



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS.



**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LA HARINA DE LOMBRIZ
DE TIERRA *EISENIA FOETIDA*, SOBRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y
GRAM NEGATIVAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LIC. EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA

REGINA ORTEGA FLORES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA A 24 DE JUNIO DE 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



TESIS

EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LA HARINA DE LOMBRIZ DE TIERRA *EISENIA FOETIDA*, SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Y GRAM POSITIVAS.

Presentada por:

Regina Ortega Flores

Aprobada por el comité:

Dr. Samuel Sanchez Serrano
Director de tesis

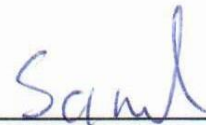
Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal

Dr. José Ángel Olivas Valdez
Sinodal

Resumen de tesis que presenta **Regina Ortega Flores** como requisito parcial para la obtención del título de Lic. En Biotecnología en acuicultura.

Evaluación del efecto inhibitorio de la harina de lombriz de tierra *Eisenia foetida*, sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Resumen aprobado por:



Dr. Samuel Sánchez Serrano
Director de tesis

En el presente trabajo, se evaluó y analizó el efecto antibacteriano de la harina de lombriz de tierra *Eisenia foetida*, y observar si resulta un antimicrobiano de amplio espectro, ya que las enfermedades bacterianas son un limitante en la industria acuícola, debido a la resistencia bacteriana que provocan los antibióticos por su mal y excesivo uso, por lo que se están investigando nuevas alternativas de uso terapéutico natural y efectivo contra bacterias de potencial patogénico. Se ha demostrado que la lombriz roja de tierra, *Eisenia foetida* tiene compuestos bio-activos, los cuales funcionan como antioxidante, antibacteriano, antiulcerosas, antiinflamatorio y antifúngico. Para la presente investigación se probaron 2 métodos diferentes para la elaboración de harina de lombriz: secado de harina por el método de liofilización y secado de harina por el método convencional (estufa). Se realizaron antibiogramas con los 2 diferentes métodos, y se seleccionó el método de elaboración de la harina que resultó con mayor inhibición bacteriana, con la que se diseñó una dieta a base de harina de lombriz para comprobar si la efectividad antibacteriana continuaba posterior a su incorporación a la dieta formulada. Se realizaron antibiogramas contra bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*) y Gram negativas (*Vibrio harveyi*), y de acuerdo a lo observado, la harina de lombriz liofilizada (HLL) resulta un antimicrobiano de origen natural de amplio espectro, debido a que no hay una diferencia de inhibición bacteriana significativa entre los 2 tipos de bacterias, actuando con la misma efectividad antimicrobiana.

Palabras claves: *Eisenia foetida*, harina de lombriz, resistencia bacteriana, péptidos antimicrobianos, bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme ser parte de esta gran casa de estudios.

A la Facultad de Ciencias Marinas por abrirme las puertas para iniciar y culminar mi camino para ser profesionista.

A todos mis profesores de la facultad que sin duda me enseñaron demasiado.

A mi director de tesis el Dr. Samuel Sánchez Serrano, y sinodales la Dra. Lus M. López Acuña y el Dr. José Ángel Olivas Valdés por sus enseñanzas, paciencia, y sobre todo el apoyo que me brindaron para poder realizar este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Nutrición Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas, por su ayuda, enseñanzas, buenos comentarios y sugerencias.

Al Dr. Fernando Barreto por su apoyo y ayuda al resolver mis dudas en los análisis estadísticos.

A mis amigos y compañeros de aventura Lizeth y Jesslib, por el apoyo, la motivación y la ayuda que siempre me dieron. Se convirtieron en una parte importante en mi vida en los últimos años de mi formación profesional.

D e d i c a t o r i a

Este trabajo no es más que la culminación de una etapa más de mi vida académica.

Quiero dedicar mis estudios de licenciatura a:

A mis padres Lilia y Wilfredo porque siempre me han sabido guiar por el camino correcto y me enseñaron a no darme por vencida. Por la motivación, el cariño y el apoyo incondicional que siempre he recibido. Por ser un ejemplo a seguir, los amo.

A mi novio, amigo, compañero y confidente Marko Antonio, por siempre apoyarme en todas las decisiones que tomo, por la motivación que siempre me ha brindado para cumplir cada una de las metas que me propongo en la vida, y por no dejarme sola en los momentos más difíciles, te amo demasiado bicho gracias por todo amor.

CONTENIDO

4.1	I Portada	1
4.2	II Resumen	4
4.3	III Agradecimientos	5
4.4	IV Dedicatoria	6
4.5	V Índice de contenido	7
4.6	VI Índice de figuras	10
4.7	VII Índice de tablas	12
1.	Introducción	14
1.1	Antecedentes	16
1.1.1	Problemática en la nutrición acuícola	16
1.1.2	Soluciones a la problemática	16
1.1.3	Eisenia foetida	17
1.1.3.1	Características de la especie	17
1.1.4	Usos de Eisenia foetida	19
1.1.5	<i>Eisenia foetida</i> en la acuicultura	20
1.1.6	<i>Eisenia foetida</i> en el control de agentes infecciosos.....	21
1.1.7	Enfermedades bacterianas	22
1.1.8	Antibióticos	25
1.1.9	Resistencia bacteriana en la acuicultura	27
1.1.10	Péptidos antimicrobianos.....	28
1.2	Justificación	30
2.	Hipótesis	31
3.	Objetivos	31
3.1	Objetivo general	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4.	Metodología	32

4.1 Evaluación y selección de la harina de lombriz con mayor efecto antibacteriano (Liofilizador vs estufa)	32
4.1.1 Obtención de lombrices	32
4.1.2 Preparación de harina de lombriz secada por medio de liofilización	33
4.1.3 Preparación de ácido tricloroacético	33
4.1.4 Extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz secada por medio de liofilización	34
4.1.5 Preparación de placas con medio Muller – Hinton	34
4.1.6 Antibiogramas	35
4.1.7 Preparación de harina de lombriz secada por medio de estufa.....	35
4.1.8 Extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz secada por medio de estufa.	36
4.1.9 Antibiogramas	36
4.2 Preparación de dieta con harina de mayor efecto antimicrobiano: harina de lombriz secada por medio de liofilización	37
4.2.1 Obtención de lombrices	37
4.2.2 Formulación de dieta con harina de lombriz secada por medio de liofilización	37
4.2.3 Extracción e compuestos bioactivos en harinas	49
4.2.4 Antibiogramas	40
4.3 Evaluación del efecto antibacteriano de la dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización contra bacterias Gram negativas y Gram positivas	40
4.3.1 Preparación de placas con medio TSA	40
4.3.2 Identificación bacteriana	41
4.3.3 Antibiogramas con bacterias Gram positiva y Gram negativa.	41
4.4 Análisis estadístico.	41
5. Resultados	43

5.1 Efecto antibacteriano de la harina de lombriz secada por medio de liofilización (HLL) y harina de lombriz secada por medio en estufa (HLE)	43
5.2 Comparación del efecto antibacteriano de dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización y dieta a base de harina de pescado45
5.3 Comparación del efecto antibacteriano de la dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) contra bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas46
6. Discusiones49
7. Conclusión57
8. Recomendaciones58
9. Referencias59
10. ANEXOS66

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO,2020)14
2. Anatomía de la lombriz roja californiana adulta *Eisenia Foetida*. Fuente: Somarriba y Guzmán, (2004).....18
3. Fotografía tomada al microscopio estereoscópico bifocal, de lombriz roja californiana adulta *Eisenia Foetida*. A. clitelo de lombriz completamente desarrollado19
4. Reproducción de bacterias por fisión binaria. A. Bacteria; B. duplicación de cromosomas; C. Bipartición; D. 2 células hijas24
5. Fotografías tomadas a: A. Lombricomposta ubicada en la FCM, B y C. *Eisenia foetida* adulta con un tamaño aproximado a 10 cm, D. Lombrices colocadas en matraz Fernbach de 2 L., con papel secante para la limpieza de su tracto digestivo32
6. Fotografías tomadas a: A. Liofilizador ubicado en el Laboratorio de Nutrición Acuícola en la FCM; B. Peso de lombriz en peso seco; C. Lombriz secada por medio de liofilización.....33
7. Fotografía tomada a tubos eppendorf con contenido de harina de lombriz secada por medio de liofilización34
8. Fotografía tomada a: A. estufa ubicada en el Laboratorio de Nutrición Acuícola en la FCM; B. Peso de lombriz (peso seco); C. Lombriz de tierra secada por medio de estufa36
9. Fotografía de pellets a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización38
10. Fotografía tomada a: Contenido de navecilla izquierda, alimento a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización., Contenido de navecilla derecha, alimento a base de harina de pescado39
11. Fotografía tomada a: Centrifugado para la extracción de compuestos bioactivos., Contenido de tubos eppendorf de izquierda: dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización, Contenido de tubos eppendorf de derecha: dieta a base de harina de pescado40

12. Fotografías tomadas a: A. Aislamiento y purificación de bacteria Gram positiva <i>Bacillus cereus</i> , B. Identificación bacteriana por tinción Gram de <i>Bacillus</i> , C. identificación bacteriana por bioquímica (Microplaca Gen III)	41
13. Fotografías de: A. Antibiograma con harina antibacteriana de lombriz secada por medio de estufa, con un halo de inhibición contra <i>Vibrio harveyi</i> de 1.9 cm; B. Antibiograma con harina antibacteriana de lombriz secada por medio de liofilización, con un halo de inhibición contra <i>Vibrio harveyi</i> de 3.0 cm	43
14. Fotografía tomada a antibiograma con harina de lombriz secada por medio de liofilización con efecto antibacteriano, 48 hrs posterior a la siembra, con un halo de inhibición contra <i>Vibrio harveyi</i> de 3.3 cm	44
15. Fotografía tomada a antibiograma con dieta a base de harina de pescado (P), y dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (L) contra bacteria <i>Vibrio harveyi</i> , con un halo de inhibición de 2.9 cm	45
16. Fotografía tomada a antibiograma con sensidiscos con 10 µl de acetona cada uno, contra bacteria <i>Vibrio harveyi</i> , sin inhibición antibacteriana	46
17. Fotografía tomada a antibiogramas; Izquierda, dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) contra bacteria <i>Vibrio harveyi</i> Gram negativo, con efecto antibacteriano y un halo de inhibición de 4.1 cm. Derecha, dieta a base de harina de pescado (DP) contra bacteria <i>Vibrio harveyi</i> Gram negativo, sin efecto antibacteriano.....	47
18. Fotografía tomada a antibiogramas; Izquierda, dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) contra bacteria <i>Bacillus cereus</i> Gram positiva, con efecto antibacteriano y un halo de inhibición de 3.9 cm. Derecha, dieta a base de harina de pescado (DP) contra bacteria <i>Bacillus cereus</i> Gram positiva, sin efecto antibacteriano.	48
19. Fotografía tomada a 2 diferentes métodos de deshidratación de harinas; Izquierda, Lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> secada por el medio de liofilización, con aspecto similar al conglomerado de lombriz congelado inicialmente. Derecha, Lombriz de tierra secada por medio de estufa, con menor cantidad de masa obtenida	50
20. Antibiograma con dieta a base de harina de pescado sin inhibición antibacteriana	66

ÍNDICE DE TABLAS

1. Composición nutricional de dieta a base de harina de lombriz secada por liofilización y dieta a base de harina de pescado38
2. Resultados de antibiogramas de la harina de lombriz secada por medio de liofilización (HLL) y harina de lombriz secada por medio de estufa (HLE), presentando actividad antibacteriana contra la bacteria *Vibrio harveyi* en 48 hrs.44
3. Resultados de los halos de inhibición bacteriana contra bacteria Gram negativa *Vibrio harveyi* y bacteria Gram positiva *Bacillus cereus*, con dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) como indicador antibacteriano y antibiogramas con dieta a base de harina de pescado (DP) como control negativo contra los 2 tipos de bacterias47
4. Prueba T-Student por grupos independientes, donde se observa una diferencia significativa en el efecto antibacteriano que causa la harina de lombriz por diferentes métodos de secado (liofilización y estufa).....66
5. Prueba T-Student por grupos independientes, donde no se observa una diferencia significativa en el efecto antibacteriano que causa la dieta a base de harina de lombriz liofilizada contra bacterias Gram negativas y Gram positivas66

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad en la que se emplea un conjunto de técnicas, conocimiento y se desarrollan habilidades en el cultivo de especies acuáticas (crustáceos, peces, moluscos y algas o plantas acuáticas), que va desde el proceso de reproducción, siembra, alimentación y cosecha, para la producción de alimentos. Además, también influye la mano del hombre en el control de parámetros físico-químico para una mejor calidad de agua, con el fin de tener un buen desarrollo de los organismos y además de evitar la proliferación de agentes patógenos en el sistema (Rueda, 2011).

La acuicultura a nivel mundial, es una de las actividades que ha ido creciendo constantemente en los últimos años, más que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal (FAO, 2017). La acuicultura en general, se ha consolidado como una de las actividades de gran potencial con fuentes de proteína animal de excelente calidad (FAO, 2020).

En el 2018, se estimó que la producción de organismos cultivados directamente de acuicultura fue de 82.1 millones de toneladas (Figura 1), de los cuales 51.3 millones de toneladas fue acuicultura en agua dulce y 30.8 millones de toneladas fue realizada en aguas marinas, por lo que se llegó a un valor total de 250 000 millones de USD (FAO, 2020).

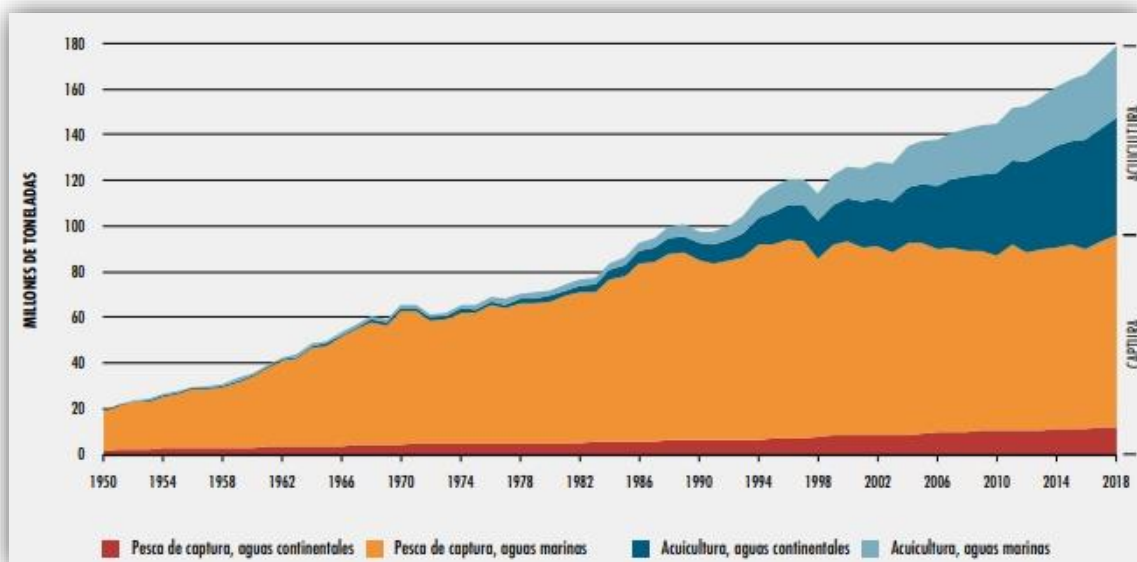


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura
Fuente: FAO,2020.

A pesar de estas expectativas, siempre hay un limitante para la expansión y desarrollo de los sectores, en el caso de la industria acuícola, las enfermedades infecciosas representan un serio problema mundial para la producción de organismos, en especial el ocasionado por las infecciones bacterianas, debido a la resistencia bacteriana. El uso de los antibióticos en la industria acuícola se ha llegado a utilizar como un método profiláctico, de tal manera que se cree fundamental el uso de este medicamento en todo momento. Sin embargo, se pueden implementar verdaderas medidas de profilaxis para controlar la proliferación de microorganismos patógenos. La resistencia bacteriana se puede deber principalmente al mal y excesivo uso de este medicamento, mal cumplimiento del tratamiento, venta de antibióticos sin recetas, mala calidad de los mismos, y al no usarse de forma terapéutica, causando severas consecuencias, como muertes masivas en el sistema de cultivo (FAO, 2002).

La resistencia bacteriana es un problema mundial, debido a que con facilidad puede propagarse a otras zonas geográficas, principalmente mediante el agua por su fácil desplazamiento. En acuicultura, cuando se tiene organismos medicados con antibióticos, y el agua es desechada sin ser tratada, es muy probable que zonas cercanas sean contaminadas por estos antibióticos ya que el alimento no consumido de los peces en cultivo y heces, aun contienen moléculas activas de los antibióticos (Arenas y Moreno, 2017). Otra forma de contaminación por antibióticos, puede darse por medio de desplazamiento de fauna con genes resistentes, ya que se ha demostrado molecularmente que los genes resistentes son capaces de transmitirse de bacterias acuáticas a bacterias que ocasionan infecciones en humanos tales como *Vibrio*, por lo que se deben aplicar medidas preventivas en el cultivo de organismos, para proteger la salud pública (Arenas y Moreno, 2017).

Para monitorear la contaminación de antibióticos en mares, se realizó un estudio en peces silvestres que habitaban o se mantenían cerca de maricultivos, por lo que, al analizar a los peces silvestres, (y que por obvias razones nunca fueron medicados directamente), se encontraron con algunos antibióticos como tetraciclinas, fenicoles, y quinolonas, observando que los antibióticos pueden contaminar hasta 8 kilómetros a la redonda a partir del sitio del cultivo (Cabello, 2004), Por esta razón se recomienda aislar a los peces enfermos al dar un tratamiento terapéutico, además de someterlos a un periodo de cuarenta para evitar el riesgo de contaminar a las poblaciones silvestres y por ende consumir organismos libres de antibióticos (FAO,2017).

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Problemática en la Nutrición acuícola

Desde hace varios años, la acuicultura ha traído consigo un gran reto en cuanto a la nutrición de peces, ya que, por lo general, en acuicultura se cultivan especies carnívoras que requieren altos niveles de proteína en la dieta, por lo que la harina y aceite de pescado es la mejor materia prima para cubrir estos requerimientos. La alimentación de organismos en acuicultura y en su mayoría depende de la pesca de especies como anchoveta, sardina y macarela, ya que aportan una excelente fuente de proteína en la dieta, además de aminoácidos esenciales, ácidos grasos, vitaminas y minerales, permitiéndoles desarrollarse saludablemente (Arcos, 2015).

Debido a que la proteína es el componente principal de los alimentos balanceados, y cada vez es más difícil la captura de estos organismos, poniendo en riesgo a la población de estas especies silvestres por la creciente demanda que se requiere de estos insumos, aumentando el precio de la materia prima considerablemente, resultando pérdidas económicas para los productores del sector acuícola (Arcos, 2015), ya que se estima que más del 70% de los gastos totales de la producción se deriva del alimento (Piñeros *et al.*, 2014).

1.1.2 Soluciones a la problemática

Las nuevas investigaciones van enfocadas en buscar fuentes proteicas alternas que cumplan con los requerimientos nutricionales del organismo, evitando enfermedades por deficiencia de nutrientes. (Arcos, 2015).

Para lograr el reemplazo en su totalidad o parcial de harina de pescado, los nutricionistas están trabajando en alternativas como el uso de harinas vegetales: como el uso de algunos granos, que entre ellos destaca la harina de soja, y que cabe mencionar que tienen algunos inconvenientes en cuanto a su digestibilidad y factores antinutricionales en el organismo. Otras alternativas que se están implementando son el uso de harinas animales con subproductos, como el avícola, sangre, huesos, carne, etc. (Robaina, 1998). Por su parte, las harinas a base de insectos también se están utilizando como las harinas de grillos, tenebrios, mosca soldado negra (De Haro, 2015), y recientemente harinas a base de gusanos anélidos como la lombriz de tierra, con fuentes proteicas de alta calidad similares a la harina de pescado (Alvarenga *et al.*, 2017).

La harina de lombriz se ha manejado como un recurso importante debido a su alto valor proteico y fácil producción, además contiene un alto contenido de aminoácidos

esenciales, los cuales en la mayoría de las harinas vegetales son deficientes como lisina, treonina, arginina y valina. De hecho, también se ha descrito que contiene ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico, y ácido linolénico, además se han encontrado macro y micronutrientes como cobre, hierro, manganeso, zinc y fósforo en cantidades significativas (Botello *et al.*, 2019), que son nutrientes esenciales en la nutrición acuícola.

1.1.3 *Eisenia foetida*

1.1.3.1 Características de la especie

La lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Figura 3) es un oligoqueto del filo anélida y es comúnmente conocida como lombriz roja californiana, la cual pertenece a la familia *Lumbricidae*. Este organismo terrestre cumple con funciones ecológicas importantes como la reconstrucción de suelos gracias a la degradación de la materia orgánica, haciéndola más asimilable para plantas y suelo (Andleeb *et al.*, 2016).

La lombriz roja *E. Foetida* es la única especie de lombrices que puede llegar a vivir por 16 años, alcanzando dimensiones de 8 – 12 cm de largo y un peso de 0.8 – 1.4 g (Somarriba y Guzmán, 2004). Morfológicamente tiene un cuerpo alargado, ligeramente aplanado y segmentado. Además, la lombriz tiene la capacidad de regenerar segmentos de su cuerpo solo si se pierde la última parte del intestino, de lo contrario la lombriz muere si se pierde la parte anterior (Loza *et al.*, 2011).

El sistema digestivo de la lombriz (Figura 2) empieza por la boca: a través de la saliva ocurre un proceso de digestión química, humedeciendo el alimento consumido con el objetivo de ablandarlo con la ayuda de enzimas, para posteriormente pasar a la faringe, el cual cumple con la función de aspirar este alimento y ser llevado hacia el esófago, donde se encuentran glándulas calcíferas que ayudan a neutralizar la acidez de los alimentos. Una vez cumpliendo esta función, el alimento es conducido al buche y por medio de contracciones musculares, el alimento viaja a la molleja e intestino, lugar donde ocurre la mayor absorción de nutrientes. Se sabe que la lombriz de tierra consume diariamente la misma cantidad de alimento que su peso, utilizando solo el 40% de lo consumido para procesos metabólicos, mientras el otro 60% sale como excremento por el ano, este excremento es mejor conocido como humus de lombriz, el cual es rico en nutrientes (Somarriba y Guzmán, 2004).

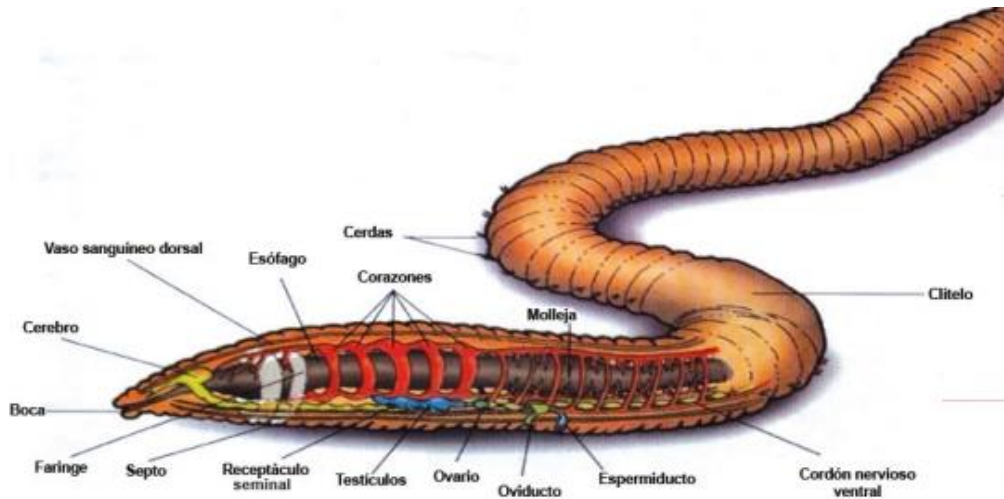


Figura 2. Anatomía de la lombriz roja californiana adulta *Eisenia Foetida* **Fuente:** Somarriba y Guzmán, (2004).

El sistema circulatorio de la lombriz, se compone principalmente de 5 vasos sanguíneos (corazones), los cuales se conectan a vasos sanguíneos ventrales, segmentarios y dorsales ubicados a lo largo del cuerpo de la lombriz para mantener una mejor circulación de la sangre (Somarriba y Guzmán, 2004). En cuanto a su sistema respiratorio, es primitivo por lo que el intercambio de gases ocurre a través de la piel (Somarriba y Guzmán, 2004).

Su sistema nervioso funciona a través de ganglios y nervios que se encuentran en todo el cuerpo, con el fin de poder realizar movimientos y siempre estar alerta de depredadores, además cabe resaltar que la lombriz de tierra carece de ojos, ubicándose en la boca un lóbulo llamado prostomio, el cual a través de fotorreceptores perciben la luz y crean imágenes en el ganglio cerebral (Somarriba y Guzmán, 2004).

Las lombrices son organismos monoicos incompletos, ya que poseen ambos órganos reproductores (masculino y femenino), sin embargo, no pueden autofecundarse por lo que es necesario el intercambio de gametos. La madurez sexual la alcanzan a los 2 meses si están en condiciones adecuadas y con una buena fuente de alimentación (Somarriba y Guzmán, 2004). Cuando una lombriz es adulta, posee una hinchazón sobre los segmentos 24 – 30 llamada clitelo (Figura 3: A), por lo que significa que está lista para el apareamiento (Andleeb *et al.*, 2016).



Figura 3. Fotografía tomada al microscopio estereoscópico bifocal, de lombriz roja californiana adulta *Eisenia foetida*. **A.** clitelo de lombriz completamente desarrollado.

De acuerdo a Loza *et al.* (2011), *E. foetida* puede vivir a temperaturas de hasta 30°C, siendo un óptimo de 20°C para desarrollarse y reproducirse rápidamente.

Al estar listas para el apareamiento, las lombrices juntan su clitelo inversamente para juntar el espermiducto y oviducto, ubicados en los segmentos 9 -10 para realizar el intercambio de gametos, una vez terminado el proceso se separan, y sobre el clitelo de cada una de las lombrices se forma un huevo de células mucosas, y a través de las vesículas seminales ubicadas en los segmentos 9 – 11, pasan los espermias para fertilizar el huevo formado, el cual contiene aproximadamente de 4 a 20 lombrices. El huevo se desprende del clitelo una vez fecundado, el cual tiene un alto contenido de albúmina, principal fuente de alimentación para las lombrices hasta el término de su incubación, con una duración aproximada de 14 – 20 días. Al desprenderse el huevo, las lombrices pueden seguir reproduciéndose una vez por semana, llegando a tener de 1300 a 1500 lombrices por año (Andleeb *et al.*, 2016)

1.1.4 Usos de *Eisenia foetida*

Debido a la creciente presión por encontrar nuevos sustitutos proteicos de alto valor e inocuos, se han realizado experimentos con *E. foetida*, ya que es un macrófago que tiene

un alto contenido proteico, cumpliendo los requisitos necesarios para ser una fuente de proteína alterna para las dietas de animales (Durán y Henríquez, 2009).

Algunos estudios presentan resultados favorables al sustituir las harinas típicas en la industria acuícola por la harina de lombriz. Para que la carne de lombriz tenga altos niveles proteicos, depende mucho de las condiciones en las que se maneja el lombricultivo, por ejemplo: la especie de lombriz con la que se trabaje, el porcentaje de alimento diario, el mantenimiento dado a la composta, o el procesado que se le da a la materia prima para obtener harina de lombriz pura (Durán y Henríquez, 2009).

Actualmente la lombricultura es utilizada principalmente en la industria avícola como fuente proteica, en el cual se pudo comprobar que se puede tener una inclusión de hasta un 30% en las dietas para pollos de gorda sin presentar algún problema para los animales, ya que mejora el crecimiento de los animales y mejora la calidad de la carne (Bahadori *et al.*, 2017).

Tsai *et al.* (2011) realizaron pruebas con dietas de 80.65 y 35% de harina de lombriz para alimentar a ratones y observar el efecto del uso de harina de lombriz sobre la presencia de lesiones intestinales como inflamaciones, tumores o alergia. En los resultados obtenidos, se encontró que con una inclusión del 65% de harina de lombriz, los ratones no presentaban modificación en su tejido intestinal, por lo que fue tolerado este porcentaje de harina, con 100% de sobrevivencia durante el periodo experimental.

En un extenso análisis se comprobó que *E. foetida* contiene lípidos variables, altos en ácidos grasos poliinsaturados (linolénicos; ácidos grasos n-3), los cuales se requieren para una formulación completa de una dieta para peces cultivados (Beg *et al.*, 2016).

1.1.5 *Eisenia foetida* en la acuicultura.

A la fecha se han realizado estudios para emplear la harina de lombriz en dietas para peces cultivados (piscicultura), por su alto contenido de proteína cruda que va del 64 a 82 %, de 7 a 10% de lípidos, de 8 a 20% de carbohidratos, y de 2 a 3% de minerales (Durán y Henríquez, 2009), mismos porcentajes que varían en el proceso de secado de la harina de lombriz.

El uso de la harina de *E. foetida* ha sido considerada como una alternativa para la producción de alimento en la acuicultura. Nandeesha *et al.* (2003), realizaron una

investigación para el cultivo de carpa común *Cyprinus carpio*, en el cual se elaboraron 3 tipos de dietas formuladas, con harina de pescado y harina de lombriz *Eudrilus eugeniae* para la alimentación de los organismos por aproximadamente 3 meses. Se elaboró una dieta control con 100 % harina de pescado, la siguiente dieta se elaboró con 100% harina de lombriz y la última dieta se formuló con 80% harina de lombriz, 20% harina de pescado y se agregó 5% de aceite de sardina. En los resultados se comparó el crecimiento de los organismos (carpa común), con las diferentes dietas, y se observó que el mejor crecimiento lo obtuvo la dieta que se formuló con el 80% de harina de lombriz. Por lo que se concluyó que el reemplazo parcial de la harina de pescado con otras fuentes proteicas de origen animal, y la adición de ac. grasos esenciales, resulta un mayor crecimiento en los organismos en comparación a la dieta a base de harina de pescado.

Por otro lado, Lezcano y Borjas (2017), realizaron un estudio para optimizar la elaboración de harina de lombriz *E. foetida* como fuente proteica en alimento para alevines de tilapia *Oreochromis sp.* Se comparó la eficiencia proteica de la harina de lombriz en 2 hornos, secado con horno al vacío y secado con horno eléctrico de convección, observando que la harina de lombriz elaborada con secado al vacío presento una composición nutricional de 57% de proteína, 11.9% de humedad y un diámetro de partícula de 0.43 mm siendo adecuado para alimentar a los alevines de tilapia.

Una de las de las razones por las cuales *E. foetida* es apta para ser utilizada en la dieta de los organismos, es que no es un vector para la transferencia de agentes infecciosos (Durán y Henríquez, 2009).

1.1.6 *Eisenia foetida* en el control de agentes infecciosos.

En algunos estudios se indica que *E. foetida* contiene compuestos bio-activos, los cuales funcionan como antioxidante, antimicrobiano, anticancerígeno, antiulcerosas y antiinflamatorio, y que desde hace varios años se utilizan tradicionalmente en Vietnam, China, India y Corea como fuente terapéutica de medicamentos naturales (Nitish *et al.*, 2018).

Wang *et al.* (2011) mencionan que *Eisenia foetida*, a través de la evolución, ha desarrollado mecanismos de defensa contra bacterias, virus y hongos patógenos, debido a su alimentación y el ambiente en el que se encuentran. Con este estudio demostraron que su sistema de defensa se compone de una barrera externa y un sistema de inmunidad

interno, determinando que la barrera externa de la lombriz está compuesta por un mucus que elimina cualquier agente extraño, mientras que el sistema de inmunidad interno se compone de células similares a los leucocitos llamados celomocitos, (Marcano *et al.*, 2018) estos se componen de 2 principales grupos que realizan diferente función: los eleocitos que participan en la respuesta inmune humoral reconociendo a antígenos, y los amebocitos los cuales fagocitan al agente extraño y ayudan a la cicatrización, en conjunto estos ayudan a combatir las infecciones bacterianas de la lombriz, además, también tienen la función de osmoregulación, transporte de nutrientes, excreción de desechos metabólicos y desintoxicación de cualquier contaminante, Wang *et al.* (2011) además enzimas lisosómicas, proteínas y péptidos antimicrobianos como Lumbricin I y LTCl, componen esta barrera interna de defensa contra agentes patógenos, del sistema inmunológico de la lombriz Wang *et al.* (2011).

Nitish *et al.* (2018), realizaron un estudio donde se analizó la actividad antibacteriana del extracto de lombriz de tierra *E. foetida*, de manera in vitro, por lo que se hicieron antibiogramas contra bacterias patógenas aisladas de la carpa común *Cyprinus carpio*, en el que mostró actividad antibacteriana contra todas las bacterias patógenas aisladas (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogens* y *Shigella spp.*) observándose una inhibición máxima contra la bacteria *Aeromonas hydrophila*, y de acuerdo a Grajales *et al.* (2018), *Aeromonas hydrophila* es una de las bacterias más comunes en acuacultura, capaz de producir septicemias en los organismos cultivados, es decir, cuando la infección bacteriana se complica y el sistema inmune se descontrola, por lo que las células inmunológicas atacan a órganos y tejidos propios del organismo causando graves daños en él, además, también se presentan hemorragias visibles en el epitelio del organismo, condición que complica el proceso de coagulación sanguínea, causando mortalidades masivas.

1.1.7 Enfermedades bacterianas.

Las enfermedades se consideran un descontrol del estado normal del cuerpo, que es generado por microorganismos, los cuales se introducen en el tejido del hospedero creando una infección.

En la acuicultura, las bacterias y virus, son el grupo de patógenos de mayor importancia y de los cuales se debe tener un monitoreo constante para evitar el contagio en cadena. Las enfermedades más comunes producidas por bacterias son: aeromonas, vibrio, estreptococos y pseudomonas (Balbuena, 2011).

Las enfermedades son un limitante en la industria acuícola, debido a que, si las enfermedades no son controladas, estas afectan considerablemente el potencial productivo y la rentabilidad comercial de los organismos. La patología es fundamental en el cultivo de organismos acuáticos, ya que las bacterias se generan con mayor rapidez debido a las condiciones del sistema (Vázquez *et al.*, 2011).

Para que pueda haber una infección bacteriana, la bacteria tiene que interactuar con receptores de la piel, como la mucosa en el caso de los peces, una vez que las bacterias logran pasar esta barrera, son detectadas por células del sistema inmune como las células dendríticas, las cuales funcionan como vigilantes del sistema inmunitario buscando posibles antígenos. Al lograr evadir estas células tan importantes, las bacterias pasan a circulación linfática y sanguínea, distribuyéndose por todo el cuerpo, y depende de la bacteria, afectara a un órgano o tejido en específico (Vázquez *et al.*, 2011).

Para que la bacteria tenga éxito de infectar a un hospedero, existen tres factores: La bacteria tiene que tener estabilidad en el medio ambiente para que pueda sobrevivir, tiene que haber disponibilidad de vectores si la bacteria lo requiere, la bacteria tiene que tener mecanismos que le permita sobrevivir a la respuesta inmune del hospedero. El medio ambiente, el cual influye en el proceso infeccioso como la temperatura, PH, humedad, aire, salinidad, etc. El hospedero, influyendo en factores como especie, edad, estado nutricional, estrés, entre otros (FAO, 2011).

Puede haber patógenos formando parte de su flora normal de un organismo sin producirle ningún síntoma de una enfermedad, ya que los patógenos están en la espera de condiciones desfavorables para el hospedero, ocasionando que el sistema inmune se deprima, a estos patógenos se les conoce como oportunistas (FAO, 2011).

Las bacterias son microorganismos procariontes, los cuales poseen una membrana plasmática y ribosomas que contienen todo su material genético. Estos microorganismos tienen una gran diversidad metabólica por lo que les permite habitar varios ambientes, de esta manera clasificándose en 3 diferentes grupos; bacterias aerobias: requieren la presencia de oxígeno para crecer; bacterias anaerobias: no requieren la presencia de

oxígeno para crecer; bacterias facultativas: crecen en presencia del oxígeno, pero pueden desarrollarse sin la presencia de este elemento (Vargas y Kuno, 2014).

Morfológicamente las bacterias se pueden encontrar con una envoltura o desnudos, con flagelos o cilios, además se pueden presentar de 3 diferentes formas: las bacterias en forma esférica llamados cocos, bacterias en forma alargada llamados bacilos, bacterias en forma de espiral llamados espirilos y vibriones de forma curva (Vargas y Kuno, 2014).

Las bacterias tienen una reproducción asexual (Figura 4), es decir por fisión binaria, la cual la bacteria duplica sus cromosomas y realiza la bipartición para generar 2 células hijas (Vargas y Kuno, 2014).

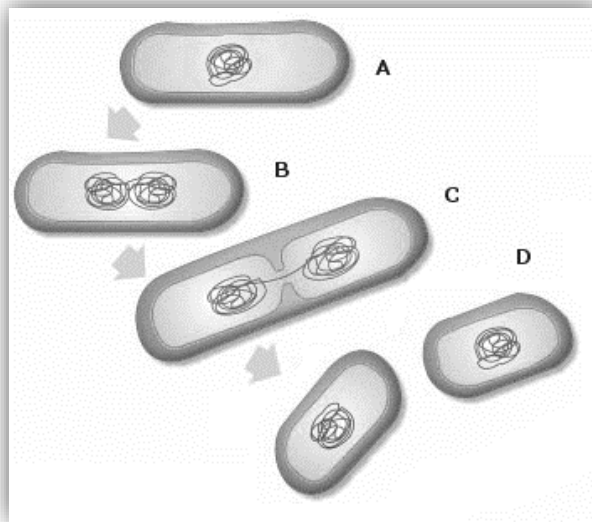


Figura 4. Reproducción de bacterias por fisión binaria **A.** Bacteria; **B.** Duplicación de cromosomas; **C.** Bipartición; **D.** 2 células hijas.

Los bacilos son un grupo de bacterias caracterizados por su forma de barra o alargados como se mencionó anteriormente, los cuales pueden ser Gram negativos o Gram positivos. Debido a que los bacilos Gram positivos pueden formar esporas, estos llegan a vivir por varios años en cualquier ambiente si se tienen las condiciones adecuadas para su proliferación, causando daños patológicos tanto en humanos como en animales (Sánchez *et al.*, 2016).

Los vibrios son bacterias marinas Gram negativas que pertenecen a la familia Vibrionaceae, y pueden constituir alrededor del 60% de la población de bacterias de su

ambiente. Los vibrios son agentes patógenos que pueden ser oportunistas (Leyton y Riquelme, 2008).

Debido a la gran densidad de organismos que se maneja en la acuicultura intensiva y el exceso de nutrientes que se generan en estos sistemas, facilita la proliferación de vibrios. Las enfermedades por vibrio es uno de los problemas más frecuentes en los cultivos de peces, por lo que, en los últimos años estas bacterias han sido estudiadas debido a la gran mortalidad que produce, generando una importante pérdida económica (Leyton y Riquelme, 2008).

Trejo (2019) realizó una extensa investigación en larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi* ante un evento de vibriosis. Los juveniles de 50 días después de la eclosión, presentaban lesiones cutáneas, que a nivel histológico se mostraba necrosis epidérmica, muscular, daño branquial, hemolisis y una colonia de bacterias en la dermis, por lo que se aislaron 8 colonias totales de las lesiones que correspondían a 4 especies de vibrio, destacando la presencia de *Vibrio harveyi*.

Vibrio harveyi se desliza por medio de un flagelo simple, crece en temperaturas optimas de 30 a 35°C, tolera un amplio rango de salinidades y es responsable de enfermedades infecciosas en algunos organismos de importancia acuícola como lenguado, robalo, camarón, pepinos de mar y abulón (Austin y Zhang, 2006), y actualmente también en *Totoaba macdonaldi* (Trejo, 2019).

Para disminuir los efectos negativos sobre la producción acuícola, se han presentado las terapias químicas con antibióticos como la solución más empleada, sin embargo, esta curativa ha traído graves consecuencias como la resistencia bacteriana a dichas terapias químicas, enfermedades infecciosas por bacterias con mayor tiempo de prolongación, muertes masivas y por ende mayores pérdidas económicas en la industria acuícola (FAO, 2002).

1.1.8 Antibióticos

Los antibióticos son biomoléculas activas que poseen la capacidad de matar o inhibir el desarrollo de microorganismos, y actualmente se están empleando en la ganadería industrial, agricultura moderna y acuicultura. En la acuicultura los antibióticos se

suministran de manera directa en el agua, los cuales llegan al medio ambiente causando gran impacto negativo en flora y fauna (Rodríguez, 2014).

En la década de los 40's, los antibióticos trajeron esperanzas a los patólogos de poder erradicar y mantener un control de las enfermedades infecciosas, sin embargo, el mal uso de estos trajo consecuencias como la resistencia bacteriana, es decir, que la bacteria es capaz de sobrevivir y crecer en presencia de uno o más antibióticos, esto debido a que se encuentran interactuando en el ambiente acuático, dificultando el tratamiento de infecciones (Álvarez *et al.*, 2004).

Los antibióticos se han catalogado como contaminantes, una vez que son aplicados en el sistema de cultivo de cualquier organismo. El mal y excesivo uso de antibióticos comerciales en la industria acuícola ha llevado a la aparición de una gran gama de bacterias resistentes, por lo tanto, es complicado poder mantener un control de las enfermedades en el cultivo, representando amenazas importantes para una producción exitosa de peces (Apún, 2007).

La producción de organismos acuícolas requiere de un buen control sanitario, esto con el objetivo de mantenerlos saludables y favorecer su crecimiento, de esta manera poder comercializar alimentos de calidad al consumidor final (Apún, 2007).

La expansión de agentes bacterianos en el cultivo, es la principal causa de muerte de los organismos, recurriendo a los antibióticos como método alternativo, algunas veces no efectivo para el tratamiento de estos agentes (Apún, 2007).

Se ha considerado que la administración de los antibióticos a través del alimento de los organismos no es la mejor forma de medicarlos, debido a que cuando un organismo ya está enfermo presenta falta de apetito, por lo que los antibióticos sintéticos quedan en el medio sin sufrir cambios e impactan el medio ambiente (Rodríguez, 2014).

Para que los antibióticos puedan ser eficaces ante las enfermedades patógenas, estos deben pasar a través de la superficie de la bacteria, posteriormente fijarse en sus estructuras bioquímicas, e impedir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, de esta manera, evitando la proliferación de bacterias (Pérez y Robles, 2013).

1.1.9 Resistencia bacteriana en la acuicultura

La resistencia bacteriana a antibióticos, sin lugar a dudas es un problema, impactando severamente al entorno, además, también se encuentra como un problema social, económico y ético (Parrado *et al.*, 2014).

Cuando se empezaron a utilizar los antibióticos, se tenía la esperanza de que las enfermedades desaparecerían, sin embargo, no se conocía el mecanismo de defensa de las bacterias, 7 años más tarde del comienzo de la aplicación de antibióticos, en 1947 ya se tendría la primera bacteria resistente a la penicilina, *Staphylococcus aureus* (Parrado *et al.*, 2014).

Hasta hoy en día se ha reportado y comprobado la resistencia de bacterias a varios antibióticos sintéticos utilizados comúnmente en la acuicultura como polimyxina B, oxitetraciclina, novobiocina, gentamicina y ciprofloxacina. La bacteria es resistente cuando el crecimiento de las bacterias es superior a las concentraciones del antibiótico (Parrado *et al.*, 2014).

Existen 3 tipos de mecanismos que las bacterias realizan para impedir a los antibióticos ejercer su propósito de evitar la proliferación bacteriana:

- 1) Desactivación por enzimas: Esto se da cuando la bacteria produce enzimas como betalactamasas, capaces de que el antibiótico sea ineficiente, pudiendo actuar contra penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Pérez y Robles, 2013).
- 2) Modificación de bacterias: Estas modificaciones bacterianas se pueden presentar de diferente manera

Resistencia natural: Se da cuando el antibiótico no tiene afinidad química con las proteínas de transporte de la bacteria, de decir, no interactúan entre si y hace a la bacteria resistente (Pérez y Robles, 2013).

Cambio de la proteína blanco o porinas: Esto sucede cuando por mutaciones de la bacteria cambia la forma de la proteína blanco, la cual se encuentra en la pared de la bacteria, por lo que se pierde la afinidad química, es decir, se alteran las entradas de la bacteria para el antibiótico y se vuelve resistente (Pérez y Robles, 2013).

Mutación bacteriana: Las bacterias están en constante mutación debido a que tienen una alta tasa de replicación, permitiendo encontrar diferentes tipos de bacterias que pueden

sobrevivir a diferentes situaciones (Pérez y Robles, 2013). Debido a la rapidez de multiplicación bacteriana, se realizan mutaciones espontaneas o aleatorias en el proceso biológico de replicación del ADN sin que la bacteria lo prevea, algunas mutaciones pueden estar a favor de la bacteria haciéndola resistente a antibióticos generando cada vez más bacterias con la misma mutación, o simplemente no beneficiándole la mutación y morir (Pérez y Robles, 2013).

Lisis Enzimática: Cuando las bacterias generan enzimas y se encargan de digerir el antibiótico, por lo que no se alcanza la concentración inhibitoria mínima, por lo que las bacterias se hacen resistentes. A nivel celular, hay proteínas llamadas porinas, las cuales permiten el paso de los antibióticos, pero debido a reacciones y alertas de citotoxicidad de la bacteria a nivel plasmático, las bacterias pueden cerrar y endocitar estas porinas evitando el paso de los antibióticos y por consiguiente ser destruidas (Pérez y Robles, 2013).

Bombas de flujo: Cuando las bacterias contienen proteínas de transporte en su pared, las cuales tienen la función de sacar moléculas del antibiótico cada vez que estas se introduzcan a la bacteria, evitando alcanzar la concentración mínima (Pérez y Robles, 2013).

- 3) **Alteración por parte de la bacteria:** Estas alteraciones suceden a nivel ADN y son fundamentales para la formación de la pared celular, teniendo la capacidad de ser resistentes a varios antibióticos (Pérez y Robles, 2013).

En los últimos años, la búsqueda de alternativas para el control de las infecciones bacterianas se ha centrado en investigación de diversos compuestos presentes en organismos. Se ha demostrado que el uso de antimicrobianos de origen natural no genera resistencias bacterianas. (Nitish *et al.*, 2018).

1.1.10 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas activas que se han encontrado en varios organismos y que se crean por el sistema inmune innato. Los PAMs son moléculas muy complejas, y tienen la capacidad de realizar diversas funciones, desde interactuar con microorganismos patógenos a través de la membrana, hasta afectarlos directamente en la replicación del ADN y síntesis proteica, además actúan como

inmunoestimuladores, activando los leucocitos del organismo, aumentando de esta manera los linfocitos, algunos fagocitos como los neutrófilos que ayudan al cuerpo a reconocer invasores y atacar contra una infección bacteriana (Téllez y Castaño, 2010).

Debido a las investigaciones que se han realizado a cerca de los PAM's, se considera que tienen un alto potencial en la patología y microbiología, ya que se puede contrarrestar la problemática que hoy en día se presenta con la resistencia bacteriana a los antibióticos, además se reporta que tienen un bajo potencial de resistencia antimicrobiana (Téllez y Castaño, 2010), y podrían ser utilizados como: tratamientos terapéuticos a infecciones, inmunoestimuladores ya que pueden incrementar la inmunidad innata y neutralizantes de endotoxinas ya que son componentes tóxicos como los lipopolisacáridos, que se encuentran en la membrana y la pared celular de la bacteria (Del Ángel *et al.*, 2018).

Dado que todos los organismos son un sistema abierto y están en constante exposición a las amenazas por infección patógena, el sistema inmune de todos lo organismo ha desarrollado mecanismos de defensa, y han ido evolucionando a través de los años debido a la interacción de las especies en el ambiente en el que se desarrollan, los cuales están expuestos a patógenos específicos, por ejemplo, los PAMs de los organismos invertebrados se caracterizan por su rápida síntesis y secreción en la hemolinfa (Del Ángel *et al.*, 2018).

Los PAMs, generalmente contienen 200 aminoácidos y son producidos por diferentes células y se expresan de diferente forma dependiendo del organismo y el tejido que se encuentre infectado, además debido a varias investigaciones se menciona que los péptidos son moléculas con una inhibición bacteriana de amplio espectro (Téllez y Castaño, 2010).

Una de las tareas de los péptidos antimicrobianos es que actúan en contra de microorganismos que intentan ingresar al hospedero por medio de la primera barrera, la piel, estos péptidos tienen la tarea de mantener la piel y mucosas intactas, para evitar la filtración de agentes patógenos (Cedillo *et al.*, 2015).

La clasificación de los PAMs se realiza según su estructura y su composición, por ejemplo: lineales, hélice alfa, por enriquecimiento de aminoácidos, contenido de puentes de disulfuro y fragmentos de otras moléculas proteicas (Cedillo *et al.*, 2015). Su mecanismo de acción también es múltiple y dependen de cada especie, y de justo como lo describen Del Ángel *et al.* (2018), consiste en dañar al patógeno a través de fuerzas electroestáticas,

debido a que los PAMs tienen un gran contenido de arginina y lisina, lo que los hace de carga positiva, haciéndolos catiónicos entre su residuo aminopositivo y la membrana del patógeno con carga negativa.

Al igual que los antibióticos convencionales, la inhibición antibacteriana de los péptidos depende de la composición del patógeno, la concentración disponible del péptido en el medio y la afinidad o interacción de los PAMs con el patógeno, ya que estos contienen pequeños poros por donde el péptido interactúa con la bacteria provocando lisis enzimática (Téllez y Castaño, 2010).

Se ha encontrado que algunos de los organismos que mayor cantidad de PAMs registra, son aquellos que su hábitat los expone a un gran número de microorganismos con potencial patogénico tal es el caso de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Del Ángel *et al.*, 2018).

1.2 Justificación

Debido al interés que surge en utilizar cada vez menos sustancias que pueden ser nocivas a la salud humana y al medio ambiente, existe un mayor interés en buscar controles biológicos, como es el caso de la lombriz *Eisenia foetida*, que de acuerdo a estudios previos han demostrado que presenta actividad antibacteriana que podrían emplearse en el tratamiento de infecciones en peces, lo que lleva a la disponibilidad de peces libres de antibióticos para los consumidores y por ende mayores ganancias a los productores debido a la mayor sobrevivencia de los organismos en cultivo. (Nitish *et al.*, 2018).

La importancia del estudio de la harina de lombriz es que, de acuerdo a los antecedentes descritos, la harina de lombriz roja contiene altos niveles de proteínas que van del 64 a 82%, alta digestibilidad, posee aminoácidos y ácidos grasos esenciales, teniendo un perfil nutricional muy completo y apto para ser un producto que cumple con los estándares de nutrición de alta calidad para la producción de alevines (Lezcano y Borjas, 2017).

El aprovechamiento que se tendría de utilizar la lombriz en alimentación acuícola, es que impulsaríamos una nueva actividad es este sector acuícola como fuente proteica para el desarrollo de alevines de peces. Además, se menciona que *Eisenia foetida* puede ser utilizada de forma cruda (ya que no es un vector de enfermedades) o procesada para ser

mezclada con otros productos y producir concentrados de excelente calidad para la alimentación de animales. Una de las ventajas de utilizar la lombriz de tierra *E. foetida* en la dieta de peces, es que se puede producir a un bajo costo debido a que se alimentan de residuos orgánicos, tiene una alta tasa reproductiva, así como alta tasa de crecimiento. Así mismo, la lombriz de tierra se considera de gran potencial, ya que es un organismo cosmopolita (Loza *et al.*, 2011).

2. HIPÓTESIS

El uso de la harina de lombriz de tierra *Eisenia foetida*, mostrará actividad antibacteriana contra bacterias con potencial patogénico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar y analizar el efecto antibacteriano de la harina de lombriz *Eisenia foetida*.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer el método de elaboración de harina de lombriz *Eisenia foetida*, que permita contener la mayor cantidad del péptido antibacteriano.
- Evaluar el efecto inhibitorio de la harina de lombriz *Eisenia foetida* posterior a su incorporación en una dieta formulada para peces marinos carnívoros como *Totoaba macdonaldi*.
- Evaluar el efecto inhibitorio de la dieta a base de harina de lombriz *Eisenia foetida* contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.

4 METODOLOGÍA

4.1 Evaluación y selección de la harina de lombriz con mayor efecto antibacteriano (liofilizador vs estufa).

4.1.1 Obtención de lombrices

Se tomaron aproximadamente 50 lombrices de tierra *E. foetida* de la lombricomposta ubicada en la FCM de la UABC (Figura 5: A, B). Se seleccionaron lombrices maduras con un tamaño promedio de 8-10 cm (Figura 5:C) obteniendo un peso total húmedo de 38.16 g. Se lavaron con agua dulce para separar el exceso de tierra y humus de la piel exterior de la lombriz. Las lombrices se colocaron en un matraz Fernbach de 2 litros junto con papel secante humedecido con agua destilada, con el objetivo de limpiar el sistema digestivo de la lombriz (Figura 5: D). Se colocó una tapa de papel parafilm y se dejaron en el matraz por 24 hrs.



Figura 5. Fotografías tomadas a: **A.** Lombricomposta ubicada en la FCM, **B** y **C.** *Eisenia foetida* adulta con un tamaño aproximado a 10 cm, **D.** Lombrices colocadas en matraz Fernbach de 2 L., con papel secante para la limpieza de su tracto digestivo.

4.1.2 Preparación de harina de lombriz seca por medio de liofilización.

Después de las 24 hrs, se retiró el papel secante, y las lombrices se colocaron en una caja Petri en una balanza analítica y se pesó 19.08 g de lombriz de tierra (peso húmedo). Posteriormente se colocaron las lombrices en tubos falcón de 50 ml y se dejaron las muestras en un ultra congelador Thermo scientific, a una temperatura de -75°C por 24 hrs. Pasando el tiempo de congelamiento, se colocó la muestra en un liofilizador a una temperatura de -53°C (Figura 6: A), dejando la muestra en el equipo por 24 hrs.



Figura 6. Fotografías tomadas a: **A.** Liofilizador ubicado en el Laboratorio de Nutrición Acuícola en la FCM; **B.** Peso de lombriz en peso seco; **C.** Lombriz seca por medio de liofilización.

Pasando el tiempo de liofilizado se retiró la muestra del equipo, y en una balanza analítica se pesó la muestra obtenida (Figura 6: B): 3.69 g. La lombriz liofilizada (Figura 6: C) se trituró en una licuadora hasta obtener polvo y se colocó en bolsa ziploc hasta su uso

4.1.3 Preparación de ácido tricloroacético

Se pesó en una navicilla 357 g de ácido tricloroacético en una balanza analítica, en un vaso de precipitado de 500 ml se colocó 250 ml de agua destilada, se añadió el ac. tricloroacético y se agito la solución hasta disolver. Se guardó en un frasco de vidrio de 500 ml en el refrigerador hasta su uso.

4.1.4 Extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz secada por medio de liofilización.

La extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz liofilizada se realizó de acuerdo al protocolo de Sánchez (2001).

Se pesó .500 g de harina liofilizada en una balanza analítica y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se agregó 1000 μ l de ácido tricloroacético previamente preparado y se dejó reposar por 15 minutos.

Las muestras se realizaron por triplicado y se colocaron en una centrifuga, colocando la muestra a 14,000 rpm a 4°C por 5 minutos, se extrajo el plasma con ayuda de una micropipeta de 1000 μ l, y se agregó 600 μ l de acetona con una micropipeta de 1000 μ l para lavar la muestra. Siguiendo el protocolo, Nuevamente se centrifugó la muestra, volviendo a repetir el mismo procedimiento 3 veces más. Una vez terminando con los ciclos de centrifugado, se abrieron los tubos eppendorf y se colocaron con la tapa abierta en un vaso de precipitado de 50 ml y se dejaron en una estufa de calentamiento a 30°C por 24 hrs para evaporizar completamente la acetona (Figura 7).



Figura 7. Fotografía tomada a tubos eppendorf con contenido de harina de lombriz secada por medio de liofilización.

4.1.5 Preparación de placas con medio Mueller-Hinton.

En una navecilla se pesó 11.4 g de polvo Mueller-Hinton y 6 gr de sal en una balanza analítica, posteriormente se suspendió en 300 ml de agua destilada en un matraz Fernbach

de 2 litros. Sobre una plancha de calentamiento se agito suave hasta completa disolución, y se hirvió durante 1 minuto.

Se esterilizo la solución junto con placas de cristal de Petri a 121°C a 15 LDP por 15 minutos en una autoclave. Una vez tibia la solución se vaciaron en las placas de Petri estériles y se guardaron en el refrigerador hasta su uso.

4.1.6 Antibiogramas

En el área de inoculación del Laboratorio de Microbiología, se encendieron los mecheros para esterilizar el lugar, posteriormente se tomaron placas con medio Mueller-Hinton del refrigerador y se colocaron cerca del mechero para que estuvieran a temperatura ambiente antes de sembrar la bacteria. Se tomó la bacteria de la incubadora identificada previamente por el método de identificación bioquímica (kit microbiolog) como *Vibrio harveyi*, vibrio Gram negativo.

Con un hisopo se tomó *Vibrio harveyi* y se dispersó la bacteria por toda la placa para sembrarla, con unas pinzas esterilizadas se tomó de los tubos eppendorf .500 g de muestra de la harina de lombriz liofilizada previamente centrifugada y se colocó sobre la placa con bacteria. Posteriormente se tomaron sensidiscos con unas pinzas esterilizadas y se colocaron de igual manera sobre una placa con bacteria, y se añadieron 10µl de acetona, como como nuestro control negativo, para asegurar que la acetona no estuviera inhibiendo la bacteria, ya que con este solvente se realizó el lavado del ac. tricloroacético de la muestra. Las placas se realizaron por triplicado.

4.1.7 Preparación de harina de lombriz secada por medio de estufa.

Se colocó una caja petri en una balanza analítica y se pesó únicamente 19.08 g de lombriz de tierra (peso húmedo).

Posteriormente las lombrices se sacrificaron mediante shock térmico a una temperatura de 4°C, dejándolas en el congelador durante 2 hrs. Después, las lombrices se distribuyeron en 2 cajas de petri para posteriormente ser introducidas al horno a 60°C por 6 hrs (Figura 8: A).

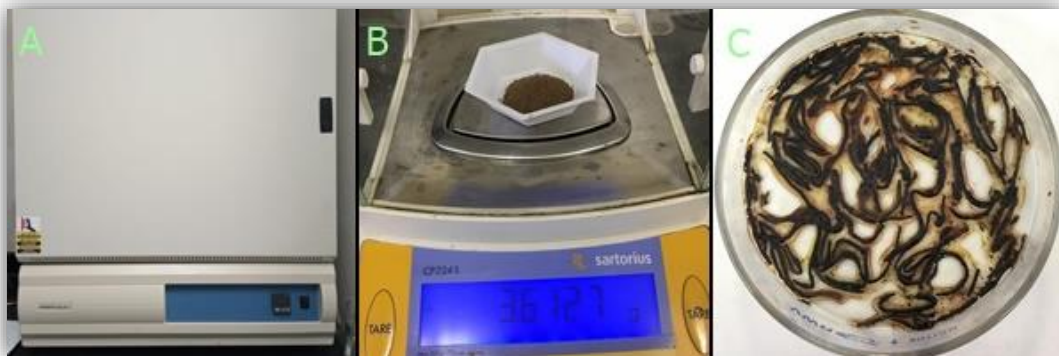


Figura 8. Fotografía tomada a: **A.** Estufa ubicada en el Laboratorio de Nutrición Acuícola en la FCM; **B.** Peso de lombriz (peso seco); **C.** Lombriz de tierra secada por medio de estufa.

La lombriz deshidrata en estufa (Figura 8: C) se trituro en una licuadora hasta obtener polvo, y en una balanza analítica se colocó la muestra para obtener el peso seco (Figura 8: B), el cual fue de: 3.61 g. La harina seca de lombriz se almaceno en una bolsa ziploc hasta su uso.

4.1.8 Extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz secada por medio de estufa.

La extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz por método convencional se realizó de acuerdo al protocolo de Sánchez (2001), realizando el mismo procedimiento que en el apartado (4.1.4) de la metodología.

4.1.9 Antibiogramas

Los antibiogramas se realizaron utilizando el mismo método del apartado (4.1.6) de la metodología, a diferencia que se colocó .500 g de muestra de la harina de lombriz por método convencional en horno previamente centrifugada sobre la placa con bacteria sembrada.

4.2 Preparación de dieta con harina de mayor efecto antimicrobiano: Harina de lombriz secada por medio de liofilización.

4.2.1 Obtención de lombrices

Se colectaron lombrices de tierra *E. foetida* de la lombricomposta ubicada en la FCM de la UABC. Se seleccionaron lombrices maduras con un tamaño promedio de 8-10 cm, obteniendo un peso total húmedo de 108.79 g.

Las lombrices se lavaron con agua dulce para separar el exceso de tierra y humus de la piel exterior de la lombriz.

Se colocaron en un matraz Fernbach de 2 litros junto con papel secante humedecido con agua destilada, con el objetivo de limpiar el sistema digestivo de las lombrices. Se colocó una tapa de papel parafilm y se dejaron en el matraz por 24 hrs.

Después de las 24 hrs, se retiraron las lombrices del matraz Fernbach, junto con el papel secante. Las lombrices se repartieron entre 9 tubos falcón de 50 ml y se dejaron las muestras en un ultra congelador Thermo Scientific a una temperatura de -75°C por 24 hrs. Pasando el tiempo de congelamiento, se colocaron las muestras en el liofilizador a una temperatura de -53°C. Las muestras se dejaron en el equipo por 24 hrs.

Pasando el tiempo de liofilizado se retiraron las muestras del equipo, y en una balanza analítica se pesó la muestra obtenida: 53.60 g. Posteriormente se trituro la harina de lombriz en una licuadora hasta obtener polvo y se almaceno en una bolsa ziploc hasta su uso.

4.2.2 Formulación de dieta con harina de lombriz secada por medio de liofilización.

Para la obtención de pellets de la dieta a base de harina de lombriz liofilizada, se pesaron cada uno los ingredientes de la tabla 1 por separado con la ayuda de una balanza analítica. Se vertieron únicamente las harinas en un recipiente con capacidad de 2 kg y se mezcló por 5 minutos, posteriormente se colocó el Nutrikelp, y se mezcló por otros 5 minutos; se colocaron los 5 g de grenetina en un vaso de precipitado de 50 ml con aproximadamente 15 ml agua y se colocó por 3 minutos en el microondas, y se vertió en el

recipiente, finalmente se mezclaron todos los ingredientes hasta obtener una masa homogénea.

En una charola de aluminio, se aplano la masa obtenida con la mano haciendo círculos pequeños y se colocaron en una estufa a 60°C por 6hrs. Por último, se retiró de la estufa y se almacenaron los pellets en una bolsa ziploc hasta su uso (Figura 9).



Figura 9. Fotografía de pellets a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización.

Tabla 1. Composición nutricional de dieta a base de harina de lombriz secada por liofilización y dieta a base de harina de pescado.

Ingredientes	Gramos (g)	Ingredientes	Gramos (g)
Harina de lombriz	52.3	Harina de pescado	52.7
CPS*	8.7	CPS*	7.7
Nutrikelp	2.0	Nutrikelp	2.0
Harina de trigo	19.0	Harina de trigo	19.0
Grenetina	5.0	Grenetina	5.0
Celulosa	9.45	Celulosa	7.05
Aceite animal	-	Aceite animal	3.0
Mix Vit y Min**	1.0	Mix Vit y Min**	1.0
Taurina	0.50	Taurina	0.50
Lisina	0.75	Lisina	0.75
Metionina	0.30	Metionina	0.30
Triptófano	0.50	Triptófano	0.50
Colina	0.50	Colina	0.50

*Concentrado proteico de soya **Mix de vitaminas y minerales

Con la ayuda de un mortero se trituraron los pellets elaborados hasta obtener polvo para poder realizar la extracción del compuesto bioactivo de la harina de lombriz (Figura 10).

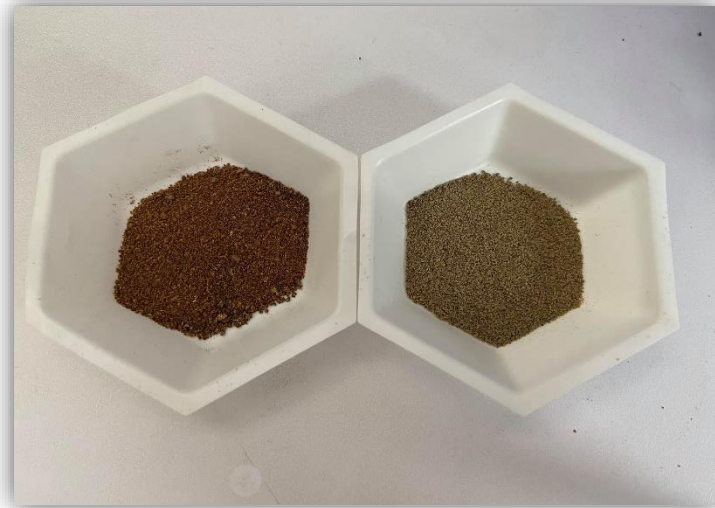


Figura 10. Fotografía tomada a: Contenido de navecilla izquierda, alimento a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización., Contenido de navecilla derecha, alimento a base de harina de pescado.

4.2.3 Extracción de compuestos bioactivos en harinas.

La extracción del compuesto bioactivo de la dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización, se realizó de acuerdo al protocolo de Sánchez (2001), realizando el mismo procedimiento que en el apartado (4.1.4) de la metodología. Para verificar que el alimento de harina de pescado (dieta control negativo) no tuviera algún compuesto bioactivo o influencia en los antibiogramas, se realizó el mismo procedimiento de extracción Sánchez (2001), descrito en el apartado (4.1.4) de la metodología (Figura 11).

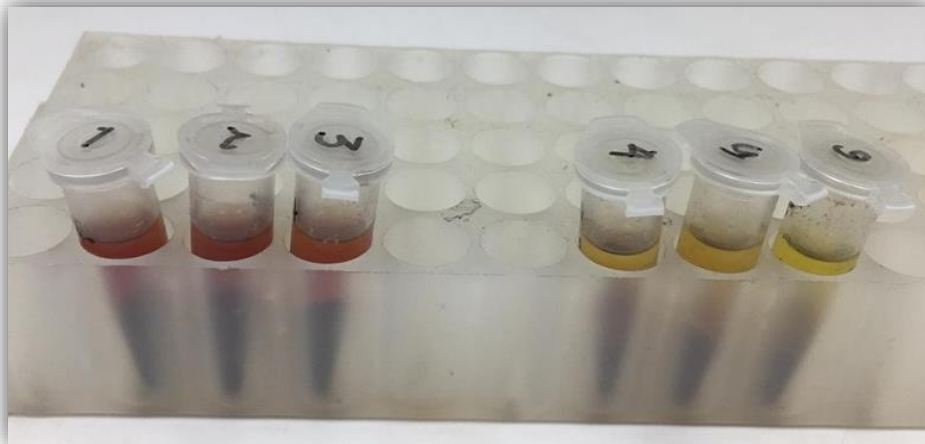


Figura 11. Fotografía tomada a: Centrifugado para la extracción de compuestos bioactivos., Contenido de tubos eppendorf de izquierda: dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización., Contenido de tubos eppendorf de derecha: dieta a base de harina de pescado.

4.2.4 Antibiogramas

Los antibiogramas se realizaron utilizando el mismo método del apartado (4.1.6) de la metodología, a diferencia que se colocó muestra de la dieta a base de harina de lombriz liofilizada previamente centrifugada sobre la placa con bacteria sembrada, y dieta a base de harina de pescado. Estas placas se realizaron por triplicado por cada dieta.

4.3 Evaluación del efecto antibacteriano de la dieta a base de harina lombriz secada por medio de liofilización contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.

4.3.1 Preparación de placas con medio TSA

En una navecilla se pesó 8 g de polvo TSA y 4 g de sal en una balanza analítica, se suspendió en 200 ml de agua destilada en un matraz Fernbach de 2 litros. Sobre una plancha de calentamiento se agito suave hasta completa disolución, y se hirvió durante 1 minuto.

Se esterilizo la solución junto con placas de cristal de Petri a 121°C a 15 LDP por 15 minutos en una autoclave. Una vez tibia la solución se vaciaron en las placas de Petri estériles y se guardaron en el refrigerador hasta su uso.

4.3.2 Identificación bacteriana

Para la identificación bacteriana de Gram positivas y Gram negativas, se utilizaron técnicas como aislamiento y purificación, tinción Gram para la observación de las bacterias en el microscopio compuesto e identificación por bioquímica, utilizando el kit microbiolog (Figura 12).

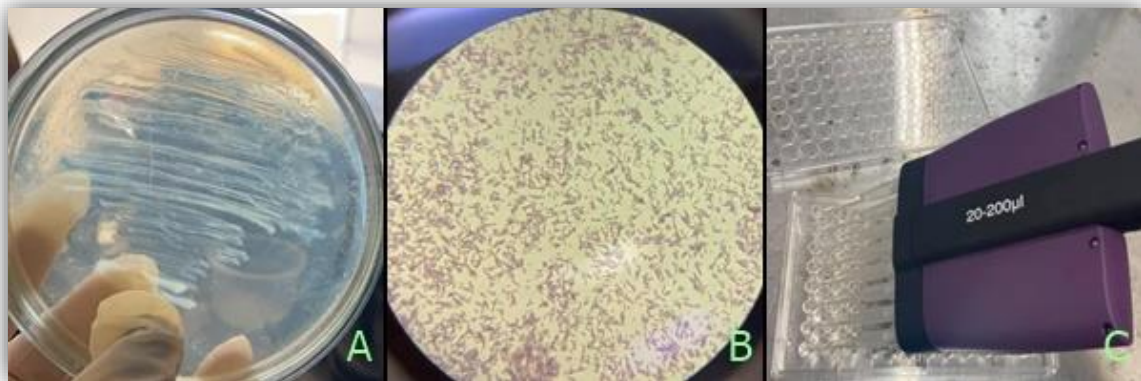


Figura 12. Fotografías tomadas a: **A.** Aislamiento y purificación de bacteria Gram positiva *Bacillus cereus*, **B.** Identificación bacteriana por tinción Gram de *Bacillus*, **C.** identificación bacteriana por bioquímica (Microplaca Gen III).

4.3.3 Antibiógramas con bacteria Gram positiva y Gram negativa.

Los antibiógramas se realizaron utilizando el mismo método del apartado (4.1.6) de la metodología, a diferencia que se realizaron los antibiógramas con dieta a base de harina de lombriz liofilizada y dieta a base de harina de pescado como control negativo contra 2 diferentes tipos de bacterias, Gram positiva (*Bacillus cereus*) sembrada en placa TSA y Gram negativa (*Vibrio harveyi*) sembrada en placa Muller - Hinton. Estos antibiógramas se realizaron por triplicado por cada tipo de dieta en conjunto a cada tipo de bacteria.

4.4 Análisis estadístico

La evaluación de la normalidad de los datos se determinó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para la evaluación de la homocedasticidad de los datos se aplicó el test de Levene, los cuales se realizaron con el programa STATISTICA. El efecto que se presentó en las muestras ante los halos de inhibición en el antibiógrama se evaluó con la

prueba T-Student por grupos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICA.

5 RESULTADOS

5.1 Efecto antibacteriano de la harina de lombriz secado por medio de liofilización (HLL) y harina de lombriz secado por medio de estufa (HLE).

Se identificaron 2 tipos de bacterias, *Bacillus cereus* (Gram positiva) y *Vibrio harveyi* (Gram negativa), Tanto la HLE como HLL mostraron actividad de inhibición para *Vibrio harveyi* (Figura 13).

Al someter los datos obtenidos a una prueba T-Student se observaba una diferencia significativa ($P < 0.05$) (VER ANEXOS) en el diámetro del halo de inhibición generado por cada una de las harinas. Se encontró un mayor diámetro en los antibiogramas de la HLL (A1=3.3 cm, A2=3.0 cm, A3=2.7 cm), en comparación al diámetro registrado en los antibiogramas de HLE (A1=1.9 cm, A2=1.7 cm, A3=1.4 cm). Cabe mencionar que esta actividad sucedió dentro de las primeras 24 hrs posterior a la siembra bacteriana.

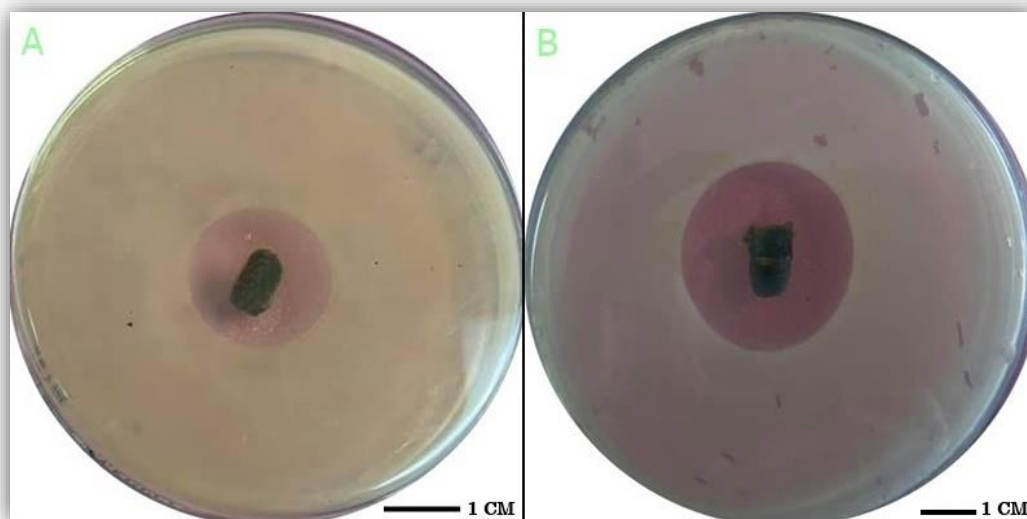


Figura 13. Fotografías de: **A.** Antibiograma con harina antibacteriana de lombriz secada por medio de estufa, con un halo de inhibición contra *Vibrio harveyi* de 1.9 cm; **B.** Antibiograma con harina antibacteriana de lombriz secada por medio de liofilización, con un halo de inhibición contra *Vibrio harveyi* de 3.0 cm.

Siguiendo el monitoreo de los antibiogramas, 48 hrs posterior a la siembra de la bacteria, se midieron nuevamente los halos de inhibición bacteriana, con el fin de observar

las hrs de influencia del compuesto bioactivo que tiene la HLL contra la bacteria *Vibrio harveyi* (Figura 14), los cuales mantuvieron el halo de abertura a diferencia de los antibiogramas con HLE, donde se registró una reducción en el diámetro de los halos teniendo una diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de antibiogramas de la harina de lombriz secada por medio de liofilización (HLL) y harina de lombriz secada por medio de estufa (HLE), presentando actividad antibacteriana contra la bacteria *Vibrio harveyi* en 48 hrs.

HLE 24 hrs	HLL 24 hrs	Acetona (C ⁻) 24 hrs
1.9 cm	3.3 cm	0 cm
1.5 cm	3.0 cm	0 cm
1.1 cm	2.7 cm	0 cm

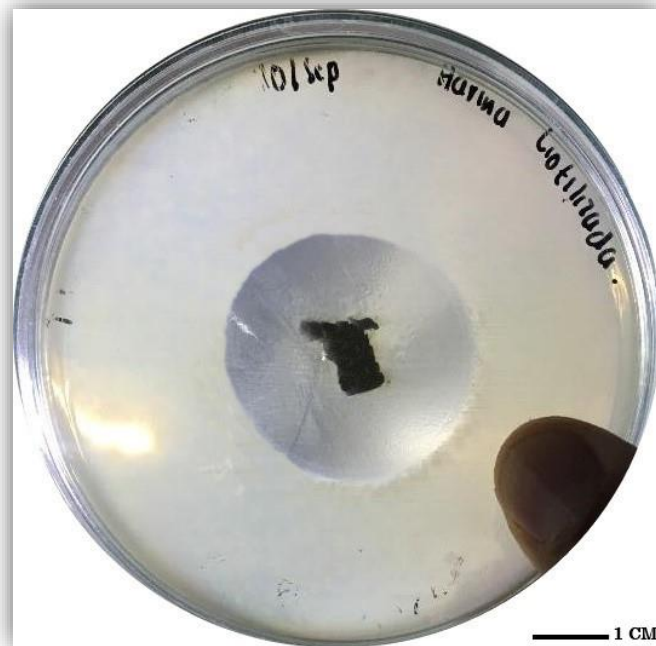


Figura 14. Fotografía tomada a antibiograma con harina de lombriz secada por medio de liofilización con efecto antibacteriano, 48 hrs posterior a la siembra, con un halo de inhibición contra *Vibrio harveyi* de 3.3 cm.

5.2 Comparación del efecto antibacteriano de la dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización y dieta a base de harina de pescado.

Debido a que Rivas *et al.* (2006) menciona que los péptidos antimicrobianos están presentes en la mayoría de los organismos, incluyendo peces, se realizaron antibiogramas para observar el verdadero efecto de la harina de lombriz liofilizada, posterior a su incorporación a la dieta formulada.

En la dieta a base de harina de pescado, no se obtuvo acción antibacteriana contra la bacteria *Vibrio harveyi* (VER ANEXOS) en ninguna de las 3 réplicas, a diferencia de la dieta a base de harina de lombriz liofilizada, con un halo inhibitorio de 2.9 cm de diámetro, manteniendo la misma abertura sin ser contaminada con la bacteria *Vibrio harveyi* por más de 48 hrs (Figura15).



Figura 15. Fotografía tomada a antibiograma con dieta a base de harina de pescado (P), y dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (L) contra bacteria *Vibrio harveyi*, con un halo de inhibición de 2.9 cm.

De la misma manera, y solo para descartar cualquier error en el procedimiento de liberación de los compuestos antibacterianos, también se realizó un antibiograma por

triplicado con acetona (Figura 16) como un control negativo, debido a que se utilizó este solvente para la liberación de péptidos como lo marca el protocolo de Sánchez (2001), verificando de esta manera en los resultados posteriores a las 24 hrs, la inactividad antibacteriana contra la bacteria *Vibrio harveyi*, ya que no se presentó ninguna inhibición en la placa.



Figura 16. Fotografía tomada a antibiograma con sensidiscos con 10 μ l de acetona cada uno, contra bacteria *Vibrio harveyi*, sin inhibición antibacteriana.

5.3 Comparación del efecto antibacteriano de la dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) contra bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

Finalmente, en cuanto a la comparación del efecto antibacteriano que causa la DLL entre los 2 tipos de bacterias: Gram negativa (*Vibrio harveyi*) y Gram positiva (*Bacillus cereus*), se observó un halo máximo de inhibición de 4.3 cm para *Vibrio harveyi* Gram negativo (Figura 17), mientras que para *Bacillus cereus* Gram positiva se observó que el halo máximo generado por la DLL fue de 3.9 cm (Figura 18) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los halos de inhibición bacteriana contra bacteria Gram negativa *Vibrio harveyi* y bacteria Gram positiva *Bacillus cereus*, con dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) como indicador antibacteriano y antibiogramas con dieta a base de harina de pescado (DP) como control negativo contra los 2 tipos de bacterias.

DLL Gram ⁻	DP Gram ⁻	DLL Gram ⁺	DP Gram ⁺
4.3 cm	0 cm	3.9 cm	0 cm
4.1 cm	0 cm	3.8 cm	0 cm
3.9 cm	0 cm	3.7 cm	0 cm

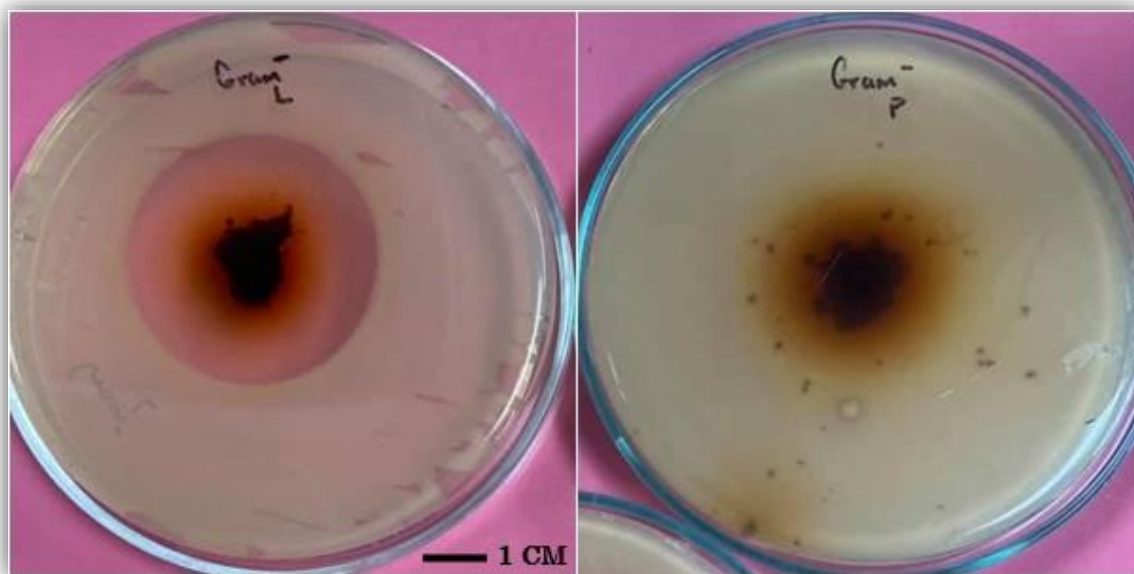


Figura 17. Fotografía tomada a antibiogramas; Izquierda, dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) contra bacteria *Vibrio harveyi* Gramnegativo, con efecto antibacteriano y un halo de inhibición de 4.1 cm. Derecha, dieta a base de harina de pescado (DP) contra bacteria *Vibrio harveyi* Gramnegativo, sin efecto antibacteriano.

La dieta a base de harina de pescado fue utilizada como control negativo en esta fase experimental, con la intención de descartar la actividad antibacteriana contra los 2 tipos de bacterias, y efectivamente, los antibiogramas con la dieta a base de harina de pescado contra las bacterias *Vibrio harveyi* Gram negativa, y *Bacillus cereus* Gram positiva no presentaron dicha actividad.

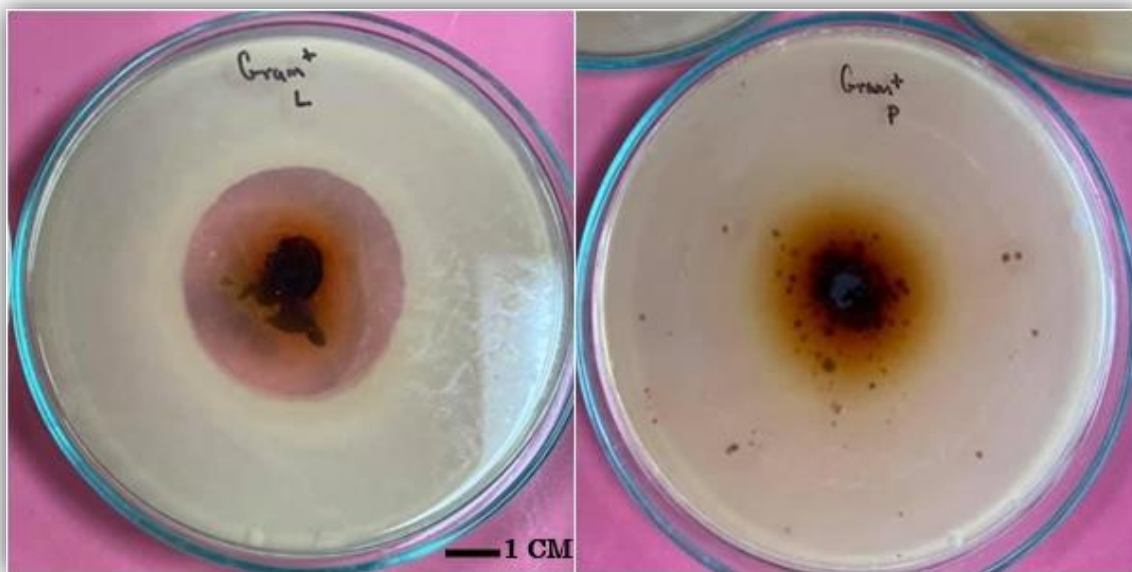


Figura 18. Fotografía tomada a antibiogramas; Izquierda, dieta a base de harina de lombriz secada por medio de liofilización (DLL) contra bacteria *Bacillus cereus* Gram positiva, con efecto antibacteriano y un halo de inhibición de 3.9 cm. Derecha, dieta a base de harina de pescado (DP) contra bacteria *Bacillus cereus* Gram positiva, sin efecto antibacteriano.

Se realizó un análisis estadístico T-Student (VER ANEXOS)., para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la actividad antibacteriana que genera la DLL entre los 2 tipos de bacterias *Vibrio harveyi* Gram negativa, y *Bacillus cereus* Gram positiva, es decir, si había una mayor susceptibilidad en alguna de las 2 bacterias en contacto con la DLL, por lo que en la prueba T-Student se obtuvo una ($P > 0.05$) por lo que no hay una diferencia estadísticamente significativa.

6 DISCUSIÓN

Los beneficios al someter la harina de lombriz por el método de liofilización, es que en el proceso de congelamiento de muestras fue a -75°C , el cual está por debajo de la proliferación de microorganismos (5°C), como lo describen Parra y Peña (2015). En este caso se colocaron las muestras de lombriz a -75°C , evitando la contaminación bacteriana y así como también la degradación de proteasas, estructuras proteicas y peptídicas de la lombriz. Al realizar la comparación entre la actividad antibacteriana que mostró la harina de lombriz secada por estufa y la harina de lombriz secada por liofilización, se observó una clara diferencia entre los resultados, teniendo mejores resultados inhibitorios contra la bacteria Gram negativa por el método de liofilización, relacionando directamente estos resultados con los beneficios de este proceso, que a diferencia de métodos convencionales como el secado directo por convección, los valores nutritivos que tienen los alimentos se pierden en los procesos, debido a que la deshidratación se lleva a cabo a altas temperaturas para la evaporación superficial de cualquier producto, sin embargo, la actividad antibacteriana que causa la harina de lombriz sigue presente en el proceso de secado por estufa.

Además de esto en el método específico del liofilizado, el almacenamiento de la harina de lombriz en este caso puede ser por un largo tiempo sin que se deteriore o se dañe, ya que el objetivo de la técnica de liofilizado consiste en retirar el agua por medio de la sublimación progresiva, evitando pasar el conglomerado de lombriz congelado (sólido) por el estado líquido, dependiendo de la velocidad del aire y la humedad (Vargas, 2015).

Realizando una comparación entre ambos métodos de deshidratación de harinas (estufa y liofilizado), Parra y Peña (2015) mencionan que el método de liofilización también presenta desventajas, entre ellas su tardado proceso de deshidratación que va desde las 24 a 36 hrs, ya que se tienen que realizar diferentes procesos para obtener un producto liofilizado, otra desventaja que mencionan de este método es el alto costo de equipo y consumo energético.

Estos mismos autores realizaron un análisis de costos de deshidratación por el método de liofilización y el método convencional en estufa, en el cual hicieron cotizaciones de varias empresas deshidratadoras y se concluyó que el costo promedio del secado convencional es de $\$16.43$ MXN/ kg, y el costo promedio del secado liofilizado es de $\$57.71$ MXN/ kg, pero la diferencia se observa realmente en la calidad del producto procesado

(Figura 19) y la mayor cantidad de componentes nutricionales que tiene un producto deshidratado por el método de liofilización, además en este caso, para el cultivo de lombriz de tierra *Eisenia foetida*, no se necesita mayor inversión ni gastos elevados por alimento, por lo que se recompensan estos costos para obtener harina de lombriz liofilizada. Además, es un producto que puede competir en el mercado, ya que tiene un valor agregado, al contener un compuesto antimicrobiano de amplio espectro.



Figura 19. Fotografía tomada a 2 diferentes métodos de deshidratación de harinas; Izquierda, Lombriz de tierra *Eisenia foetida* secada por medio de liofilización, con aspecto similar al conglomerado de lombriz congelado inicialmente. Derecha, Lombriz de tierra secada por medio de estufa, con menor cantidad de masa obtenida.

Debido a que en el proceso de deshidratación por liofilización la lombriz pierde hasta un 80% de su composición corporal, ya que se reduce el contenido intestinal, el líquido celómico y excretas, Chitrángulo (2010) menciona que es necesario recolectar de 8 a 9 kg de lombrices en peso húmedo para producir 1 kg de harina de lombriz en peso seco.

En los resultados se observó que por el método de liofilización aparte de ser la harina con mayor efecto antimicrobiano se obtuvo mayor peso seco que por el método convencional (deshidratación en estufa), que esto reflejado en cantidades mayores, hace una diferencia notoria en cuanto la obtención de masas.

La proteína para los peces es uno de los componentes energéticos más importantes a considerar, aún más si son las primeras fases de vida, ya que requieren arriba del 60%

de proteína para un óptimo crecimiento (Gatlin III, 2000), por lo que se debe tomar en cuenta las características nutricionales de las diferentes fuentes alternas que hoy en día se están desarrollando, como es el caso de la harina de *Eisenia foetida*.

La dieta a base de harina de lombriz puede ser un buen potencial para juveniles de peces en cuanto a las necesidades nutricionales, debido a que en los resultados obtenidos de (Isea *et al.*, 2008) se presentó que la harina de lombriz posee un alto valor de digestibilidad proteica y energética, permitiendo a los organismos una elevada absorción de los nutrientes, en comparación al salvado de trigo y harina de soya, fuentes proteicas que hoy en día compiten en el mercado, comprobando que tienen limitantes para satisfacer los requerimientos nutricionales de varias especies, una de ellas *Totoaba macdonaldi*.

Debido a que los oligoquetos funcionan como carroñeros en el ecosistema de suelos, es decir, alimentándose del material muerto y en descomposición, se crea un tabú e interrogaciones si realmente pueden ser potenciales fuentes de proteína en una dieta comercial para animales, e incluso para consumo humano (Alvarenga *et al.*, 2017)

Autores como Chitrángulo (2010) menciona que *E. foetida* contiene de 65 a 75 % de proteína cruda, vitaminas A - B, ácidos grasos y un perfil de aminoácidos esenciales muy completos, con la excepción de la lisina, metionina y cisteína los cuales se presentan en cantidades mínimas, ZhenJun (2005), reporta que la harina de lombriz posee entres 54 a 71% de proteína seca. Así mismo Isea *et al.* (2008), determinó que la harina de lombriz contiene un 47.9% de proteína, siendo mayor al porcentaje de salvado de trigo con 36.6%, por lo que la harina de lombriz podría ser competencia en el mercado para dietas de peces.

Por otro lado, cada vez los antibióticos son menos eficientes en inhibir las bacterias debido a la resistencia que estas generan, por lo que las industrias alimentarias buscan nuevos diseños y alternativas para la conservación de alimentos y evitar las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (De la Fuente *et al.*, 2015), por lo que, al diseñar una dieta de harina de lombriz liofilizada para peces, se está evitando que la dieta sea un producto perecedero debido al proceso dado por la liofilización de la harina, además es importante destacar que al ser consumido por los organismos, se evita un estado cítrico en los organismos por enfermedades bacterianas patógenas, ofreciendo un producto final libre de ETA's al consumidor.

Nitish *et al.* (2018), realizaron un estudio del potencial antimicrobiano de un extracto de lombriz de tierra de la especie *Eisenia foetida* incorporado a una dieta para peces de carpa común *Cyprinus carpio*. Para la obtención del extracto de lombriz, se colocaron las lombrices directamente al sol, una vez muertas se trituraron los organismos completamente, además añadiendo el jugo celómico expulsado a la dieta para carpa. Dicha dieta, fue probada contra bacterias aisladas de varios tejidos de la carpa común, como el epitelio y branquias, donde se encontró una mayor inhibición en bacterias Gram negativas como *Aeromonas hydrophila*, registrando un halo de inhibición de 2.4 cm, comparando estos resultados con nuestro estudio, la dieta de lombriz (*E. foetida*) mostró actividad antimicrobiana en las bacterias Gram negativas *Vibrio harveyi*, registrando un halo de inhibición de 4.3 cm.

Mathur *et al.* (2010), destacan que en su investigación se utilizó extracto etanólico de harina de lombriz, el cual registró una máxima actividad antibacteriana contra *Streptococcus pyogenes*, patógeno Gram positivo que es patogénico para el humano, el cual obtuvo un halo de inhibición de 1.9 cm, incluso se obtuvo una inhibición antifúngica con el mismo extracto contra *Cándida albicans*, seguido de la bacteria *Escherichia Coli* con un halo de inhibición de 1.5 cm. También dan a conocer que la harina de lombriz en conjunto con éter de petróleo como disolvente, mostró una máxima inhibición bacteriana contra *Staphylococcus aureus* (2.3 cm). Se puede determinar que la harina de lombriz de tierra *E. foetida* tiene un amplio efecto contra bacterias patógenas que pueden infectar tanto al humano como a animales. Como es el caso en esta investigación en la cual se obtuvo una máxima inhibición en la bacteria Gram negativa *Vibrio harveyi* (4.1 cm) superando por mucho a los halos de inhibición registrados por (Mathur *et al.*, 2010), pero que estadísticamente la dieta de harina de lombriz no presenta diferencia significativa en el efecto de inhibición contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.

En otro estudio realizado por Vasanthi *et al.* (2013), los diámetros de inhibición registrados para bacterias Gram positivas también son inferiores (*Bacillus subtilis* 2.3 cm) al diámetro del halo de inhibición registrado en el presente trabajo para la bacteria Gram positiva (*Bacillus cereus* 3.8 cm). Sin embargo, Vasanthi *et al.* (2013), utilizaron una especie de lombriz de tierra diferente *Eudrilus eugeniae* y su proceso de obtención del extracto de lombriz, se obtuvo sacrificando a los organismos exponiéndolos a un ambiente de calor extremo, obteniendo como resultado final una pasta de líquido celómico, así como restos del tejido del organismo, método muy diferente al realizado en este trabajo por liofilización,

donde se permite una mejor conservación de las moléculas biomoléculas activas como proteínas y enzimas que se encuentran en el intestino de la lombriz de tierra. Cabe mencionar que la bacteria *Bacillus cereus* no ha sido reportada como un potencial patógeno para peces en cultivo, por lo que se puede deber la diferencia de diámetros de los halos de inhibición obtenidos en ambas bacterias Gram positivas. Sin embargo, la harina de lombriz tiene un efecto inhibitorio contra este tipo de bacterias.

De la Fuente *et al.* (2015), mencionan que para observar la sensibilidad de la bacteria al ser expuesta a antibióticos o antibacterianos, se pueden emplear 2 tipos de técnicas: *dilución*, en la que se obtienen resultados cuantitativos, es decir, que es posible ver la concentración mínima inhibitoria de la bacteria (CMI), y la técnica por *difusión* que se utilizó en este trabajo, con la que se logró observar el efecto que causa el antibiótico o antibacteriano en la bacteria, determinando lo observado en 3 posibles respuestas: resistencia, susceptibilidad intermedia y susceptibilidad.

Como ya se mencionó, el caso en el que ocurre la resistencia es cuando la bacteria no se ve afectada en lo absoluto al antibiótico aun cuando se administran altas dosis, ya que la bacteria desarrolla mecanismos de defensa haciéndose inmunes al antibiótico, por lo que la bacteria sigue proliferando en el medio (De la Fuente *et al.*, 2015). La susceptibilidad intermedia se refiere cuando la bacteria tiene un efecto variable al antibiótico o al antibacteriano, es decir, puede ser resistente o susceptible y se puede observar un efecto antibacteriano si se concentra en el sitio de la infección o se aumenta la dosis del antibacteriano (De la Fuente *et al.*, 2015).

En el caso de la susceptibilidad, ocurre cuando la bacteria se ve afectada por la administración de una dosis habitual del tratamiento antimicrobiano, ya que inactiva sus mecanismos de defensa, evitando que las bacterias se multipliquen y desarrollen enfermedades patógenas en los organismos (De la Fuente *et al.*, 2015). Tomando de referencia estos conceptos, en los antibiogramas realizados con harina de lombriz liofilizada (HLL) y dieta a base de harina de lombriz liofilizada (DLL), se obtuvo susceptibilidad en ambos tipos de bacterias Gram negativa *Vibrio harveyi* y Gram positiva *Bacillus cereus*, observándose, que en el efecto inhibitorio que realiza la harina de lombriz de tierra se mantiene inclusive al ser parte de la dieta formulada

Ansari y Sitaram (2011) determinaron en un estudio de investigación que *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*, son principales bacterias causantes de ETA's, y de acuerdo a los estudios realizados por Nitish *et al.* (2018), estas bacterias son susceptibles contra el extracto de lombriz de tierra de *E. foetida*.

Se han publicado algunos estudios sobre del efecto antibacteriano que tiene la lombriz de tierra, contra bacterias patógenas: La primera biomolécula activa, con acción antimicrobiana que se identificó de la lombriz de tierra fue un péptido denominado Lumbricina I, el cual está constituido por 62 aminoácidos (aa') y el 15 % de estos aa' se forman por prolina, mismo que repara y da mantenimiento en los músculos (Cho *et al.*, 1998), este péptido fue obtenido de la lombriz de tierra *Lumbricus rubellus* la cual muestra una amplia actividad antimicrobiana con diferentes bacterias (Vasanthi *et al.*, 2013) igual que *Eisenia foetida* en el presente estudio contra 2 diferentes tipos de bacteria (Gram positiva y Gram negativa).

Wang *et al.* (2003) identificaron 2 péptidos denominados PP1 y OEP3121, encontrados en las lombrices *Eisenia foetida* y *Pheretima tschiliensis*, 8 años más tarde Wenliang *et al.* (2011), encontraron el péptido Lumbrina-PG, el cual se identificó a partir de secreciones cutáneas de la lombriz de tierra *Pheretima guillelmi*.

Wenli *et al.* (2011), describen que a consecuencia del ambiente en el que se desarrollan las lombrices de tierra, a través de su evolución favorecieron de manera eficiente sus defensas contra patógenos de este ambiente, del mismo modo desarrollaron proteínas activas y enzimas funcionales como antibacterianas, antitumorales, antiinflamatorias, anticoagulantes, antifúngico, entre otros. Todas las especies de lombriz de tierra, desarrollan diversas actividades antimicrobianas, generadas principalmente en el intestino derivadas de metabolitos, creando liquido celómico y actuando directamente en bacterias por lo que se cree que haya bacterias simbióticas en el intestino de las lombrices para contrarrestar los patógenos.

Los mecanismos de acción inhibidora que presentan los péptidos antimicrobianos (PAM's) contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, se ha descrito que pueden ser de 2 maneras: indirectas y/o directas, y estas últimas dependen de la proteína o proceso que es afectado por el antimicrobiano, ocasionándole la muerte (Calvo y Martínez, 2009).

La acción inhibidora indirecta de los PAM's contra las bacterias tiene una acción mutua con el sistema inmune del hospedero, haciendo más eficaz las respuestas inmunitarias a través de rutas de señalización, evitando el paso al patógeno al sistema del hospedero. Los PAM's tienen la capacidad de estimular la maduración de células dendríticas o células presentadoras de antígenos, principales células para el buen funcionamiento del sistema inmune, activando células B y T los cuales tienen la función del reconocimiento de antígenos para ser destruidos, además los PAM's también reúnen suficientes células efectoras como los monocitos, macrófagos y neutrófilos para destruir a los agentes extraños (Gonzales *et al.*, 2017). Al observar la acción antibacteriana que tiene la harina de lombriz liofilizada sobre ambos tipos de bacterias (Gram positiva y Gram negativa), y al ser una dieta potencial para ser suministrada en peces juveniles, se puede lograr un desarrollo más eficiente del sistema inmune como lo describe Gonzales *et al.* (2017).

Por otro lado, la acción inhibidora directa de los antimicrobianos se puede dar por síntesis de la pared celular bacteriana, estructura importante de las bacterias ya que actúa como barrera protectora a antibióticos (Calvo y Martínez, 2009). Las bacterias Gram negativas son mucho más resistentes que las bacterias Gram positivas a los antimicrobianos, debido a que poseen una pared celular formada por una barrera externa (Calvo y Martínez, 2009), en la que se encuentran lipopolisacáridos y porinas, que dan paso a una capa delgada de peptidoglucano la cual da forma y rigidez a la bacteria. Esta capa se ubica antes de llegar al citoplasma bacteriano (López *et al.*, 2014). Debido a que las bacterias Gram positivas no tienen como tal una pared celular, es más sencillo paso los antimicrobianos de llegar a los procesos esenciales para la supervivencia de la bacteria (dianas), causando su muerte (López *et al.*, 2014).

Debido a que las bacterias Gram negativas son organismos más resistentes ante los efectos de los antimicrobianos como lo menciona Calvo y Martínez (2019), en el presente trabajo, se tomó la bacteria Gram negativa *Vibrio harveyi*, principalmente para evaluar el efecto antimicrobiano de la harina de lombriz *Eisenia foetida*, ya que se considera con mayor patogenicidad y resistente a comparación de *Bacillus cereus*, bacteria también utilizada, sin embargo, Aguirre *et al.* (2013) y Nitish *et al.* (2018), destacan que ambas especies utilizadas en este trabajo se consideran comunes en los cultivos acuícolas y en la flora intestinal de los peces, siendo microorganismos oportunistas, que en proliferaciones

mayores a lo habitual, estas bacterias pueden causar severas complicaciones en la salud de los organismos si no son controladas.

CONCLUSIÓN

- Las biomoléculas activas que funcionan como antibacterianos y que están presentes en la lombriz roja californiana *Eisenia foetida*, se mantienen en mayor concentración en la harina de lombriz secada por el método de liofilización, en comparación con la harina de lombriz secada por el método de estufa.
- La harina de lombriz liofilizada y dieta a base de harina de lombriz, funciona como un antibacteriano de amplio espectro.

La dieta a base de harina de lombriz liofilizada tiene un valor agregado, ya que la harina tiene un compuesto antimicrobiano de amplio espectro.

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer estudios enfocados en el área de nutrición, que permita conocer el potencial de la harina de lombriz de tierra como una fuente alterna de proteína, por ejemplo: Con mayor volumen de producción de harina de lombriz, se podrán realizar bioensayos (*in vivo*), para analizar y evaluar los diferentes porcentajes de inclusiones de harina de lombriz en dieta para peces, y así mismo, observar el efecto antibacteriano que tiene cada porcentaje de inclusión de harina de lombriz en la dieta.
- Se recomienda realizar estudios histológicos para conocer los efectos y beneficios que causa en los organismos al consumir una dieta a base de harina de lombriz.
- Se recomienda realizar estudios enfocados en el área de salud animal, que permita conocer la concentración mínima inhibitoria bacteriana de la harina de lombriz de tierra, además, por medio de una extracción sanguínea en los peces, se podría conocer si los organismos adquieren el compuesto antimicrobiano por medio de la dieta para poder inhibir bacterias patógenas.

9 Referencias

- Aguirre G.G., López A. E., Vázquez S.M., (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus Vannamii*. De revista científica Scientia Agropecuaria. En México. (Vol. 4, Pág.121-127). [file:///C:/Users/acer/Downloads/DialnetVibrioHarveyiEffectUnderSurvivalOfLitopenaeusVanna-5113815%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/acer/Downloads/DialnetVibrioHarveyiEffectUnderSurvivalOfLitopenaeusVanna-5113815%20(1).pdf)
- Alvarenga Pérez M.S., Escobar Machuca A.G., Flores Hernández F.B., (2017). Evaluación de 3 niveles de sustitución con harina de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) como fuente proteica, en la alimentación de alevines de tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). De la Universidad del Salvador. (Pag.34-46). <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/14642/1/13101642.pdf>
- Álvarez J., Álvarez A., Obregón J., Agurto C., (2004). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. De revista científica RC, laboratorio de microbiología de peces y crustáceos. En Maracaibo, Venezuela. (Vol.14,No.6) (Pág. 7-13) <https://www.redalyc.org/pdf/959/95914602.pdf>
- Andleeb S., Ejaz M., Azeem-Awan U., Ali S., Kiyani A., Shafique I., Zafar A., (2016). In vitro screening of mucus and solvent extracts of *Eisenia foetida* against human bacterial and fungal pathogens. University of Azad Jammu and Kashmir, Muzaffarabad, Pakistan. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.(Pag.971-975) [file:///C:/Users/acer/Downloads/InvitroscreeningofmucusandsolventextractsofEiseniafoetidaagainsthumanbacterialandfungalpathogens%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/acer/Downloads/InvitroscreeningofmucusandsolventextractsofEiseniafoetidaagainsthumanbacterialandfungalpathogens%20(2).pdf)
- Ansari A, and Sitaram K. (2011). An investigation the antimicrobial and antifungal properties of earthworm powder obtained from *Eisenia foetida*. De revista American Journal of Food Technology. (Vol.6) <https://scialert.net/fulltext/?doi=ajft.2011.329.335>
- Apún Molina J. P., (2007). Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivada en el laboratorio. De centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa – Instituto Politécnico Nacional, en Guasave, Sinaloa México. (Pag.16-17). <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/786/Tesis%20Apunmolina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Arcos Méndez, A., (2015). Condiciones de demanda de harina y aceite de pescado para piensos acuícolas en México. De Centro de investigación en alimentación y desarrollo A.C. (CIAD)., En Mazatlán, Sinaloa, México. (Pág. 21-25). <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/108/1/Arcos%20Mendez%20Andres.pdf>
- Arenas N.E., Moreno M.V., (2017). Producción pecuaria y emergencia de antibióticos. De revista científica Infectio, en Cundinamarca-Colombia. (Pág., 112,114). <file:///C:/Users/acer/Downloads/717-2218-1-PB1.pdf>
- Austin B., y Zhang X., (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. De revista Letters in applied microbiology. (Vol. 43., Pág. 119-124). <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>

- Bahadori, Z., Esmailzadeh L., Karimi-Torshiz M., Seidav A., Olivares J., Rojas S., Salem A., Khusro A., Lopez S., (2017). The effect of earthworm (*Eisenia foetida*) meal with vermi-humus on growth performance, hematology, immunity, intestinal microbiota, carcass characteristics, and meat quality of broiler chickens. De revista científica EISEVIER. En Universidad Islamica Azad, Iran. (Pág. 74-77)<https://core.ac.uk/download/pdf/154795464.pdf>
- Balbuena Rivarola, E.D., (2011). Manual básico de sanidad Piscícola. De organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura (FAO). Paraguay. (Pag.17,28) <http://www.fao.org/3/as830s/as830s.pdf>
- Beg M., Mandal B., Moulick S., (2016). Potential of earthworm meal as a replacement of fish meal for Indian major carps. De revista International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. (Vol.4 No.3) (Pág. 357-361). <file:///C:/Users/acer/Downloads/4-3-2.pdf>
- Botello A., Pérez K., Felix A., Rivera F., Viana M., Cuello M., Botello R. A., Martinez Y. (2019). Composición química de la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) co-seca con harinas vegetales como alimento para animales. De revista Ciencia y Agricultura, en México. (Pág. 1-4). https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/001/2838/1/PPS_1445_Chemical_composition_earthworm.pdf
- Cabello C.F., (2004). Antibióticos y acuicultura: consecuencias para la salud humana y animal. De revista científica ScieLo, en Santiago- Chile. (Vol.132, No.8). https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000800014
- Calvo Jorge, y Martínez Luis., (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. De revista científica ELSEVIER, en Santander – España. (Vol.27. No. 1) (Pág. 44-52). <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-antimicrobianos-S0213005X08000177>
- Casado Gonzalez M., Torrico Cabezas G., Medina A., (2012). Medios de cultivos en laboratorio de microalga: Medios de cultivo communes., (Pág.13). <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Cedillo Barron L., Lopez Gonzales M., Gutierrez Castañeda B., (2015). ¿Qué es y cómo funciona el sistema inmune? De Revista Ciencia., (Pág. 20-23). De Instituto Politécnico Nacional, en México. http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_2/PDF/Sistema_Inmune.pdf
- Cercenado E., y Lozano J., (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: Conceptos generales (I)., De hospital General Universitario Gregorio Marañón., En Madrid-España. (Pág. 214,216). <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma-S1696281809719274>
- Chitrángulo A. (2010). Gestión verde: La harina de lombriz. En Buenos Aires – Argentina. <http://gestionverde.com/2010/09/harina-de-lombriz.html>

- Cho J., Park C., Yoon Y., Kim S. (1998). Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. De revista científica ELSEVIER., Korea Advanced Institute of Science and Technology, South Korea. (Pág. 71-74). <https://core.ac.uk/download/pdf/82507479.pdf>
- De Haro D. C., (2015). Evaluación de la harina de insectos como fuente alternativa a la harina de pescado en piensos para acuicultura. De Universidad de Almería, del departamento de Biología y Geología. En Almería-España. (Pag.22-45) <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=FdIXOvZwCV0%3D>
- De la Fuente S., Norma M., Villarreal P., Jesús Ma., Díaz L., Miguel A., García P., Ada P., (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. De revista SciELO, en Coahuila de Zaragoza – México. (Vol.42, No.2). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007
- Del Ángel Olascoaga, K. S., Sánchez Evangelista G., Carmona Navarrete I., Galicia Sánchez M. del C., Gómez Luna A., Islas Arrollo S. J., Castañeda Sánchez J. I., (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedor para el tratamiento de enfermedades infecciosas. De Artículo científico, de Gaceta Médica de México. En Ciudad de México – México. (Pág. 681,682,685). https://www.anmm.org.mx/GMM/2018/n6/GMM_6_18_681-688.pdf
- Durán L., y Henríquez C., (2009). Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en 5 sustratos orgánicos. De Universidad de Costa Rica, en San José – Costa Rica (Vol. 33 No.2): (Pág. 275-281). http://www.mag.go.cr/rev_agr/v33n02_275.pdf
- Gatlin III M.D., (2000). Nutrición de reproductores y juveniles de peces marinas. De IV simposio internacional de nutrición acuícola, en La Paz B.C.S. – México. (Pág. 74,77). https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/7gatlin.pdf
- Grajales S., Hang-Von-Hessberg C., Grajales A., (2018). Reporte de caso de *Aeromonas salmonicida* en Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) En Caldas, Colombia. De Boletín Científico. (Pag.4). <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v22n1/0123-3068-bccm-22-01-00076.pdf>
- González G. Melanie., San Juan G. Javier., Morales V. Fidel E., Otero G. Anselmo J., (2017). Péptidos antimicrobianos: Potencialidades terapéutica., De revista Medicina Tropical, en La Habana – Cuba. (vol. 69, No.2). <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/197/155>
- Isea L. F., Blé-M., C., Medina A. L., Aguirre P., Bianchi G., Kaushik S., (2008). Estudio de digestibilidad aparente de la dieta de lombriz *Eisenia* en la alimentación de trucha arcoíris *Onchorinchus mykiss*. De revista científica Scielo. (Vol.35/No.1). En Chile. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S07177518208000100008&lng=es&nrm=iso
- Leyton Y., y Riquelme C., (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. De Revista de biología marina y oceanografía, de revista científica SciELO., En Antofagasta-Chile. (Vol.43 No.3), Pág.441-456. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572008000300004

- Lezcano J.F., Borjas J., G., (2017). Optimización en la elaboración de harina de lombriz *Eisenia foetida* como fuente proteica en alimento para alevines de tilapia *Oreochromis sp.* De Escuela Agrícola Panamericana, en Zamorano – Honduras. (Pág. 9,10,23,24). <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5979/1/AGI-2017-010.pdf>
- López Chén, J.D., (2014). Evaluación del contenido proteico y descripción microbiológica de la harina de lombriz coqueta rosa (*Eisenia foetida*), alimentada con 3 distintos sustratos. De Universidad de San Carlos de Guatemala. En Guatemala. (Pág. 23,28,31). <http://www.repositorio.usac.edu.gt/1591/1/Tesis%20Lic%20Zoot%20Jose%20Daniel%20Lopez%20Chen.pdf>
- López-Jácome, L.E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C.A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, S., Franco-Cendejas, R., (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. De revista: Investigación en Discapacidad. (Vol.3., No.1). (Pág.10-18). <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
- Loza Murguía M., Mamani, F., Sainz, H., (2011). Efecto de la Lombriz Roja Californiana (*Eisenia foetida*) durante el composteo y vermicomposteo en predios de la Estación Experimental de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa. De SciELO, en La Paz-Bolivia. (Pág.25-26). <https://www.redalyc.org/pdf/3613/361333624004.pdf>
- Marcano L., León A., Arrieche D., Zapata E., (2018). Toxicidad del cadmio en celomocitos de la lombriz de tierra *Eisenia sp.*: Ensayo in vitro. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, en Cumaná-Venezuela. (Vol.52, No. 2) (Pág. 91,96). <file:///C:/Users/acer/Downloads/30006Texto%20del%20art%C3%ADculo-46609-1-10-20191209.pdf>
- Mathur A., Verma S., Bhat R., Singh S., Prakash A., Prasad G., Dua V. (2010). Antimicrobial activity of earthworm extracts. Publicado por Journal of chemical and pharmaceutical research. Vol. 2., Pág. 36. http://www.ensynox.com/wp-content/uploads/2019/02/JCPR_484PUBLISHED.pdf
- Nandeesh M.C., Srikanth G. K., Basavaraja N., Keshavanath P., Varghese T. J., Bano K., Ray A.K., Kale R.D., (2003). Influence of earthworm meal on the growth and flesh quality of common carp. De revista Elsevier-Biological wastes., (Vol.26 Pág. 189-198). En University of Agricultural Sciences, India. [file:///C:/Users/acer/Downloads/0269-7483\(88\)90165-6.pdf](file:///C:/Users/acer/Downloads/0269-7483(88)90165-6.pdf)
- Nitish B., Rajender K., Vikas N., (2018). Antibacterial Effects of *Eisenia foetida*, Earthworm Extract against Pathogenic Bacteria Isolated from *Cyprinus carpio*. De revista international Journal of Current Microbiology and Applied Sciences., En University, Hisar (Haryana), India. (Vol.7 Num.4). (Pág.4-10). <https://www.ijcmas.com/7-4-2018/Nitish%20Bansal,%20et%20al.pdf>
- Olmos F., A., García de la Fuente C., Saéz N., J., Valdezate R., S., (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. De documento científico: Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. En España. (Pág. 4-5). <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO., (2020). S.O.F.I.A., El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Panorama general. (Pág.8). <http://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO., (2017). El uso de los antimicrobianos en la acuicultura en América Latina: Desafíos y perspectivas futuras. En Lima – Perú. <http://www.fao.org/americas/eventos/ver/es/c/1032720/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO., (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. (Pág.10,22) <http://www.fao.org/3/i5555s/i5555s.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO., (2011). Manual Básico de Sanidad Piscícola. Roma. (Pág.6). <https://docplayer.es/10261912-Manual-basico-de-sanidad-piscicola.html>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO., (2002). S.O.F.I.A., El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Residuos de antibióticos en productos de acuicultura, el problema. En Reino Unido, (Pág. 74). <http://www.fao.org/3/y7300s/y7300s00.htm>
- Parra G., Hugo E., y Peña C., Sebastián C., (2015). Diseño y construcción de un liofilizador para el secado de plantas aromáticas. De Universidad Santo Tomás, en Bogotá – Colombia. Disponible en línea. (Pág.19-23) <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2796/Pe%C3%B1asabastian2015.pdf>
- Parrado M., Sales, M., Hernández, G., Ortega, J., Yossa, M., (2014). Variedad bacteriana en cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. De instituto de acuicultura de los Llanos. (238-240). <https://www.redalyc.org/pdf/896/89645828011.pdf>
- Pérez C. Héctor J. y Robles C. Atzin, (2013) Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. De revista médica MD., en Distrito Federal-México. (Vol. 4. No. 2). (Pág. 188-190). <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
- Piñeros-Roldan A. J., Gutiérrez – Espinosa M.C., Castro-Guerrero S.R. (2014). Sustitución total de la harina de pescado, por subproductos avícolas, suplementados con aminoácidos en dietas para juveniles de *Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818. De artículo de Universidad de los Llanos, en Villavicencio, Meta-Colombia. (Vol.18, No.2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012137092014000200002&script=sci_abstract&tlng=es
- Ramírez Nava, J.S., (2006). Liofilización de alimentos. De *ReCiTeLa*, de Universidad del Valle. En Cali-Colombia. (Vol.6 No.2) (Pág.2,8) <https://dokumen.tips/documents/2006-ramirez-navas-liofilizacion-alimentos.html>
- Rivas Santiago B., Sada E., Hernández Pando R., Sutsumi V., (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. De revista SciELO, Salud pública., en Cuernavaca - México. (Vol. 48, No. 1). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000100010

- Robaina R., L., E., (1998). Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para la Dorada *Sparus aurata*. De Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. En Gran Canaria – España. (Pág.9,19). [file:///C:/Users/acer/Downloads/0621418_00000_0000%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/acer/Downloads/0621418_00000_0000%20(1).pdf)
- Rodríguez M., Rodríguez D., Monroy T., Mata J., (2001). Manual de enfermedades de peces en botín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la red de Diagnóstico de UAMX., (Vol.7/Num14). Pag.2.6. En México, Ed., CONAPESCA. <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Enfermedades%20de%20peces/Manual%20de%20Enfermedades%20de%20Peces.pdf>
- Rodríguez López C.M., (2014). Toxicidad de antibióticos utilizados en la acuicultura sobre microalga. De Universidad de Coruña, en España, en la Facultad de Ciencias en el Departamento de Biología Celular y Molecular.(Pág.7) https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/12429/RodriguezLopez_CarlosMaria_TFG_2014.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Rueda G. Miguel F., (2011). Breve historia de una gran desconocida: La acuicultura. De revista Eubacteria: Especial biología marina, de Universidad de Murcia en España, (Vol.2 No. 26) (Pág.1,2) <https://www.um.es/eubacteria/acuicultura.pdf>
- Sánchez J., Correa M., Castañeda-Sandoval, L., (2016). Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. De revista de la Facultad Nacional de la salud pública, en Medellín - Colombia., (Vol.34 No. 2). (Pág. 231,232). <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v34n2/v34n2a12.pdf>
- Sánchez L., (2001). TCA protein precipitation protocol. http://www.its.caltech.edu/~bjorker/TCA_ppt_protocol.pdf
- Somarriba Reyes R., y Guzmán Guillén F., (2004). Guía de lombricultura., De Universidad Nacional Agraria, en Managua - Nicaragua. Guía técnica (No. 4., Pág. 7 - 8.) <https://repositorio.una.edu.ni/2409/1/nf04s693.pdf>
- Téllez G., y Castaño J., (2010). Péptidos antimicrobianos. De Revista Infectio. En Universidad del Quindío, Armenia- Colombia, de Asociación colombiana de infectología., (14(1): Págs. 55-67). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922010000100007
- Trejo D., (2019). Histología sistemática de larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi* y su respuesta ante un evento de vibriosis. En Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). En Baja California – México. (Pág. 50 - 65). https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2813/1/tesis_Trejo_Ramos_Dora_09_ago_2019A.pdf
- Tsai G., Borgues L., Petrosino P., Bianchi G., Medina A., Cova J., (2011). Efectos del uso de la harina de lombriz *Eisenia Spp.*, sobre la respuesta inmune humoral específica y presencia de lesiones intestinales en ratones. De Revista Científica (Vol.21 No.4) (Pag.298-304). De Universidad de Zulia, en Maracaibo Venezuela. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95918727003.pdf>

- Vargas Flores T., y Kuno Vargas A., (2014). Morfología bacteriana. De revista de actualización clínica. (Vol. 49., Pág.,2). De Universidad Mayor de San Andrés, en La Paz -Bolivia. (Pág. 4-5) http://metabase.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Vargas Muñoz D.P., (2015). Efecto de la liofilización sobre propiedades físico-químicas y vida útil de cocona (*solanum sessiliflorum Dunal*) en polvo. De Universidad Nacional de Colombia, en Palmira-Colombia. (Pág. 20,35) <https://core.ac.uk/download/pdf/77276723.pdf>
- Vázquez D. C., Villanueva S. M., Rodríguez G. H., (2011). Fundamentos de acuicultura continental: Principales enfermedades de los peces en cultivo. (Cap. IV., Pág.147-149). De Instituto nacional de pesca y acuicultura, en Bogotá- Colombia. (Pág. 148-50) [file:///C:/Users/acer/Downloads/27470%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/acer/Downloads/27470%20(1).pdf)
- Vasanthi K., Chairman K., Ranjit-Singh A. (2013). Antimicrobial activity of earthworm (*Eudrilus eugeniae*) paste. Publicado por African Journal of Environmental Science and Technology. University Tirunelveli Tamilnadu – India., (Vol.7). (Pág.791-792). <file:///C:/Users/acer/Downloads/antimicrobialpaper.pdf>
- Wang Chong, Sun Zhenjun, Zheng Dongmei, Liu Xuelian., (2011). Function of mucilaginous secretions in the antibacterial immunity system of *Eisenia foetida*. De revista científica Elsevier- Pedobiologia., (Vol.54, Pág., 57-62). En China Agricultural University, en Beijing-China. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031405611000710>
- Wang, X., Wang, X., Zhang, Y., Qu X., Yang S. (2003). An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. Publicado por revista científica Springer. *Biotechnology Letters*. <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1024999206117>
- Wenliang L., Li S., Zhong J., Zhu Z., Liu J., Wang W. (2011). A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm *Pheretima guillelmi*. De revista científica ELSEVIER. Vol. 32, pag. 1146. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21539875/>
- Wenli L., Chong W., Zhenjun S. (2011). Vermipharmaceuticals and active proteins isolated from earthworms. De revista científica Elsevier. Vol.54, Pág.549. https://www.researchgate.net/publication/251492788_Vermipharmaceuticals_and_active_proteins_isolated_from_earthworms
- ZhenJun, S., (2005). Ecological implications of minilivestock: Nutritive value of earthworms.: potential of insects, rodents, frogs and snails. De Science Publishers Inc., College of resources and Environmental sciences. In agricultural University, In Beijing, China. (Pág. 491- 505). <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=-2O1DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Ecological+implications+of+minilivestock:+Nutritive+value+of+earthworms.:+potential+of+insects,+rodents,+frogs+and+snails.&ots=MsWzHX5W4u&sig=wIWpD75TrWqzVly1PRB1Ic7VSZw#v=onepage&q=Ecological%20implications%20of%20minilivestock%3A%20Nutritive%20value%20of%20earthworms.%3A%20potential%20of%20insects%2C%20rodents%2C%20frogs%20and%20snails.&f=false>

10 Anexos

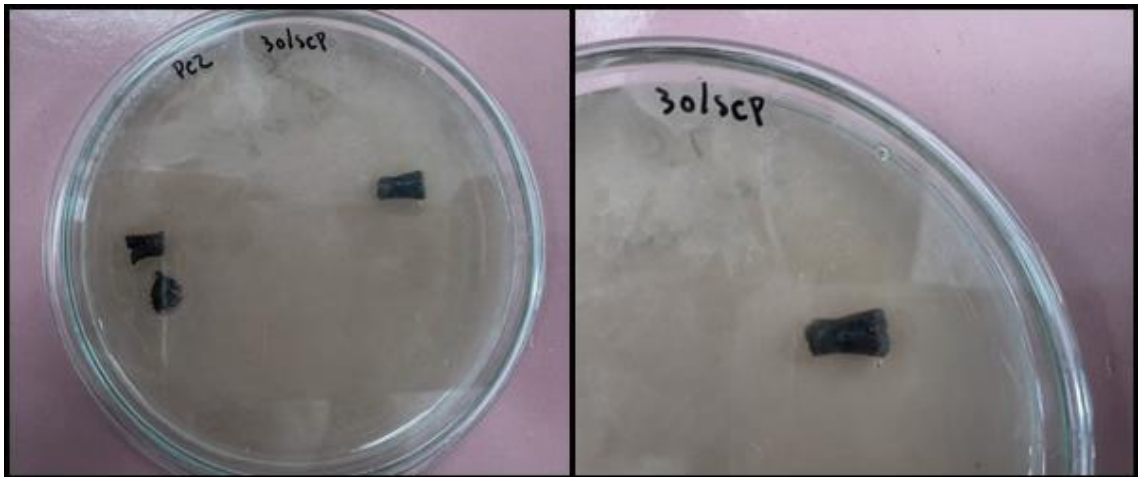


Figura 20. Antibiograma con dieta a base de harina de pescado sin inhibición antibacteriana.

Tabla 4. Prueba T-Student por grupos independientes, donde se observa una diferencia significativa en el efecto antibacteriano que causa la harina de lombriz por diferentes métodos de secado (liofilización y estufa)

Grupos	Promedio	P < 0.05
Harina de lombriz secada por liofilización	3.00 ± 0.30	0.004135
Harina de lombriz secada en estufa	1.66 ± 0.25	

Tabla 4. Prueba T-Student por grupos independientes, donde no se observa una diferencia significativa en el efecto antibacteriano que causa la dieta a base de harina de lombriz liofilizada contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Grupos	Promedio	P > 0.05
Gram negativas	4.10 ± 0.20	0.080800
Gram positivas	3.80 ± 0.10	