

## Adaptación del ensayo de reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT) para medir la viabilidad celular en bacterias del genero *Vibrio*

### PROBLEMA

El cultivo de camarón es una de las actividades acuícolas con mayor valor comercial a nivel global, y para Ecuador representa el primer rubro no petrolero. Sin embargo, esta industria enfrenta graves desafíos debido a enfermedades bacterianas, principalmente causadas por bacterias del género *Vibrio*, que provocan altas tasas de mortalidad y pérdidas económicas globales estimadas en 3 mil millones de dólares anuales. Los métodos *in vitro* tradicionales para evaluar productos con actividad antibacteriana contra los vibrios, son costosos, lentos y poco eficientes. Además, no se han adaptado suficientemente para evaluar productos que puedan ser usado bajo la estrategia anti-virulencia para controlar patógenos bacterianos de camarón.

### OBJETIVO GENERAL

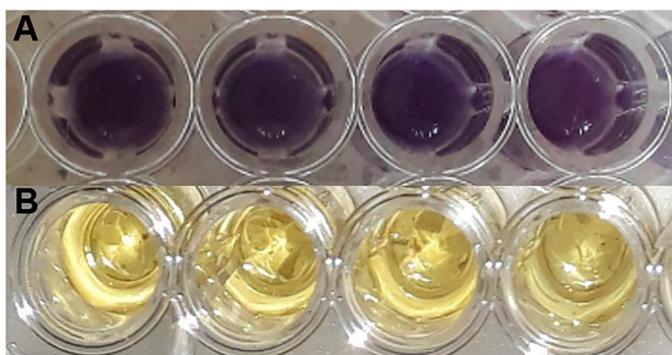
Estandarizar un método *in vitro*, basado en la reducción del compuesto MTT, para medir la viabilidad celular y evaluar el efecto anti-*Vibrio* de bioproductos.

### PROPUESTA

Desarrollar un método alternativo, rápido, económico y fiable para identificar agentes terapéuticos eficaces y sostenibles. La adaptación del método de MTT para estimar la viabilidad de vibrios patógenos de camarón basado en la reducción de MTT a cristales de formazán por las células viables, permitirá contar con una herramienta robusta para evaluar de forma efectiva, productos con potencial microbicida o anti-virulencia, determinando su dosis letal (LD<sub>50</sub>) y su impacto sobre la virulencia bacteriana. En el presente estudio se evaluó la capacidad de reducción del MTT en cuatro cepas de *Vibrio harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, patógenos de camarón. Posteriormente, el método se validó utilizando aceite esencial de *Origanum vulgare* (EOOv) a diferentes concentraciones para obtener un efecto dosis-respuesta y se estableció LD<sub>50</sub> para cada cepa de *Vibrio*.

### RESULTADOS

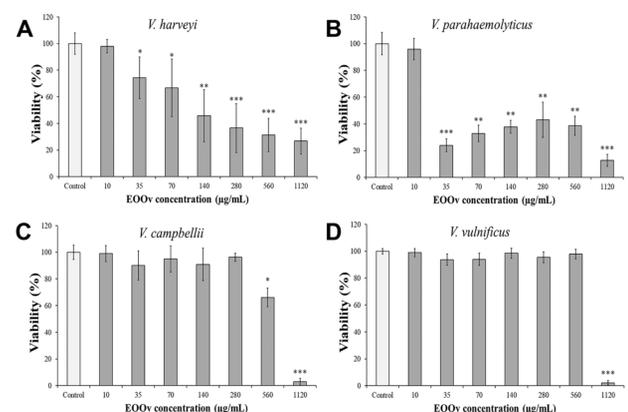
Los *Vibrio* redujeron eficientemente el MTT a formazán, evidenciado por el cambio a color púrpura en los pocillos con bacterias, mientras que no hubo cambio en los controles sin bacterias (Fig. 1). *V. campbellii* presentó la mayor capacidad reductora, seguido por *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. harveyi*. La técnica de reducción de MTT permitió evaluar el efecto del EOOv sobre la viabilidad de los *Vibrio*, no se observó efecto a 10 µg/mL, pero a partir de 35 µg/mL se afectaron los cuatro *Vibrio* reflejando una clara relación dosis-respuesta (Fig. 2). La LD<sub>50</sub> del EOOv varió entre las cepas de *Vibrio*, siendo *V. harveyi* la más sensible LD<sub>50</sub> = 150,9 µg/mL (Fig. 3). Las curvas de mortalidad confirmaron esta tendencia, indicando que se requieren dosis más altas de EOOv para afectar a *V. campbellii* y *V. vulnificus*.



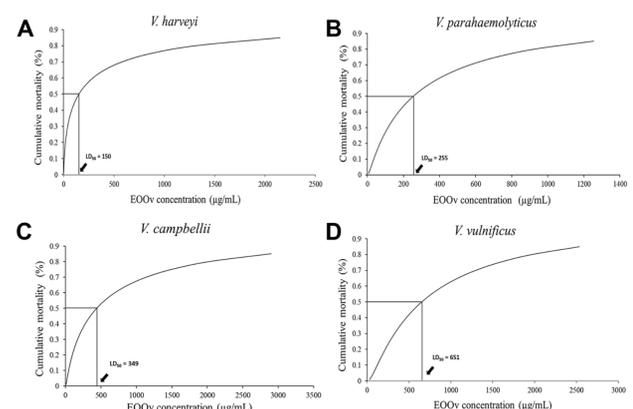
**Fig. 1.** Reducción del compuesto MTT a cristales de formazán por vibrios patógenos de camarón. A) Pocillos con *Vibrio* tratados con MTT. B) Pocillos con *Vibrio* sin MTT.

### CONCLUSIONES

- La prueba de reducción de MTT fue adaptada con éxito para medir la viabilidad de *Vibrio* patógenos en el cultivo de camarón, demostrando ser una alternativa precisa y rápida para evaluar productos antimicrobianos con potencial uso terapéutico en acuicultura.



**Fig. 2.** Validación del método de reducción de MTT en vibrios usando productos activos contra *Vibrio*.



**Fig. 2.** Determinación de la dosis letal que mata 50% del aceite esencial de orégano contra los *Vibrio*.

### RECONOCIMIENTOS

- Este trabajo fue apoyado por el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y fondos derivados de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Extendemos nuestro agradecimiento a todas las personas del CENAIM que colaboraron en esta investigación.