



**Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
SEDE MANABÍ  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA CEPA AZPM -  
325 PROVENIENTE DE SEDIMENTO ESTUARINO DEL RÍO CHONE EN  
BAHÍA DE CARÁQUEZ**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS**

**SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
MICROBIOLOGÍA**

**PREVIO AL TÍTULO DE  
BIÓLOGA**

**AUTOR  
MARÍA ISABELLA ARTEAGA ZAMBRANO**

**TUTOR  
FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA, Mgtr.**

**BAHÍA DE CARÁQUEZ, MAYO 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, *Biól., 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

---

Gabriel Durán Cobo, *M. Sc.*

Segundo Lector

---

Francisco Pozo Miranda, *M. Sc.*

Tercer Lector

Bahía de Caráquez, abril del 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.

---

María Isabella Arteaga Zambrano

CI: 1311708240

Teléfono: 099-579-7581

[isabella.arteaga0701@gmail.com](mailto:isabella.arteaga0701@gmail.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.

---

María Isabella Arteaga Zambrano

CI: 1311708240

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico con todo mi amor a mi papá, Oscar Arteaga y a mi abuelo Eudaldo Zambrano, que con su ejemplo de perseverancia y fuerza han inspirado tanto en mi desde siempre.

A Mamá, mi hermana, Abuela Biutthy y Abuela Lida, ustedes son mi mayor fortaleza e inspiración para salir adelante y cumplir mis sueños.

A la inmensa naturaleza que con sus maravillas sembró en mí, el amor a la Biología y me ha llevado a conocer mi verdadera vocación en la vida.

A todos mis amigos y familia, sin ustedes esto no sería posible.

## **Agradecimiento**

Culminar mi carrera de Biología me ha dejado muchas enseñanzas y me ha permitido descubrir mi verdadera vocación. Es por eso que quiero agradecer a mi padre, Oscar que con todo el amor del mundo siempre luchó por darme lo mejor y me apoyó en todo momento, a mi madre que con su amor infinito me ha convertido en lo que soy hoy en día y a mi hermana por siempre estar y creer en mí.

Así mismo agradecer a Hilary por ser la mejor amiga que la vida me pudo dar. A Luigi por ser mi fortaleza y mi felicidad en toda mi carrera, te amo con todo mi corazón.

A mis amigas Judith, Nancy, Fabia, Mishel, Stefany, Kareen y Nayely por crecer conmigo y darme los mejores consejos. A mis amigos de la universidad que se convirtieron en amigos para toda la vida, gracias por los recuerdos compartidos y por enseñarme tanto, los llevaré siempre conmigo.

También a mis profesores: M.Sc. Evelyn Cedeño, M.Sc. Francisco Pozo, M.Sc. Gabriel Durán, M,Sc. Kruger Loor y Dr. Eduardo Barahona, gracias por darme las mejores enseñanzas en estos cuatro años de carrera y por ser un ejemplo para seguir.

A mi tutor, M.Sc. Francisco Pozo por tener tanta paciencia y brindarme sus conocimientos en la elaboración de mi trabajo de tesis.

A mí misma por lograr cumplir mi sueño de graduarme de la carrera que amo.

## Resumen

La presente investigación cuantitativa buscó evaluar la capacidad inhibitoria de *Bacillus subtilis* cepa AZPM-325 aislada del estuario del río Chone en Bahía de Caráquez mediante antagonismo dual, dada la importancia de estudiar los probióticos y sus nuevas cepas, como una de las mejores alternativas a los antibióticos, capaces de brindar múltiples beneficios a la salud digestiva de los organismos que habitan. Por esta razón, se realizó este estudio experimental - explicativo entre octubre y diciembre de 2022. Para la identificación molecular, se realizó la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN), amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 16 y secuenciación. En cuanto al antagonismo dual, se sembró el inóculo bacteriano en medio de cultivo *Luria-Bertani (LB)* a 1% de agar; para determinar el crecimiento bacteriano a salinidad (2%,4%,6%,8% y 10%) y pH (3.0,4.0,5.0,6.0 y 7.0), se sembró 50 µl del inóculo bacteriano en el medio *LB* durante 24h. Los hallazgos de la identificación molecular determinan que la cepa aislada es *B. subtilis*; las pruebas de antagonismo dual identifican que la bacteria no posee capacidad inhibitoria frente al patógeno (*Vibrio parahaemolyticus*); sin embargo, sí presenta recubrimiento sobre este (t de *Student*  $p < 0.05$ ). En las pruebas de bajo pH y salinidad alta, *B. subtilis*-AZPM-325 logra tener un crecimiento significativo respecto al control *ANOVA* ( $p > 0.05$ ). Se establece que *B. subtilis*-AZPM-325 es una bacteria con gran potencial probiótico, que, respecto al control, presenta buenos resultados en los diferentes tratamientos.

*Palabras clave:* *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus*, antagonismo, salinidad, pH

## Abstract

This quantitative research study aimed to evaluate the inhibitory effects of *Bacillus subtilis* strain named AZPM-325 isolated from the Chone River Estuary in *Bahía de Caráquez* using dual antagonism tests, regarding the importance of studying probiotics and their new strains as one of the best alternatives to antibiotics, which confer several digestive health benefits to the host animals. Therefore, this experimental - explanatory research study was carried out from October to December 2022, so that deoxyribonucleic acid (DNA) extraction, DNA polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA fragments 16, and sequencing were carried out for molecular identification. As per dual antagonism tests, bacterial inoculum was grown in *Luria-Bertani* broth (LB) at 1% agar; to calculate bacterial cell growth at different salinity (2%,4%,6%,8% and 10%) and pH (3.0,4.0,5.0,6.0 and 7.0), 50 µl of the bacterial inoculum was cultured on *LB* medium for 24 h. The molecular identification findings determine that the isolated strain corresponds to *B. subtilis*; dual antagonism tests identify that the bacterium has not been shown to have inhibitory effects against the pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*); however, the bacterium coats it (Student's t-test  $p < 0.05$ ). In the low pH and high salinity tests, *B. subtilis*-AZPM-325 achieves significant growth compared to the ANOVA control  $p > 0.05$ . It is conclusive that *B. subtilis*-AZPM-325 is a great probiotic potential bacterium, which compared to control group obtains good results in the different treatments.

*Keywords:* *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus*, antagonism, salinity, pH

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>3</b>
Obtención de la cepa .....	3
Identificación molecular .....	3
Extracción del ADN.....	3
Amplificación del ADNr 16S mediante PCR.....	4
Visualización y purificación del ADN .....	4
Secuenciación .....	4
Inhibición por antagonismo dual .....	5
Crecimiento bacteriano .....	5
Tolerancia a salinidades.....	5
Resistencia a pH ácido .....	5
Evaluación de resistencia a antibiótico.....	6
Análisis estadístico .....	6
<b>Resultados.....</b>	<b>7</b>
Identificación de la cepa .....	7
Crecimiento Bacteriano .....	8
Antagonismo dual .....	9
Resistencia a Antibiótico.....	9
3.5 Tolerancia a Salinidades.....	10
Resistencia a pH ácido .....	11
<b>Discusión .....</b>	<b>12</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>14</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>15</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Secuencia consenso de nucleótidos, código B484 ensamblado en el programa Geneious.....	8
<b>Tabla 2:</b> Coincidencia de la especie <i>Bacillus subtilis</i> según la secuencia de nucleótidos. Obtenida de NCB.....	8

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Capacidad de Crecimiento bacteriano entre el control y la <i>Bacillus subtilis</i> cepa AZPM-325.....	7
<b>Gráfico 2:</b> Análisis de la movilidad entre el control y la <i>Bacillus subtilis</i> cepa AZPM-325 .....	8
<b>Gráfico 3:</b> Análisis de resistencia a antibiótico de la bacteria control y <i>Bacillus subtilis</i> cepa AZPM- 325.....	9
<b>Gráfico 4:</b> Tolerancia a salinidades entre el control y la <i>Bacillus subtilis</i> cepa AZPM-325 .....	10
<b>Gráfico 5:</b> Crecimiento de control y <i>Bacillus subtilis</i> cepa AZPM-325 sometidas a distinto nivel de pH .....	11

## Introducción

Las bacterias habitan en diversos ecosistemas, incluso en condiciones extremas, como el sistema digestivo de los camarones, el cual presenta factores adversos para la vida microbiana. Aun así, existe la proliferación de bacterias patógenas, entre las más comunes encontramos a distintos tipos de *Vibrio* que afectan negativamente a la salud del camarón (Dehkordi et al., 2022). Es por esto, que se han buscado varias alternativas para tratar enfermedades microbianas, una de ellas es el uso de bacterias probióticas que pueden mejorar el desempeño ambiental y la dietética de estos organismos, así como reforzar su sistema inmunológico. Varias investigaciones detallan el uso de bacterias probióticas que proveen beneficios a la salud de sus huéspedes en cantidades adecuadas, convirtiendo a los probióticos en una alternativa a los antibióticos (Knipe et al., 2021).

Las bacterias probióticas son microorganismos no patógenos que tienen el potencial de mejorar la defensa innata de su hospedero, la resistencia a patógenos en periodos de estrés, promover una buena digestión, resistencia a infecciones y la producción de sustancias inhibidoras (Madhana et al., 2021). Estos microorganismos actúan liberando sustancias químicas con efecto bactericida sobre los patógenos que se encuentran en el intestino del huésped, ejerciendo así una barrera contra las bacterias patógenas. Este efecto se debe a factores como: producción de enzimas, antibióticos y variación del pH intestinal por parte de las bacterias probióticas (Martinez et al., 2012).

Durante los últimos años, el uso de probióticos en la acuicultura ha aumentado por ser una gran alternativa, sin embargo, se debe cuidar la selección de probióticos a usar, ya que la mala elección de bacterias puede provocar un desequilibrio en la flora intestinal. Cada vez se han impulsado más los estudios de probióticos en la acuicultura, ya que actúan como

promotores de crecimiento y mejoran su salud, a pesar de ello, se necesitan más investigaciones que prueben su efecto respecto a la reproducción y la tolerancia al estrés (Wang et al., 2020).

Varios estudios enfocados a la evaluación del efecto de bacterias probióticas y antibióticos para fortalecer el crecimiento, y la supervivencia de juveniles de *Litopenaeus vannamei*, determinaron que la aplicación de estos tiene gran potencial como alternativa al uso de antibióticos costosos y potencialmente nocivos (García-Bernal et al., 2020).

Wanna et al., (2021), investigó el potencial probiótico de la cepa *Pediococcus pentosaceus* MR001, aislado de *Macrobrachium rosenbergii*, mediante ensayos de alimentación y caracterización genética, como resultados obtuvo que los camarones que recibieron la dieta probiótica tenían intestinos más saludables y una tasa de supervivencia alta. Así, varios estudios relacionados a probióticos mediante metaanálisis de supervivencia, producción y respuesta inmune de los camarones frente a los probióticos han demostrado mejoras en el rendimiento, supervivencia de organismo en cultivo (Golder et al., 2022).

Ante estos antecedentes, el uso de microorganismos probióticos supone una gran oportunidad ante la problemática de la constante amenaza de enfermedad para organismos en cultivo y otras especies como es la Vibriosis, causada por bacterias Gram negativas de la familia *Vibrionaceae* y la cepa *V. parahaemolyticus* siendo esta la encargada de ocasionar el Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS) / Síndrome de Necrosis Hepatopancreática Aguda la cual es considerada una de las infecciones más peligrosas con una tasa alta de virulencia para organismos acuáticos y tasa de crecimiento muy baja de los mismos (Dehkordi et al., 2022). La investigación dirigida a evaluar la capacidad probiótica de la cepa AZPM -325, cumplió con tres objetivos específicos, logrando establecer un microorganismo con potencial inhibitorio útil para la acuicultura.

## **Metodología**

### **Obtención de la cepa**

Las muestras de sedimento se tomaron en el estuario del río Chone, en la ciudad de Bahía de Caráquez a la altura del puente “Los Caras”. Se tomaron 100 gr de sedimento superficial (10cm), para trasladarlo en refrigeración hasta el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica Sede Manabí en el campus Bahía de Caráquez.

Se tomó 1 gr del sedimento colectado para diluirlo en 100 ml de solución salina (2 % NaCl), luego se tomó una alícuota (100 µl) para sembrar en cajas Petri con agar Luria-Bertani (LB) al 2 % NaCl y se incubó por 96h a 30°C. Se evaluó cada 24h el cultivo hasta observar halos de inhibición. Las colonias que mostraron inhibición se aislaron hasta obtener una cepa probiótica pura. Posteriormente se confirmó la actividad antimicrobiana mediante pruebas de inhibición en cajas Petri.

En cuanto al control se utilizó un consorcio de microorganismos probióticos del producto comercial EMBIO PLUS.

### **Identificación molecular**

Para una identificación certera de la especie de bacteria se procedió a la evaluación molecular.

### **Extracción del ADN**

De acuerdo con Grewe et al., (1993), se tomaron colonias de la cepa AZPM-325 en una cantidad de 100 mg y se transfirieron a un tubo eppendorf (1.5 ml) de 700 µl de CTAB y 20-30 µl de proteinasa K. Luego se procedió a incubar en un baño de agua a 55 °C durante tres horas, para la digestión de las proteínas.

Posteriormente, se agregaron 400  $\mu$ l de fenol:cloroformo en una proporción de 24:1 en cada tubo y se invirtieron suavemente de 8 a 10 veces antes de centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos. Obtenido el precipitado, se recuperó 300  $\mu$ l de sobrenadante para mezclar 200  $\mu$ l de isopropanol y centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min.

Se descartó el sobrenadante y el sedimento de ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70 % a una temperatura baja (4 °C), se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm, después se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó durante 3 horas, finalmente este fue disuelto en 200  $\mu$ l de agua ultrapura.

### **Amplificación del ADNr 16S mediante PCR**

Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región del gen 16s de ARNr del ADNmt (ADN mitocondrial). El ciclo de amplificación por PCR fue el siguiente; una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguida de 34 ciclos de 96°C en 5 min, 95°C por 30 s, 55°C en 30 s, 72°C por 30 s, y un paso final de elongación de 72°C durante 5min (Wilson et al, 1990).

### **Visualización y purificación del ADN**

Después de la amplificación, los productos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % y se visualizaron bajo un transiluminador UV para garantizar la calidad del producto de la PCR (Nieto., 2005).

### **Secuenciación**

El producto purificado de ADN, se secuenció en un analizador genético usando el método de secuenciación de Sanger, acorde al servicio contratado a la empresa Macrogen.

### **Inhibición por antagonismo dual**

El antagonismo dual es la inhibición entre dos microorganismos en el cual una de ellas causa efectos negativos sobre la otra. Para esto se sembró de manera directa del inóculo bacteriano de 3  $\mu\text{l}$  en el medio de cultivo semisólido, se depositó en puntos equidistantes (2 cm) en cajas Petri (90 mm de diámetro), los cuales fueron preparadas con medio de cultivo LB (2% NaCl) a 1% de agar. Se consideraron cinco réplicas de antagonismo por enfrentamiento dual. Las placas se mantuvieron a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ , se tomó el registro del crecimiento a partir de las 6 horas (Añasco y Pozo, 2021).

### **Crecimiento bacteriano**

A partir de un cultivo de 24 horas ( $1.0\text{ D.O } 10^{10}\text{ UFC}$ ) en caldo LB y medio de cultivo técnico, la cepa se cultivó en 50 ml de caldo LB, habiendo sido inoculadas a razón de 1:10 en el mismo medio e incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente se realizaron conteos cada 2 horas mediante un hematocitómetro y espectrometría para establecer la capacidad de crecimiento.

### **Tolerancia a salinidades**

Se tomó una alícuota de suspensión bacteria ( $1.0\text{ D.O.}$ ) para inocular en medio de cultivo LB suplementado con distintas concentraciones de NaCl (2.4, 6.0, 8.0, 10.0% p/v), luego se incubó a  $30^\circ\text{C}$  durante 24 h., el crecimiento se determinó mediante la medición de la densidad óptica (D.O.) a 605 nm después de las 24 h (Rondón et al., 2008).

### **Resistencia a pH ácido**

Se usó la cepa AZPM - 325 para evaluar la resistencia a diferentes pH, se inoculó 50  $\mu\text{l}$  de la bacteria a una densidad de  $\text{D.O.} = 1.0$  en medio LB ajustado a pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, y

7.0 con ácido clorhídrico (0.02N) y se incubó a 30°C durante 24 h. bajo condiciones anaeróbicas.

Su cuantificación se realizó antes de la incubación (h0) y después de la incubación (h1) por medio de espectrofotometría a D.O.

### **Evaluación de resistencia a antibiótico**

Con un hisopo se inoculó por barrido, una suspensión bacteriana de 0.1% de densidad óptica medida en el espectrofotómetro (Spectroquant ® NOVA60) a 600 nm de longitud de onda (D.O 600 = 0,1) y se incubó por 24 h a 30±1°C. En cada plato Petri se añadieron discos de Tetraciclina (30 µg) para establecer la resistencia microbiana. Los análisis se realizaron con 5 réplicas por concentración de acuerdo con Pardo., Monsalve., Ereira., Espinosa., & Jaramillo., (2017); Añazco y Pozo (2021).

### **Análisis estadístico**

En el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS (versión 25). Para evaluar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk ( $p=0.05$ ) y para la homocedasticidad se empleó la prueba de Levene ( $p=0.05$ ). Comprobado el supuesto de normalidad y homocedasticidad, el análisis de varianza se realizó con un nivel de significancia con ( $\alpha = 0.05$ ). La prueba de Tukey se utilizó para establecer comparaciones múltiples entre las medias aritméticas, fue usada para Salinidad y pH. La Prueba T de Student ( $p=0.05$ ) para determinar diferencias entre dos muestras y está se utilizó en: Crecimiento Bacteriano, Antagonismo y Resistencia a Antibiótico. Todos los datos evaluados fueron el producto de 5 réplicas experimentales.

## Resultados

### Identificación de la cepa

Existen muchos microorganismos denominados BAL, consideradas especies importantes por su actividad probiótica. Así la declaración de un nuevo microorganismo con actividad probiótica debe ser identificada con mayor exactitud. Inicialmente se tomó al aislado AZPM – 325, para la identificación molecular, definiendo la especie como *Bacillus subtilis* cepa AZPM – 325 (tabla 1) y la secuencia de nucleótidos mostraron un 100% de coincidencia con *B. subtilis* (tabla 2):

Tabla 1.

*Secuencia consenso de nucleótidos, código B484 ensamblado en Geneious.*

```
TCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAA
GACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGTCT
TGC GACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGC
CACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCAATTCACCGCTACACGTGGAATTCACACTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATG
ACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTG
CCACTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCA
CTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAA
GATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC
```

Tabla 2.

*Coincidencia de la especie Bacillus subtilis según la secuencia de nucleótidos. Obtenida de*

*NCBI*

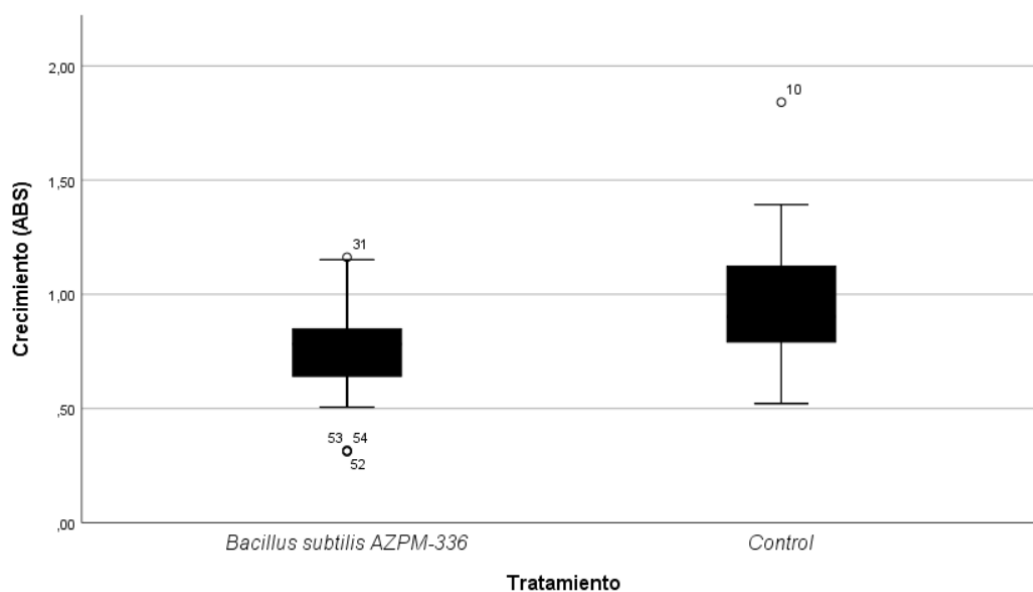
Especie	Puntaje Máximo	Puntaje Total	Cubierta de Consulta	Valor E	% Identificado	Acceso Largo	Código de Accesión
<i>Bacillus subtilis</i> cepa WW-185 16S ribosomal RNA gen, secuencia parcial	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1459	<a href="#">OM914861.1</a>

## Crecimiento Bacteriano

Para definir el crecimiento entre la bacteria control y *Bacillus subtilis*-AZPM-325, mediante la prueba T de Student se buscó establecer diferencias significativas con un nivel de significancia menor a 0.05. Se observó que el crecimiento bacteriano tanto del control y *Bacillus subtilis*-AZPM-325 no presentó diferencia estadística ( $p = \geq 0.05$ ), el promedio de crecimiento para control fue de 0.96 absorbancia (abs) y *Bacillus subtilis* AZPM-325 con 0.76 abs mostrando que el crecimiento microbiano de las dos especies fue similar (Gráfico 1).

Gráfico 1.

*Capacidad de Crecimiento bacteriano entre el control y la Bacillus subtilis cepa AZPM-325.*

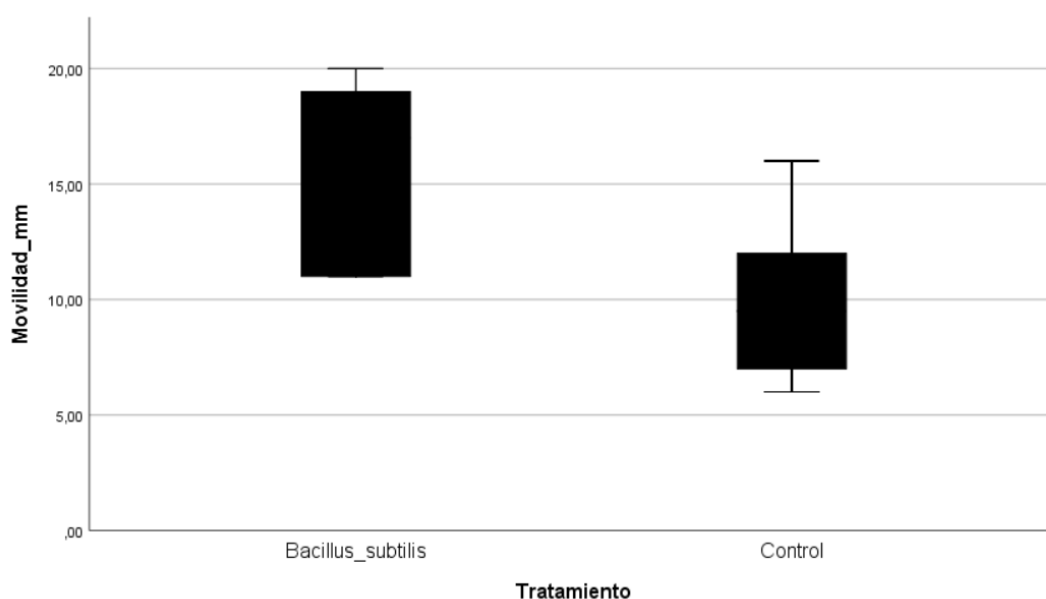


## Antagonismo dual

El antagonismo dual se analizó considerando la movilidad de la bacteria probiótica. Al evaluar los resultados de la movilidad de las bacterias probióticas mediante la prueba de T de Student ( $p < 0.05$ ) se determinó que aun cuando no existen diferencias significativas en la movilidad, se observó que *Bacillus subtilis*-AZPM-325 presentó un promedio de  $15.8 \pm 4.1$  mm movilidad, mientras que para la bacteria control (comercial) el promedio fue de  $10.0 \pm 3.9$  mm como se observa en la Gráfico 2. En cuanto al porcentaje de recubrimiento este fue más alto en *B. subtilis*-AZPM-325 (30%) y comparado con la bacteria control (16%).

Gráfico 2.

*Análisis de la movilidad entre el control y Bacillus subtilis cepa AZPM-325.*



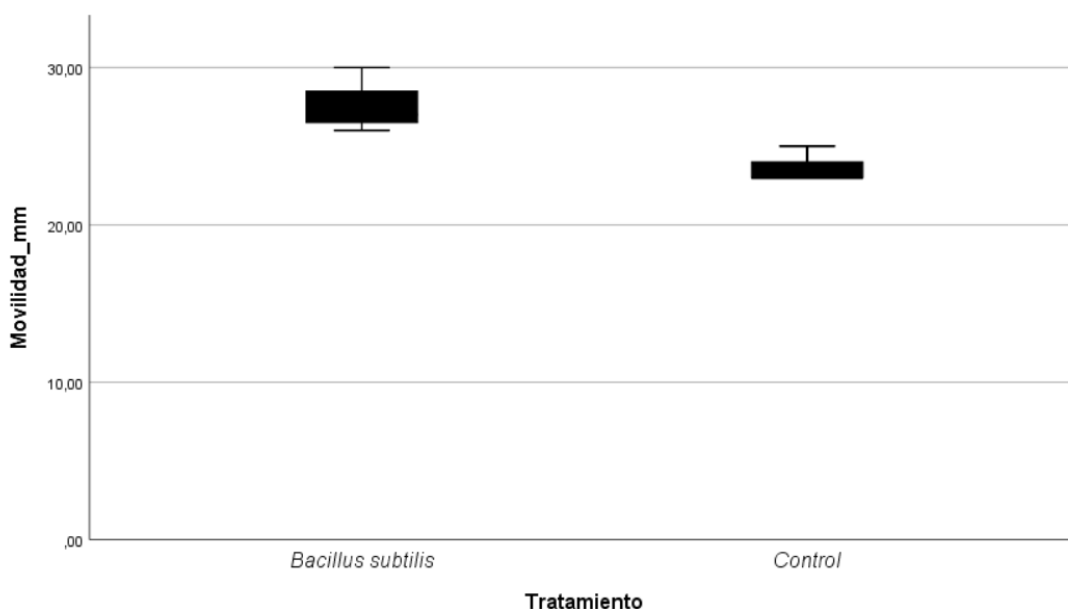
## Resistencia a Antibiótico

En cuanto a la resistencia a antibiótico para definir la capacidad de la bacteria a condiciones toxicas (antibióticos); Los resultados mostraron diferencias significativas (t Student  $p < 0.05$ ) entre las dos bacterias probióticas evaluadas (control-*B. subtilis*-AZPM-325)

demostrando que *B. subtilis*-AZPM-325 puede actuar frente a tratamientos de antibióticos. En cuanto a la bacteria control presentó menor resistencia al antibiótico Tetraciclina (disco de inhibición a 30  $\mu$ g) con un promedio de halo de inhibición de  $23.6 \pm 1.1$  mm, mientras la bacteria *B. subtilis*-AZPM-325 presentó mayor resistencia (promedio de  $27.6 \pm 2.0$  mm) como se muestra en la Gráfico 4).

Gráfico 3.

*Análisis de resistencia a antibiótico de la bacteria control y la Bacillus subtilis cepa AZPM-325.*



### Tolerancia a Salinidades

Al evaluar la tolerancia y la salinidad de la bacteria probiótica aislada se pudo establecer mediante la prueba de ANOVA =  $p < 0.05$ , que si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Detectadas las diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la prueba de contraste de Tukey ( $p < 0.05$ ), se observó que existen diferencias estadísticas entre la bacteria control (comercial) a salinidad del 2% comparado la bacteria *Bacillus subtilis*-

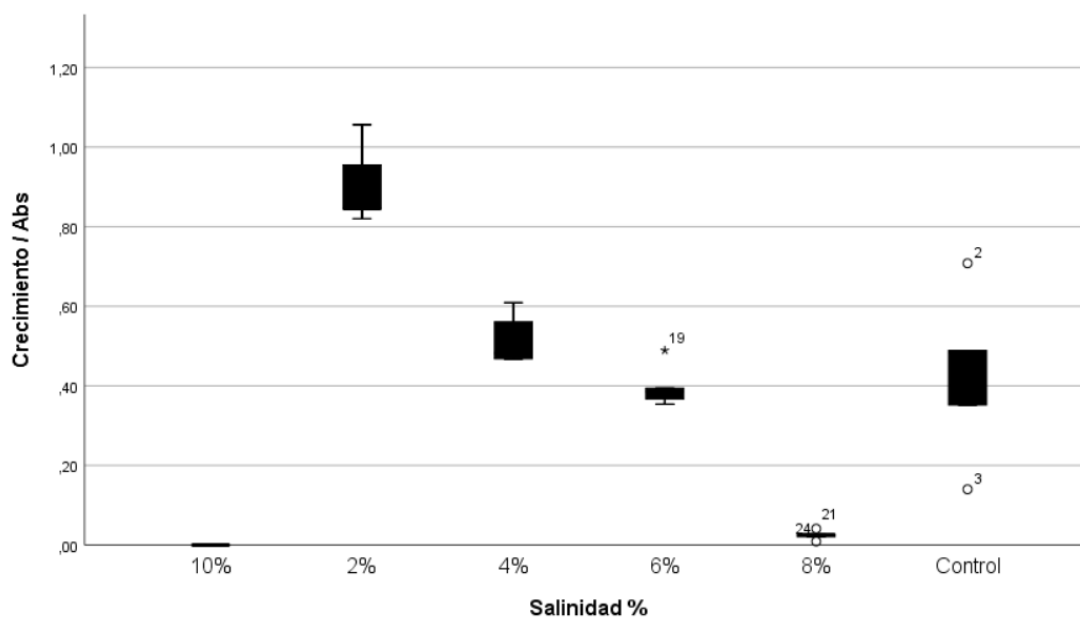
AZPM-325 al 2%, 8% y 10% salinidad. Mientras que al 4% y 6% no presentó diferencias significativas en su crecimiento respecto al control (comercial).

La salinidad en la que presentó mayor crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*-AZPM-325 fue al 2% con un nivel de absorbancia de  $0.90 \pm 0.09$  abs, mientras que a salinidad de 8% y 10% la absorbancia se redujo a un nivel de  $0.02 \pm 0.01$  y  $0.0 \pm 0.0$  abs. respectivamente.

Gráfico 4.

*Tolerancia a salinidades entre el control y la Bacillus subtilis cepa AZPM-325.*

*Barras verticales representan el error estándar a nivel alfa 0.05.*



### Resistencia a pH ácido

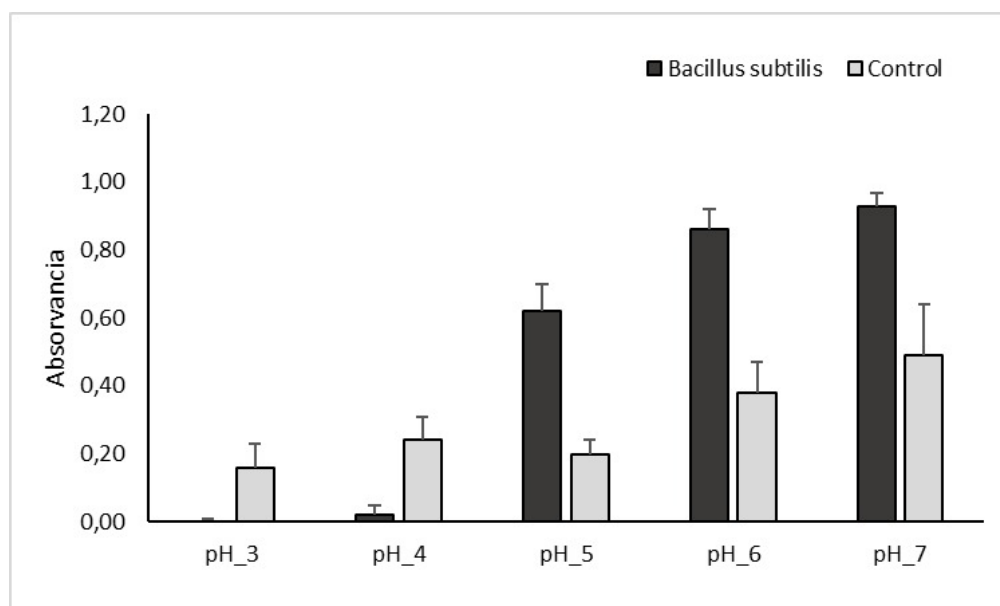
Los datos obtenidos del crecimiento fueron evaluados mediante ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) que muestra que existen diferencias significativas en el crecimiento de *Bacillus subtilis*-AZPM-325 a diferentes niveles de pH, mientras que en la bacteria control el crecimiento fue igual (ANOVA  $p \leq 0.05$ ) en todos los niveles de evaluación.

Según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para *Bacillus subtilis*-AZPM-325, el crecimiento se redujo significativamente a pH 3 ( $<0.0$  abs), 4 ( $0.01 \pm 0.02$  abs) y 5 ( $0.61 \pm 0.07$  abs). En cuanto a la bacteria control, su crecimiento fue bajo y no presentó diferencia significativa en el crecimiento con registro de pH 3 ( $0.16 \pm 0.07$ ), pH4 ( $0.24 \pm 0.07$ ) y pH5 ( $0.19 \pm 0.03$ ) (Gráfico 6).

Gráfico 5.

*Crecimiento de control y Bacillus subtilis cepa AZPM-325 sometidas a distinto pH.*

*Barras verticales representan el error estándar a nivel alfa 0.05.*



## Discusión

La industria acuícola está en constante innovación con el desarrollo de nuevas cepas de bacterias probióticas de utilidad para los cultivos, por ello es importante el desarrollo de nuevos microorganismos con capacidad benéfica (De Lourdes., 2020). La identificación molecular, así como la detección de genes de toxinas antimicrobianas son indispensables para seleccionar

especies probióticas (Olmos et al., 2020). Estudio realizado por Lu en 2018, mediante caracterización de la morfología de la colonia, prueba bioquímica, amplificación por PCR de 16S rRNA y el análisis de secuencia determinó la presencia de bacterias del género bacilos Gram positivas identificadas como *B. subtilis* la cual logró la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Lu et al., 2018).

Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo de investigación, al identificar a la bacteria como *Bacillus subtilis*, la cual logró antagonismo significativo ( $p < 0.05$ ) contra *Vibrio parahaemolyticus*. Aun así, esta actividad antimicrobiana no es exclusiva para este género de bacterias. Así, se ha reportado que aislados de cepas autóctonas compatibles del género *Lactobacillus* y *Enterococcus* del intestino y branquias de tilapia *O. niloticus* también poseen potencial probiótico (Ibargüen et al., 2021).

Otro aspecto importante para lograr un efecto antagónico es la capacidad de crecimiento de las bacterias (probióticas). En este estudio se comparó la velocidad de crecimiento entre una bacteria con capacidad probiótica comercial y la *Bacillus subtilis*-AZPM-325, los resultados mostraron que ambas crecen al mismo ritmo, lo cual cumple con el requisito de fácil cultivo y rápido crecimiento de una bacteria candidata probiótica (Samson et al., 2020).

Así mismo para definir a un microorganismo probiótico se toma en cuenta la capacidad de colonizar y desplazar a bacterias patógenas (antagonismo). Un estudio de antagonismo mediante la técnica de cultivos duales, entre *Bacillus subtilis* y *Alternaria spp* observa que *B. subtilis* posee actividad biocontroladora de *Alternaria spp* (Ñacato & Valencia., 2016). De igual forma se ha logrado establecer la capacidad probiótica frente *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Flavobacterium columnare* y *Staphylococcus aureus* pero a partir de extractos de proteínas de la membrana externa de *Bacillus subtilis* (Das et al., 2016).

A pesar de que bacterias del género *Bacillus* poseen ventajas o características positivas y una amplia gama de actividades antagónicas (Amenyogbe et al., 2021), en nuestros resultados no se logró establecer antagonismo antimicrobiano (péptidos bactericidas) frente a *V. parahemolyticus*. Esto podría explicarse debido a que los miembros del género *Bacillus* pueden producir más de un tipo de metabolito antimicrobiano según Liu et al (2015), además los metabolitos pudieron ser degradados por la temperatura en el desarrollo del cultivo en caja Petri, así reduciría la actividad antimicrobiana contra *V. parahemolyticus*, sin embargo, logró establecer una alta tasa de recubrimiento similar al control.

En el caso de la tolerancia a Salinidades y pH se observó que la bacteria *Bacillus subtilis*- AZPM-325 puede proliferar de forma significativa ( $p < 0.05$ ) a salinidades superiores a 2.0% y a pH ácidos, resultados similares fueron reportados por (Lalloo et al., 2008), en el cual crecimiento de *B. cereus* lograba mantenerse a través de diferentes rangos de pH y salinidad típicamente. Aunque el autor describe que un factor más relevante era el cambio de temperatura cuyo efecto observado fue la germinación de esporas y células vegetativas (Lalloo et al., 2008). Finalmente, al estudio se le adicione una prueba de resistencia a antibiótico, esto ante la posibilidad de usar tratamientos con agentes antibióticos en los sistemas de cultivos que podrían desfavorecer a la bacteria probiótica, aquí, nuestros resultados muestran una leve resistencia a estos agentes controladores (Tetraciclina). Esta actividad se consideraría benéfica sobre un agente probiótico. En general la bacteria *Bacillus subtilis*- AZPM-325 podría ser considerada como una bacteria probiótica para el uso en la acuicultura de camarón.

### **Conclusiones**

- Mediante herramientas moleculares se identificó a la bacteria con código AZPM-325 como un microorganismo de la especie *Bacillus subtilis*, confirmando que si se trataba de una bacteria con capacidad probiótica.

- Se determinó que la especie de ensayo identificada (*B. subtilis*) no presenta capacidad inhibitoria como bactericida frente al patógeno (*V. parahaemolyticus*), sin embargo, su capacidad inhibitoria por recubrimiento es bastante alta, demostrando que si posee característica probiótica mediante 1) la rápida colonización del espacio dual, y 2) gran recubrimiento de la bacteria patógena, lo cual logró reducir la movilidad (T de Student  $p < 0.05$ ) de *V. parahaemolyticus*.
- Establecido las características benéficas de la bacteria Bacillus subtilis-AZPM-325, se determinó que posee crecimiento microbiano mediante la tolerancia a factores como pH bajos y salinidad alta, condiciones similares al tratamiento control (ANOVA  $p > 0.05$ , y a condiciones semejantes del sistema digestivo del camarón, esto determina que *B. subtilis*-AZPM-325 es una bacteria con alto potencial probiótico.

### **Bibliografía**

Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, Y., & Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica*, 20(2), 161-170.)

- Amenyogbe, E., Huang, J. S., Chen, G., & Wang, W. Z. (2021). Probiotic potential of indigenous (*Bacillus* sp. RCS1, *Pantoea agglomerans* RCS2, and *Bacillus cereus* strain RCS3) isolated from cobia fish (*Rachycentron canadum*) and their antagonistic effects on the growth of pathogenic *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Streptococcus iniae*, and *Streptococcus agalactiae*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 672213.
- Añazco-Sánchez, S., & 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.
- Bernal, MG, Marrero, RM, Córdoba, Á. IC, Tovar-Ramírez, D., Frías, JDB, Ormart-Castro, P., & Mazón-Suástegui, JM (2020). Crecimiento y supervivencia del camarón *Penaeus vannamei* con aplicación de actinomicetos probióticos y homeopatía. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 2 (2), 76-85.
- Das, Basanta & Nidhi, R.G. & Roy, P. & Muduli, Anil & Swain, Pranati & Mishra, Sudhansu S. & Jayasankar, Pallipuram. (2014). Antagonistic Activity of Cellular Components of *Bacillus subtilis* AN11 against Bacterial Pathogens. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 3. 795-809.
- de Lourdes Pérez-Chabela, M., Yenizey, M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión The probiotics and their metabolites in aquaculture. A review. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105.
- Dehkordi, S. M. H., Anvar, S. A., Rahimi, E., Ahari, H., & Ataee, M. (2022). Molecular investigation of prevalence, phenotypic and genotypic diversity, antibiotic resistance, frequency of virulence genes and genome sequencing in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lobster. *International Journal of Food Microbiology*, 109901.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Global Aquaculture Production. Available online: <http://www.fao.org/fishery/statistics/en> (accessed on 8 December 2021).
- Golder, H. M., Simon, A. A. S., Santigosa, E., de Ondarza, M. B., & Lean, I. J. (2022). Effects of probiotic interventions on production efficiency, survival rate, and immune responses of shrimp: A meta-analysis and meta-regression. *Aquaculture*, 552, 737973.
- Grewe, P. M., Krueger, C. C., Aquadro, C. F., Bermingham, E., Kincaid, H. L. & Maid, B. (1993). Mitochondrial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into Lake Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 2379–2403.
- Ibargüen, A., Ocampo, T., Garcés, K., & Córdoba, M. (2021). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS DE TILAPIAS (*Oreochromis niloticus*) CON POTENCIAL USO PROBIÓTICO PARA LA CRÍA Y LEVANTE DE ESPECIES DE INTERÉS ACUÍCOLA. *Revista MODUM*, 3.
- Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D. y Tyler, CR (2021). Probióticos y exclusión competitiva de patógenos en la acuicultura del camarón. *Reseñas en Acuicultura*, 13 (1), 324-352.
- Kociubinski, G., Perez, P., & De Antoni, G. R. A. C. I. E. L. A. (1999). Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of food protection*, 62(8), 905-912.
- Laloo, R., Maharajh, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2008). Functionality of a *Bacillus cereus* biological agent in response to physiological variables encountered in aquaculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 79, 111-118.

- Liu, X. F., Li, Y., Li, J. R., Cai, L. Y., Li, X. X., Chen, J. R., & Lyu, S. X. (2015). Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*, 795-803.
- Lu, Z., Guo, W., & Liu, C. (2018). Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, *80*(3), 427-433.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN microbiology*, 2012, 916845. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Munaeni, W., Yuhana, M., Setiawati, M., & Wahyudi, A. T. (2020). Effect in white shrimp *Litopenaeus vannamei* of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Powder on immune genes expression and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish & shellfish immunology*, *102*, 218-227.
- Nieto, J. E., Ramos, L., & Motte, E. (2005). Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Foresta Veracruzana*, *7*(2), 1-6.
- Ñacato Suntaxi, C. A., & Valencia Gordón, M. F. (2016). *Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp en Brassica oleracea var. italica* (Bachelor's thesis).
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., & Pitones, V. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of microbiology*, *202*, 427-435.
- Pardo., C., Monsalve., G., Erira., A., Espinosa., Y., & Jaramillo., G. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus reticulata* sobre *Fusobacterium nucleatum*

asociada a enfermedad periodontal Antimicrobial effect of essential oil of *Citrus reticulata* on *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, (2), 7-14. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n2/0123-3475-biote-19-02-00007.pdf>

Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Bajaña, L., Betancourt, I., Rodríguez, J., Bayot, B., & Reyes, A. (2021). Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolicus*). *Microbiome*, 9(1), 1-20.

Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Laurencio, M., Pérez, M., Samaniego, L. M., Bocourt, R., & Rodríguez, S. (2008b). 15 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROPIEDADES DE POLLOS DE CEBA ISOLATION , IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE PROBIOTIC PROPERTIES OF *Lactobacillus* sp . STRAINS OBTAINED FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS. *CYTA*, 6(1135–8122), 56–63. <https://doi.org/10.1080/11358120809487628>

Samson, J. S., Choresca Jr, C. H., & Quiazon, K. M. A. (2020). Selection and screening of bacteria from African nightcrawler, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867) as potential probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 16.

Seethalakshmi, P. S., Rajeev, R., Kiran, G. S., & Selvin, J. (2021). Shrimp disease management for sustainable aquaculture: innovations from nanotechnology and biotechnology. *Aquaculture International*, 29(4), 1591-1620.

Wang, Y., Al Farraj, DA, Vijayaraghavan, P., Hatamleh, AA, Biji, GD y Rady, AM (2020). Enzimas digestivas inducidas por bacterias probióticas mixtas asociadas al huésped en

el intestino del camarón tigre *Penaeus monodon*. *Revista Saudita de Ciencias Biológicas* , 27 (9), 2479-2484.

Wanna, W., Surachat, K., Kaitimonchai, P., & Phongdara, A. (2021). Evaluation of probiotic characteristics and whole genome analysis of *Pediococcus pentosaceus* MR001 for use as probiotic bacteria in shrimp aquaculture. *Scientific reports*, 11(1), 1-17.

Wilson, K. H., Blichington, R. B., & Greene, R. C. (1990). Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 28(9), 1942-1946.

Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W. J., Lee, S., & Bai, S. C. (2020). Evaluation of potential probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on growth performance, immune response, gut histology and immune-related genes in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 8(2), 281.