bacterias ya que estas no permiten que se desplacen (Gorziglia Palma, 2021). Tal parece que las bacterias en medio de cultivo con agar a 1% (p/v) a través de la secreción de moléculas surfactantes logran modificar el diámetro de las nanopartículas las cuales se encuentran dispersas en el medio de cultivo (Tello, 2018) así mediante el uso de surfactantes disminuyen la fuerza intermolecular y logran la movilidad de enjambre para generar el antagonismo en un medio semisólido.

Ahora, hay que considerar las especies microbianas estudiadas (*Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*) son bacterias de tipo IV por lo que poseen una alta movilidad (Partridge & Harshey, 2020), por lo tanto, la concentración de agar a utilizar para este tipo de procedimientos también estará relacionada con la biología de la cepa que se evalúa.

Las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentan su flagelo desde el inicio de su división celular lo que les permite tener alta movilidad, este

movimiento puede ser analizado de manera macroscópica (Sabádo Corral, 2020) como se observa en nuestros análisis de movilidad antagónica. Hay que mencionar que la facilidad de movilidad de *Pseudomonas aeruginosa* tienen una movilidad de enjambre (swarming) que es la simulación de natación pues su flagelo rota y este movimiento le permite desplazarse a gran velocidad, por otro lado, *Vibrio parahaemolyticus* posee un movimiento que es la simulación de un enjambre que en comparación con el movimiento de natación libre (swimming) esta no solo pone a trabajar el flagelo polar, sino que genera actividad de flagelos laterales en la bacteria. Así, la estandarización del protocolo para la definición del antagonismo se logró con un inóculo bacteriano aplicado directo al medio de cultivo y la capacidad biológica de bacteria evaluada permitió su clara cuantificación.

Conclusión

Evalúados los parámetros para la estandarización de la técnica del antagonismo microbiano entre una bacteria probiótica frente a *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* se concluyó lo siguiente.

Se determinó que el volumen más adecuado para utilizar en la técnica de antagonismo es 3 μL , usado mediante un inóculo por depósito directo, permitiendo una correcta deposición y maduración del inóculo en el centro del medio de cultivo en la caja Petri.

Para la evaluación de la movilidad de las bacterias *Vibrios parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, se determinó que el agar a concentración del 1% permite que la colonia se movilice sin dificultad, permitiendo registrar los datos para un adecuado análisis estadístico en la evaluación de la calidad de un microorganismo probiótico.

Finalmente, se establece que el método fue estandarizado a inóculo de 3 μl , depósito del inóculo directo, con consistencia del agar de 1%. Logrando resultados con coeficiente de variación de 8,18 mm y 5,89 mm.

Bibliografía

- Añazco-Sánchez, S., y Pozo-Miranda, F. (2021). Evaluación del extracto de Semillas *Citrus paradisi* para inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* en *Litopenaeus vannamei*. *Ciencia Unemi*, 14(35), 1–9. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss35.2021pp1-9p>
- Bromatolog, D. E., Anal-mic-poes, D. E. N., Microbiolog, D., y Preparaci, P. (2021). *PROCEDIMIENTOS DE*.
- Domínguez-borbor, C., Betancourt, I., Panchana, F., Sonnenholzner, S., y Bayot, B. (2019). Una prueba efectiva de desafío del virus del síndrome de la mancha blanca para camarones cultivados utilizando diferentes biomas de la papila infectada. *MétodosX*, 6, 1617–1626. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.007>
- Feria, M., Castañeda, A., Toledo, O., Castillo, D., Cueva, M., y Cedeño, V. (2019). Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista frente a bacterias patógenas de peces. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(2), 908–922. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.15407>
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Galaviz-Silva, L., Robles-Valdez, A., Sanchez-Diaz, R., Ibarra-Gamez, J. C., Gomez-Gil, B., y Molina-Garza, Z. J. (2021). *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute hepatopancreatic necrosis disease in farming shrimp of Sonora, Mexico and their antibiotic resistance. *Hidrobiológica*, 31(2), 111–123. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/1396/1121>
- Palma Gorziglia, V. I. (2021). Efecto de las levaduras *debaryomyces hansenii* 97 y *yarrowia lipolytica* 242 en la motilidad del patógeno *vibrio anguillarum*. [Tesis de

grado, Universidad de Chile].

<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/184066/Efecto-de-las-levaduras-debaryomyces-.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hernández Izquierdo, A. (2021). El antagonismo de rizobacterias y su potencial para controlar los microorganismos causantes de la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill.). [Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].
<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/4240025>

Jiménez, F. J. (2020). *Universidad autónoma de baja california sur*.

Miyata, M., Robinson, R. C., Uyeda, T. Q. P., Fukumori, Y., Fukushima, S.-I., Haruta, S., Homma, M., Inaba, K., Ito, M., Kaito, C., Kato, K., Kenri, T., Kinoshita, Y., Kojima, S., Minamino, T., Mori, H., Nakamura, S., Nakane, D., Nakayama, K., ... Wakabayashi, K.-I. (2020). Tree of motility - A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 25(1), 6–21. <https://doi.org/10.1111/gtc.12737>

Partridge, J. D., y Harshey, R. M. (2020). Investigating Flagella-Driven Motility in *Escherichia coli* by Applying Three Established Techniques in a Series. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 159. <https://doi.org/10.3791/61364>

Romero, J., Albertos, I., Díez-Méndez, A., y Poveda, J. (2022). Control de enfermedades poscosecha en bayas mediante recubrimientos comestibles y probiótico bacterias. *Scientia Horticulturae*, 304, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111326>

Saavedra-olivares, K. Y., Peralta-ortiz, T., Ordinola-zapata, A., Sandoval-ramayoni, J. E., Vieyra-peña, E. G., Zapata-cruz, M. A., Mendoza-neyra, O. A., y Mendoza-dioses, M. E. (2018). Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la

necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. 29(1), 328–338.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000100032

Corral Sabándo, J. (2020). Implementación de la motilidad en la patogénesis bacteriana. [Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona].
<https://www.tdx.cat/handle/10803/671075>

Salcedo Marcelo, M. R. (2021). Efecto Antagónico de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Tocosh sobre *Listeria innocua*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria la Molina].
<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4818/salcedo-marcelo-moises-ricardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Tello, O. A. M. (2018). ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*. [Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noerste, S.C.].
http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2851/1501%20tello_m%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Tilocca, B., Cao, A., y Migheli, Q. (2020). Scent of a Killer: volatiloma microbiano y su papel en el control biológico de patógenos vegetales. *Frontiers in Microbiology*, 11 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>

Ullsco, E., Garzón, V., Quezada, J., y Barrezueta, S. (2021). Análisis del comportamiento económico de la exportación en el sector camaronero en el Ecuador, periodo 2015-2019. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4, 112–119.
<http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/418>

- Villasanta, I. M. (2022). Probióticos como herramientas para luchar contra infecciones. [Trabajo de grados, Universidad de Jaen].
<https://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/17995/1/TFG%20Irene%20Mart%c3%a dn%20Villasanta.pdf>
- Molina Garza, Z. J., Cázares Jaramillo, G. E., Ibarra Gámez, J.C., y Galaviz Silva, L. (2021). Actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a *Vibrio parahaemolyticus* AHPND como patógeno de camarón en cultivos. *AquaTechnica*, 3(2), 78-90. DOI <https://doi.org/10.33936/at.v3i2.3800>
- Nguyen V, T., Alfaro, A., Bayot Arroyo, B., Rodríguez León, J. A., y Sonnenholzner, E. (2021). Respuestas metabólicas de camarones peneidos a la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda causada por *Vibrio parahaemolyticus*. *Acuicultura*, 533, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848620338801>
- Tomalá Beltran, C. (2020). “Bacteria simbiótica marina *Pseudovibrio denitrificans* excluye vibrios patógenos y modifica la microbiota en camarón”. [Tesis de Maestría, ESPOL].
<http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/2020/Publicaciones/tesis/2020%20CEcilia%20Tomala.pdf>
- González Tinoco, Y., y Dreyfus, G. (2015). Motilidad de las bacterias marinas del género *Vibrio*. *REB*, 34(4), 98-108. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2015/reb154c.pdf>
- Tello Olea, M. A. (2018). Uso, manejo y preservación de los recursos naturales (Orientación Biotecnología). [Tesis de maestría, Centro de investigaciones biológicas del Nordeste, S.C].

https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1501/1/tello_m%20TESIS.pdf