



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y  
CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
INGENIERÍA PESQUERA

TESIS DE PREGRADO

**Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano  
(*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp.  
resistentes a antibióticos, aislados de *Litopenaeus*  
*vannamei***

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Bach. Luis Esteban Aguirre Chanta

TUMBES, PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y  
CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
INGENIERÍA PESQUERA

TESIS DE PREGRADO

**Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano  
(*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp.  
resistentes a antibióticos, aislados de *Litopenaeus*  
*vannamei***

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Bach. Luis Esteban Aguirre Chanta

TUMBES, PERÚ

2019

## RESPONSABLES

Bach. LUIS ESTEBAN AGUIRRE CHANTA

---

EJECUTOR

Mg. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

---

ASESOR

## **JURADO DICTAMINADOR**

Dr. ADAN ALVARADO BERNUY

---

**PRESIDENTE**

Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA

---

**SECRETARIO**

Dr. TEODORO E. SEMINARIO CHIRINOS

---

**VOCAL**

## AGRADECIMIENTO

Expreso mí profundo reconocimiento a las personas que hicieron posible esta investigación, en calidad de asesor y miembros del jurado. Todos y cada uno de ellos dedicaron su tiempo contribuyendo de esta manera con sus aportes al enriquecimiento de la presente investigación.

Mi sincero agradecimiento a:

- ❖ La Universidad Nacional de Tumbes y a todos los docentes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, quienes compartieron conmigo sus conocimientos, valores y experiencias durante el trayecto de nuestra formación profesional.
- ❖ A mi asesor Mg. Alberto Ordinola Zapata, le agradezco su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto, amistad y valiosas sugerencias fundamentales para la concreción de este trabajo.
- ❖ A los señores miembros del jurado: Dr. Adán Alvarado Bernuy, Dr. Leocadio Malca Acuña y Dr. Teodoro E. Seminario Chirinos, por sus oportunos aportes y correcciones para mejorar la presente tesis.
- ❖ Así mismo agradezco a mis amigos por su constante apoyo y aliento en mi formación profesional.

## DEDICATORIA

En primer lugar, doy gracias a Dios por ser quien guía mi camino con bien y sabiduría enseñándome nuevas lecciones de vida cada día, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres, Esly Yaseli Chanta Infante y Joseluis Aguirre Hidalgo, por darme la educación y enseñarme a ser un hombre de bien, diferenciando lo bueno y lo malo, por brindarme su confianza y amor incondicional.

A mis hermanas María y Valentina Aguirre Chanta, que son mi razón para seguir adelante, también a mi enamorada y amigos por apoyarme a pesar de las adversidades a las que me enfrenté en el transcurso de mi carrera profesional.

## INDICE

	Pág.
Resumen .....	xi
Abstract.....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	14
II. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Problemas de enfermedades y uso de antibioticos .....	15
2.2. Problema de enfermedades en el cultivo de langostinos.....	15
2.3. Bacterias del género <i>Vibrio</i> .....	16
2.4. Antibióticos usados en el tratamiento de la vibriosis.....	17
2.5. Resistencia antibacteriana de <i>Vibrio</i> .....	18
2.6. Uso de plantas medicinales para el tratamiento de vibriosis en langostino .....	19
2.7. Neem ( <i>Azadirachta indica</i> ).....	20
2.8. Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) .....	20
2.9. Investigaciones sobre el uso de neem y orégano en enfermedades en acuicultura.....	21
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
3.1. Material y equipo .....	24
3.2. Métodos .....	25
3.2.1. Acondicionamiento del local .....	25
3.2.2. Obtención de ejemplares de <i>Litopenaeus vannamei</i> con signos de vibriosis.....	26
3.2.3. Aislamiento y selección de <i>Vibrio</i> spp. ....	26
3.2.4. Selección de cepas resistentes a antibióticos .....	27
3.2.5. Preparación de los extractos de neem y orégano .....	29
3.2.6. Ensayo de sensibilidad de las cepas resistentes a los extractos de neem y orégano .....	29
3.2.7. Análisis estadístico .....	30
IV. RESULTADOS.....	32
4.1. Características externas de los langostinos .....	32
4.2. Características de las colonias de <i>Vibrio</i> spp. aisladas de langostino .....	33

4.3.	Diámetro de los halos de inhibición en antibiogramas de <i>Vibrio</i> spp.....	34
4.4.	Sensibilidad antibiótica de las cepas de <i>Vibrio</i> spp. ....	37
4.5.	Diámetro de los halos de inhibición de extracto de neem en <i>Vibrio</i> spp. ....	41
4.6.	Diámetro de los halos de inhibición de extracto de orégano en <i>Vibrio</i> spp. ....	45
V.	DISCUSIÓN .....	47
VI.	CONCLUSIONES .....	50
VII.	RECOMENDACIONES .....	51
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Antibióticos a utilizar en el ensayo de resistencia a antibióticos .....	28
Tabla 2. Puntos de corte para la determinación de la sensibilidad a antibióticos en <i>Vibrio</i> spp. ....	28
Tabla 3. Peso y características externas de los langostinos recolectados en camaronera de Ecuador .....	32
Tabla 4. Características de las colonias de cada cepa cultivadas en medio TCBS.....	33
Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición (mm) a antibióticos de las cepas aisladas. ....	35
Tabla 6. Sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas.....	37
Tabla 7. Porcentaje de cepas de <i>Vibrio</i> spp. con diferentes niveles de sensibilidad a antibióticos.....	39
Tabla 8. Cepas de <i>Vibrio</i> spp. según resistencia a las familias de antibióticos ensayadas.....	40
Tabla 9. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto acuoso de hojas de neem en cepas de <i>Vibrio</i> spp. ....	42
Tabla 10. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto alcohólico de hojas de neem en cepas de <i>Vibrio</i> spp .....	43
Tabla 11. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto de hojas de neem (obtenido con soxhlet y rotaevaporador) en cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	44
Tabla 12. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto de hojas de orégano (obtenido con soxhlet y rotaevaporador) en cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación del lugar de ejecución de la tesis.....	25
Figura 2. Fotografía de colonias de cepas de <i>Vibrio</i> spp. (cepa HP6-V) en medio TCBS .....	34
Figura 3. Fotografía de halos de inhibición de antibióticos en una de las cepas aisladas (cepa L4 A1) .....	36
Figura 4. Resistencia de cepas de <i>Vibrio</i> spp. a diferentes antibióticos.....	38
Figura 5. Porcentaje de cepas de <i>Vibrio</i> spp. con diferentes niveles de sensibilidad a antibióticos.....	39
Figura 6. Cepas de <i>Vibrio</i> spp. según resistencia a las familias de antibióticos ensayadas .....	41
Figura 7. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de <i>Vibrio</i> spp. en el ensayo del extracto acuoso de hojas de neem.....	42
Figura 8. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de <i>Vibrio</i> spp. en el ensayo del extracto alcohólico de hojas de neem.....	43
Figura 9. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de <i>Vibrio</i> spp. en el ensayo del extracto de hojas de neem (obtenido con soxhlet y rotaevaporador) .....	44
Figura 10. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de <i>Vibrio</i> spp. en el ensayo del extracto de hojas de orégano (obtenido con soxhlet y rotaevaporador) .....	46

**Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos, aislados de *Litopenaeus vannamei*.**

Bach. Luis Esteban Aguirre Chanta<sup>1</sup>  
Mg. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

**RESUMEN**

Esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto *in vitro* de extractos de hojas de neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei*. Para ello se recolectó 14 ejemplares de *L. vannamei* de estanques con problemas de vibriosis que no respondieron al tratamiento con oxitetraciclina en una camaronera de Santa Rosa (Ecuador); de estos ejemplares se obtuvieron 14 cepas de *Vibrio* spp., adicionalmente se obtuvo por donación 14 cepas más. Se evaluó la resistencia antibiótica de las 28 cepas contra 10 antibióticos de uso veterinario o de medicina humana, posteriormente se realizó ensayo *in vitro* de los extractos de neem y orégano contra cuatro de las cepas de *Vibrio* spp. Los resultados mostraron que el 100 % de las cepas de *Vibrio* spp. mostraron resistencia al menos a uno de los antibióticos ensayados, con 50 % de las mismas resistentes a oxitetraciclina, así también 64,3 % de ellas mostraron ser multiresistentes. Adicionalmente se observó que los extractos acuosos y alcohólicos de neem y orégano no inhibieron a *Vibrio* spp., sin embargo los extractos obtenidos con equipo soxhlet y rotaevaporador mostraron mejores resultados, el correspondiente a neem fue capaz de inhibir a una de las cuatro cepas contra la que fue ensayado, mientras que el correspondiente a orégano pudo inhibir a las cuatro cepas contra las que fue probado.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, *Origanum vulgare*, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio*, resistencia a antibióticos.

---

<sup>1</sup> Estudiante de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

<sup>2</sup> Profesor de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

**Effect of neem (*Azadirachta indica*) and oregano (*Origanum vulgare*) on the growth of *Vibrio* spp. resistant to antibiotics, isolated from *Litopenaeus vannamei*.**

Bach. Luis Esteban Aguirre Chanta<sup>1</sup>  
Mg. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

The research aim was to determine *in vitro* effect of leaf extracts of neem (*Azadirachta indica*) and oregano (*Origanum vulgare*) on the growth of *Vibrio* spp. isolated from *Litopenaeus vannamei*. Fourteen *L. vannamei* specimens were collected from ponds with vibriosis diseases that did not respond to treatment with oxytetracycline in a shrimp farm in Santa Rosa (Ecuador); of these specimens, 14 *Vibrio* spp. strains were obtained, and 14 additional strains were obtained by donation. The antibiotic resistance of the 28 strains was evaluated against 10 antibiotics for veterinary or human medicine use, later *in vitro* testing of neem and oregano extracts was carried out against four strains of *Vibrio* spp. The results showed that 100% of the strains of *Vibrio* spp. showed resistance to at least one of the antibiotics tested, with 50% of them resistant to oxytetracycline, and 64.3% of them showed to be multiresistant. Additionally, it was observed that aqueous and alcoholic extracts of neem and oregano did not inhibit *Vibrio* spp., however the extracts obtained with soxhlet and rotaevaporator equipment showed better results, the one corresponding to neem was able to inhibit one of the four strains against the which was tested, while the one corresponding to oregano could inhibit the four strains against which it was tested.

**Keywords:** *Azadirachta indica*, *Origanum vulgare*, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio*, antibiotic resistance

---

<sup>1</sup> Student of the School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes

<sup>2</sup> Principal Professor of the School of Fisheries Engineering, National University of Tumbes

Thesis presented to obtain the professional title of Fisheries Engineer

National University of Tumbes

Engineering Faculty of Fisheries and Marine Sciences

Academic Professional School of Fisheries Engineering

Calle Los Ceibos S / N Puerto Pizarro, Tumbes, Perú

Email: leach\_capri\_23@hotmail.com

2019

## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en la época actual, se ha convertido en una prospera actividad humana que brinda alimento a la humanidad, solucionando en parte la necesidad de alimento en el planeta. Según la FAO (2016), en el año 2014, la acuicultura ha producido 73,8 millones de toneladas entre peces, moluscos, crustáceos, algas, entre otros, esta producción se valorizó en US \$ 160 200 millones.

La principal amenaza de la acuicultura a nivel mundial son las enfermedades de los organismos en el cultivo, se estima que la pérdida por enfermedades en 2014 ascendió a US \$ 6000 millones, en el caso de la acuicultura de langostinos las pérdidas por enfermedades son muy fuertes llegando a US \$ 800 millones anuales (Banco Mundial 2014).

Gran parte de las pérdidas económicas en el cultivo de langostino se deben a enfermedades producidas por bacterias, principalmente *Vibrio* spp., entre dichas enfermedades se tiene: vibriosis, síndrome la gaviota, enfermedad de astillas negras o la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) también denominada síndrome de mortalidad temprana (EMS) (Cuellar 2013).

Para el tratamiento de estas es común el uso de antibióticos, principalmente oxitetraciclina, enrofloxacina, florfenicol y en menor grado norfloxacina y clorafenicol (Bermudez et al. 2014; Santiago, Espinoza y Bermudez 2009; Sun et al. 2013) Los cuales muchas veces se usan de manera inadecuada, como profiláctico, sin hacer los análisis necesarios y aplicándose en dosis inadecuadas, todo ello conlleva a originar resistencia bacteriana. (Muñoz 2015; Sotomayor y Balcázar 2003; Stalin and Srinivasan 2016).

Esta resistencia bacteriana está siendo cada vez más común en los cultivos de langostino, esta problemática también se presenta en Tumbes y Ecuador; pues cada vez hay más reportes sobre casos de vibriosis en langostinos que requieren dosis cada vez mayores de antibióticos (oxitetraciclina, enrofloxacina) para ser

tratadas o incluso de bacterias *Vibrio* spp. que se muestran completamente resistentes a ciertos antibióticos.

Una alternativa a esta problemática de resistencia bacteriana, podría ser la utilización de nuevos antibióticos, sin embargo, muchos de ellos están prohibidos para el uso veterinario, siendo exclusivos para humanos (Dos Santos 2015).

Una mejor solución es el uso de plantas medicinales que tienen probada actividad antibacteriana como es el neem (*Azadirachta indica*) y el orégano (*Origanum vulgare*), que son habitualmente utilizados en medicina humana y veterinaria, y que también se ha ensayado en peces (Talpur and Ikhwanuddin 2013; Thanigaivel et al. 2015) e incluso en el langostino *Litopenaeus vannamei* (Banerjee. et al. 2013) con buenos resultados.

La presente investigación tuvo como objetivo, determinar el efecto del neem (*Azadirachta indica*) y el orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos, obtenidos de *Litopenaeus vannamei*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Problemas de enfermedades y uso de antibióticos en acuicultura

La principal limitante para el desarrollo de los cultivos acuícolas y la producción son las enfermedades originadas por virus, bacterias, hongos, parásitos y otros patógenos emergentes. Los incrementos de las enfermedades en los cultivos se deben a variados factores como son la globalización de la comercialización de reproductores, larvas y alevines para los cultivos, el incremento en el comercio de peces ornamentales, el mal uso de ejemplares libres de patógenos específicos (SPF), la interacción negativa entre poblaciones silvestres y cultivadas, las poco efectivas medidas de bioseguridad implementadas, el cambio climático entre otros (Bondad-Reantaso et al. 2005).

En la acuicultura, se ha generalizado el uso de antibióticos para controlar enfermedades. Desde el inicio de la era de los antibióticos, se han desarrollado más de 100 de ellos, de los cuales al menos 51 son usados en la acuicultura y la agricultura, 39 de los cuales son de importancia en medicina humana. Sin embargo, en la acuicultura y agricultura los antibióticos son usados aparte de como tratamientos en enfermedades bacterianas, en otras formas inadecuadas para la prevención de enfermedades, así como promotores de crecimiento. También es común la aplicación indiscriminada de antibióticos, así por ejemplo en el año 2003, en la acuicultura de salmones en Chile se aplicó 0,5 kg de antibióticos por cada kilogramo de salmón producido, lo que muestra la magnitud del problema (Done, Venkatesan and Halden 2015).

### 2.2. Problema de enfermedades en el cultivo de langostinos.

En la producción del langostino tanto a nivel de poslarvas como engorde se presentan graves enfermedades originadas por virus y bacterias, si bien los virus del síndrome de Taura (TSV), virus de la mancha blanca (WSSV) y virus de la cabeza amarilla (YHV) han sido causas de fuertes pérdidas hace algunos años, en la actualidad son las bacterias del género *Vibrio* las que causan fuertes mortalidades y pérdidas económicas en el cultivo (Campoverde 2015; Santiago, Espinosa y Bermúdez 2009).

### 2.3. Bacterias del género *Vibrio*

Los vibrios, pertenecen a la familia Vibrionaceae; ésta incluye a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium* (Serrano 2014); de ellas, en la actualidad, el género *Vibrio* comprende hasta 100 especies reconocidas, 12 de las cuales son patógenas para el ser humano; también incluye a los principales patógenos bacterianos para la acuicultura como son: *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. fischeri* (Silvester et al. 2017), que también son patógenos de langostinos a los cuales se suma *V. parahaemolyticus*, el principal agente patógeno en los cultivos de langostinos en la actualidad, debido a ser el agente causal del síndrome de mortalidad temprana (EMS) también llamado enfermedad de la hepatopancreatitis necrotizante aguda (AHPND) (Williams et al. 2017).

*Vibrio* spp. son bacilos gram-negativos, no formadores de esporas con una longitud de 1,4 a 2,6 µm. Son mayormente oxidasas positivas, con forma recta o curva (forma de coma). En medio de cultivo, se observan como varillas rectas. Presentan un solo flagelo polar monotrico (multitrico cuando crece en medio líquido), son aeróbicos o anaeróbicos facultativos. Las especies halofílicas requieren NaCl para crecer (entre 0,029 y 4,1 %). Muchas especies producen oxidasa y catalasa y fermentan la glucosa sin producir gas, además reducen el nitrato a nitrito (Silva et al. 2008; Serrano 2014).

Las bacterias del género *Vibrio* patógenas para el langostino producen diversas enfermedades algunas son mencionadas por Morales-Covarrubias (2008): a) vibriosis sistémica o síndrome de la gaviota que origina mortalidades de hasta el 90 %; b) erosión bacteriana del caparazón, que se observa como manchas marrones o negras en caparazón; c) síndrome de la zoea II, frecuente en larvicultura, originada por *V. harveyi* y caracterizada por presencia de bolitas en intestino; d) enfermedad de la luminiscencia, originada por *V. harveyi* y caracterizada por luminiscencia en apéndices. A esta se suma, e) la AHPND, que ha originado fuertes pérdidas en la producción y es originada por una cepa de *V. parahaemolyticus* infectada por un plásmido (Joshi et al. 2014).



La vibriosis puede conducir a altas mortalidades de hasta 90 %, en poslarvas y juveniles tempranos. Los langostinos moribundos son encontrados en la superficie y nadando en las orillas de los estanques, con presencia de aves alimentándose de ellos. Cuando la enfermedad se encuentra en fase inicial se observan algunos organismos con opacidad muscular y tracto digestivo vacío y en la fase grave es posible observar organismos con expansión de los cromatóforos, hepatopáncreas inflamado y en algunos langostinos luminiscencia (Morales-Covarrubias 2008).

También algunos ejemplares pueden presentar manchas marrones o negras en el exoesqueleto y heridas, las que permiten el ingreso de *Vibrio* al interior del tejido (Campoverde 2015).

#### **2.4. Antibióticos usados en el tratamiento de la vibriosis.**

Según Roque et al. (2001), los antibióticos en el alimento son usados comúnmente para tratar a la vibriosis, mencionando que en México, los antibióticos más usados son oxitetraciclina, florfenicol, ormetoprim-sulphamethoxazol, sarafloxacina y enrofloxacina. Sin embargo, son más utilizadas enrofloxacina (ENRO), florfenicol (FFC) y oxitetraciclina (OTC), siendo este último el que se usa más frecuentemente (Bermúdez et al. 2014).

Las vibriosis han sido tratadas con resultados variables con florfenicol (250 a 300 ppm) y enrofloxacina (200 a 300 ppm), en alimentos peletizado suministrado cada 8 horas durante 10 días (Cuellar 2013).

Los antibióticos más usados son: la oxitetraciclina, que es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, conocida también como terramicina; actúa como todas las tetraciclinas inhibiendo el ribosoma bacteriano e impidiendo la síntesis de proteínas en la bacteria. A bajas concentraciones es bacteriostático pero a elevadas dosis es bactericida, sin embargo tales dosis elevadas influyen negativamente en el desarrollo de *L. vannamei* (Sosa, Escobar y Faure 2013).

La enrofloxacina, es un antibiótico de amplio espectro del grupo de las quinolonas que es usada exclusivamente en veterinaria, la enrofloxacina actúa inhibiendo la

enzima DNA-girasa y por ende evitando la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA) de las bacterias uniendo un efecto bactericida (Santiago, Espinosa y Bermúdez 2009).

El florfenicol, es un antibiótico de amplio espectro que actúa inhibiendo a la enzima peptidiltransferasa con lo que se evita la síntesis de proteínas. La inhibición es reversible, por lo que el florfenicol actúa como un bacteriostático. Posee una estructura química muy similar a la del cloranfenicol y es efectivo en bacterias que han desarrollado la habilidad de inactivar otras drogas incluyendo tiamfenicol y cloranfenicol (Santiago, Espinosa y Bermúdez 2009).

## **2.5. Resistencia antibacteriana de Vibrio**

La aparición de resistencia antimicrobiana en cepas bacterianas está directamente relacionada al uso de antibióticos. El uso indiscriminado que se hace de ellos conduce a la resistencia (Banerjee et al. 2013),

La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación; esto reduce las opciones terapéuticas, lo que repercute directamente en el éxito de la terapia antimicrobiana para combatir las infecciones secundarias producidas por estos patógenos, además de provocar elevados índices de morbilidad y mortalidad (Garza, Silva y Martínez 2009).

El problema de la resistencia se agudiza cuando las bacterias adquieren resistencia a diversas familias de antibióticos, lo que genera la multiresistencia; según Magiorakos et al. (2012), una cepa bacteriana se denomina multiresistente cuando adquiere resistencia al menos a un producto en tres familias de antibióticos.

La resistencia a los antibióticos se da por diferentes mecanismos: 1) Modificación química o hidrólisis del antibiótico mediante la adenilación, acetilación, fosforilación o hidrólisis. 2) Modificación del sitio blanco de la bacteria debido a mutaciones espontáneas en los genes que codifican al blanco del antibiótico, 3)

Modificaciones de la permeabilidad de la membrana externa, que impide la entrada del antibiótico. 4) expulsión del antibiótico debido a la sobreproducción de bombas de flujo que impiden el acceso del antibiótico al sitio blanco en la bacteria (Garza, Silva y Martínez 2009).

La resistencia a los antibióticos se ha evaluado mediante las técnicas de: 1) la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo o agar, y 2) la difusión en disco, existen, además, algunas técnicas basadas en gradientes de concentración antibiótica, tales como el E test y la técnica de espiral (Crespo 2005).

## **2.6. Uso de plantas medicinales para el tratamiento de vibriosis en langostino.**

Una planta medicinal es la que contienen metabolitos que pueden ser usados como medicamentos o bien servir para la síntesis de fármacos. Los metabolitos son sustancias bio-activas como alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, terpenoides, simarubalidanos, melicianinas, limonoides, lactosas y lignanos entre otros, cuyo contenido depende tanto de factores propios de la planta como de las condiciones climáticas, las características de los suelos, la edad de la planta y la época de recolección, así como del método de extracción de dichos principios (Prieto et al. 2005).

La camaronicultura también se ha visto beneficiada con el uso de plantas medicinales, así se ha usado el palo maría, resina de maría o de tacamara (*Callophyllum inphyllum*, *Clinacanthus nutans* y *Tinospora cripta*), la grosella, cerezo occidental o manzana lora (*Phyllanthus acidus*) y la albahaca morada (*Ocimum sanctum*), que han mostrado efectos viricidas contra el virus de la cabeza amarilla del langostino (Prieto et al. 2005).

También se ha ensayado el extracto de hojas del té verde japonés contra enfermedades diarreicas producidas por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *Campylobacter jejuni* y *Plesiomonas shigelloides* (Alarcón 2002).

Algunos estudios muestran el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de plantas como: *Melissa officinalis* (bálsamo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Hyssopus officinalis* (hisopo), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavanda), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis* (sage) y *Thymus vulgaris* (tomillo) mostrándose como una alternativa al uso de antibióticos en el cultivo de langostino (Campoverde 2015).

Dos de las plantas con mejores probabilidades de usarse como reemplazo de los antibióticos en la acuicultura del langostino son el neem y el orégano.

### **2.7. Neem (*Azadirachta indica*)**

El árbol de neem produce azadiractina que se concentra en las semillas de los frutos inmaduros y puede ser extraído fácilmente con solventes orgánicos (Villamil, Naranjo y Van Strahlen 2012).

La azadiractina es destruida por los rayos ultravioletas, por lo que se debe proteger de la luz del sol. Los estudios han demostrado que el neem posee acción antipirética, anti-inflamatoria, diurético, antiséptica, antibacteriana, anti-diabética, antifúngica y antitumoral (Al Akeel et al. 2015).

En el neem se presentan compuestos antimicrobianos como azadiractina, salinnina y meliantriol que tienen también propiedad insecticida, el aceite extraído de la corteza, la semilla y las hojas. La nano-emulsión del aceite del neem es efectiva en el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en peces de agua dulce (Ávalos 2014; Ali et al. 2016).

### **2.8. Orégano (*Origanum vulgare*)**

En el aceite de orégano se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *O. vulgare* se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico y r-hidroxibenzóico (Delgado 2010).

Contiene aceite esencial, cuya composición puede variar según su procedencia. Generalmente contiene fenoles (timol y carvacrol); hidrocarburos monoterpénicos. El orégano procedente del centro de Europa, produce un aceite esencial pobre, o incluso privado de fenoles. También se puede encontrar ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico y clorogénico), taninos, se considera espasmolítica, digestiva, carminativa, aperitiva, colerético, expectorante, antiséptica de las vías respiratorias, diurética, tónica. En uso externo es cicatrizante, analgésica, antiséptica y antifúngica. Al aceite esencial también se le atribuye una acción antioxidante principios amargos, flavonoides (Muñoz 2002).

Los aceites esenciales de orégano poseen efecto antimicrobiano frente a determinadas bacterias Gram positivas y Gram negativas, dicha acción se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. El orégano tiene capacidad antioxidante y antimicrobiana contra muchos microorganismos patógenos dentro de los cuales se encuentra *Salmonella typhinurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Se observó que el timol y el carvacrol poseen alta capacidad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y, en particular, sobre las Gram negativas al actuar como desintegradores de la pared celular externa e inhibir su crecimiento (Campoverde 2015).

## **2.9. Investigaciones sobre el uso de neem y orégano en enfermedades en acuicultura**

Los trabajos sobre el uso de neem y orégano en tratamiento de enfermedades en acuicultura no son muy abundantes, pero se puede mencionar, que existen investigaciones realizadas con langostinos en las que se ha empleado tales plantas medicinales para precisamente el control de *Vibrio* como se mencionan a continuación:

Banerjee. et al. (2013), realizaron una investigación en Malasia, para evaluar el efecto del extracto de hojas de neem en *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* aislados de langostinos cultivados. Para ello obtuvieron un extracto

acuoso y jugo de hojas de neem, en el segundo de los cuales obtuvieron concentración mínima inhibitoria (MIC) para *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* de 3,13 % y 6,25 % respectivamente, con concentración bactericida mínima (MBC) de 12,50 % y 25 % respectivamente. Concluyendo que el jugo de neem es un agente antibacterial útil para inhibir *Vibrio* en langostinos.

Morales-Covarrubias et al. (2016), realizaron una investigación con el objetivo de determinar la efectividad de los extractos acuosos de neem, orégano y plata coloidal contra *V. parahaemolyticus* aislados de *L. vannamei* cultivado en aguas de baja salinidad (5 ‰). Los resultados mostraron que los extractos de orégano y neem presentaron una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 62,50 mg/ml y halos de inhibición de 12,0 a 19,0 mm. Mientras que la plata coloidal tuvo MIC de 2 mg/ml, y los halos estuvieron entre 11,8 y 18,8 mm. Esto mostró la efectividad de los extractos de orégano y neem como antimicrobiano.

Gracia-Valenzuela et al. (2014), realizaron una investigación para evaluar el efecto de la aplicación dietaria de aceite esencial de orégano en langostinos *L. vannamei* infectados experimentalmente al inocular el agua de cultivo con  $10^6$  UFC/ml de *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*, al finalizar el experimento, se determinó la concentración de *Vibrio* en el músculo de los langostinos, encontrando que en el grupo testigo, que no recibió en su dieta el aceite de orégano, la cantidad de bacterias se incrementó en  $10^6$  mientras que en los grupos experimentales que recibieron el aceite de orégano la cantidad de bacterias se redujo, por lo que concluyeron que la suplementación dietaria con aceite de orégano proveyó efecto antibacteriano *in vivo* en los langostinos.

La investigación realizada por Campoverde (2015) para evaluar el efecto de dos plantas medicinales: hierba luisa (*Aloysia triphilla*) y orégano (*Origanum vulgare*) en *Vibrio* sp. del agua de los estanques langostineros, para lo cual realizó una infusión (120 gramos de planta en 120 ml de agua hirviendo) y se dejó enfriar por 1 hora; se utilizó 21 acuarios con una capacidad de 2 l. Aplicó diferentes dosis del extracto (6, 8, 10 ml) cada una con tres repeticiones, y se analizó en diferentes horas (12, 24, 48); transcurrido el tiempo de actuación de los extractos se tomó

10 µl y se sembró en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), se dejó incubar por 24 horas para el conteo final de las unidades formadoras de colonias UFC. Mostrando que el orégano y la hierba luisa tuvieron similares capacidades para inhibir el crecimiento bacteriano.

Adicionalmente se ha encontrado trabajos en los que los extractos de neem han sido utilizados *in vitro* e *in vivo* para controlar *Vibrio* y otras bacterias en peces en cultivo como, por ejemplo:

Talpur and Ikhwanuddin (2013), realizaron una investigación para probar la efectividad de la inclusión de las hojas de neem en la dieta de la lubina (*Lates calcarifer*) en la respuesta inmunitaria y la resistencia frente a la enfermedad originada por *V. harveyi*, ensayaron 5 tratamientos añadiendo 1 a 5 g de hoja de neem por kilogramo de alimento. Los peces alimentados con esta dieta fueron inyectados con *V. harveyi* y se determinaron varios parámetros inmunológicos, así como la supervivencia del pez. Los resultados mostraron que la adición de hoja de neem al alimento mejoró la respuesta inmunológica e incrementó la supervivencia de *L. calcarifer* infectado con *V. harveyi*.

Thanigaivel et al. (2015) realizaron una investigación para evaluar *in vivo* e *in vitro* la actividad de neem contra la bacteria *Citrobacter freundii* (una gram negativa patógena para tilapia), en *Oreochromis mossambicus* infectada naturalmente. Encontrando que el extracto de *A. indica* a una concentración de 150 mg/l fue capaz de inhibir a *C. freundii* *in vivo*. Concluyendo que el extracto de neem fue muy efectivo para controlar la infección por dicha bacteria en tilapia.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material y equipo

##### Material biológico

- 14 ejemplares de *Litopenaeus vannamei*.
- 500 g de hojas de neem (*Azadirachta indica*)
- 500 g de hojas de orégano (*Origanum vulgare*)

##### Materiales de laboratorio

- 70 jeringas de 1 ml
- 1 tubo de estándar Mac Farland 0,5 preparado artesanalmente.
- 500 puntas de micropipeta de 0-10  $\mu$ l
- 500 puntas de micropipeta de 10-100  $\mu$ l
- 200 puntas de micropipeta de 100-1000  $\mu$ l
- 1000 tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- 200 microtubos de centrífuga de 1,5 ml
- 100 placas Petri de 10 cm de diámetro
- 1 cernidor
- 1 balón de gas

##### Equipos

- 1 estuche de disección
- 1 micropipeta de 0-10  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 10-100  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 100-1000  $\mu$ l
- 1 probeta de 100 ml
- 1 matraz de 250 ml
- 1 matraz de 500 ml
- 1 balanza analítica con precisión de 0,0001 g, marca Sartorius modelo TE2145
- 1 autoclave marca All American modelo 25x
- 1 asa de siembra
- 1 mechero
- 1 molino de café



- 1 licuadora marca Binder sin modelo
- 1 refrigeradora marca LG modelo GM – 323QC
- 1 congelador vertical a -18 °C marca Electrolux modelo EFCC10C3HQW
- 1 cocina marca Indurama modelo Cádiz

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Acondicionamiento del local

La investigación se realizó en los Laboratorios de Acuicultura II y Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad de Tumbes (Figura 1).

En ambos laboratorios se acondicionaron zonas asépticas para poder trabajar en la extracción de los tejidos de langostino y el cultivo de *Vibrio* spp.

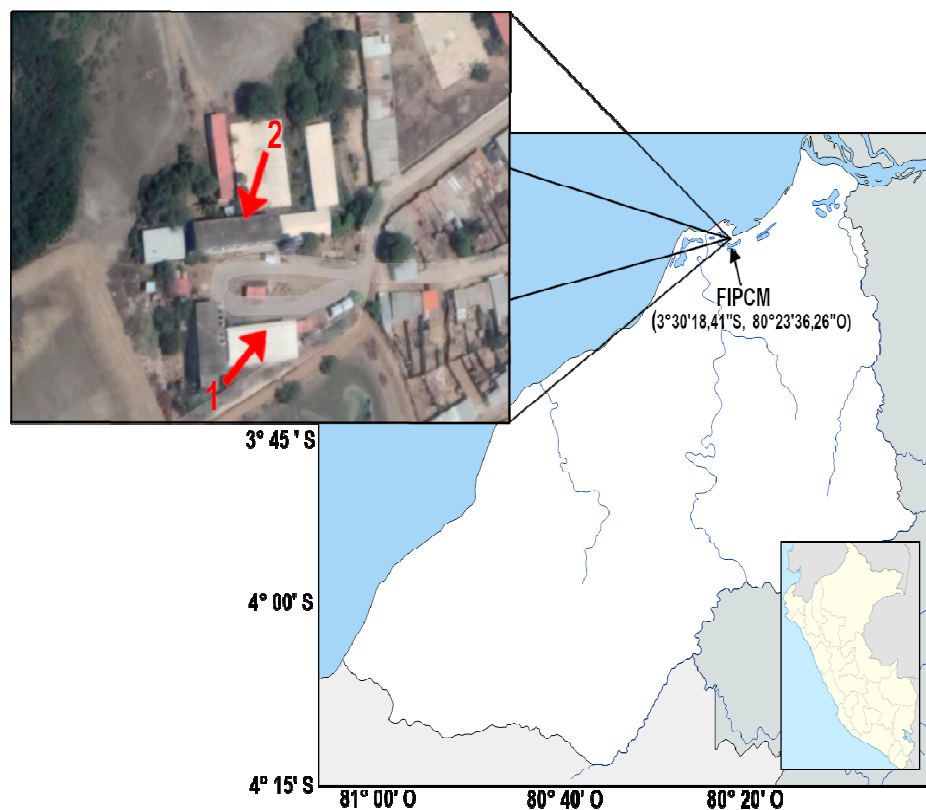


Figura 1. Ubicación del lugar de ejecución de la tesis. 1) Laboratorio de Biología Molecular, 2) Laboratorio de Acuicultura II, ambos en la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES.

### **3.2.2. Obtención de ejemplares de *Litopenaeus vannamei* con signos de vibriosis**

Se obtuvieron 14 ejemplares de *Litopenaeus vannamei*, de una camaronera de Santa Rosa (Ecuador); los ejemplares provinieron de estanques con problemas de vibriosis y que no respondieron adecuadamente a la administración de antibióticos (oxitetraciclina).

Los ejemplares obtenidos fueron trasladados vivos al Laboratorio de Acuicultura II, donde fueron pesados, se observaron sus características externas para luego extraer las muestras necesarias para el aislamiento de *Vibrio* spp.

### **3.2.3. Aislamiento y selección de *Vibrio* spp.**

El método para obtener las muestras de *Vibrio* se basó en la empleada por Roque et al. (2001), con modificaciones y que consistió en:

Se extrajo al menos 0,2 ml de hemolinfa del seno ventral con una jeringa hipodérmica provista de 0,1 ml de solución de citrato de sodio al 10 %. El hepatopáncreas fue extraído en forma aséptica usando pinzas esterilizadas, un fragmento de éste fue pesado, colocado en un microtubo de centrífuga de 1,5 ml y homogenizado con solución salina estéril (2,5 % de NaCl) usando macerador de acero.

Se tomó también muestras de las lesiones externas que presentaron algunos de los ejemplares, para lo cual con una hoja de bisturí se extrajo las lesiones y se transfirieron a un microtubo de centrífuga de 1,5 ml, en el cual fueron triturados con maceradores metálicos y suspendidos en 1 ml de solución fisiológica.

La muestra de hemolinfa, las obtenidas de las lesiones externas y 0,1 ml del sobrenadante del macerado de hepatopáncreas fueron sembrados por separado en placas de agar TCBS con 2,5 % de NaCl.

Luego de 24 h de cultivo a 30 °C, las colonias que crecieron en el medio TCBS fueron caracterizadas (evaluando su coloración, las amarillas que fueron cepas fermentadoras de sucrosa y las verdes que fueron no fermentadoras de sucrosa), de igual manera se evaluó el diámetro, morfología de bordes, elevación y consistencia de superficie de las colonias. Las colonias representativas fueron subcultivadas sucesivamente en agar TSA, hasta obtener cepas puras. Luego las cepas puras fueron colocadas en caldo TSB conservadas en congelación a -18 °C.

Se presentaron problemas en la conservación de las cepas pues algunas de ellas se tornaron no viables luego de la congelación, lo cual se debió al cambio brusco de temperatura que experimentaron cada vez que se abría el congelador en el cual habían sido depositadas, por lo cual se optó por almacenarlas dentro de una caja de tecnopor el cual fue mantenido dentro del congelador, al hacer esto se redujo los casos de cepas no viables.

La recuperación de la cepa se hizo tomando una parte de la cepa congelada, descongelándola y sembrándola en caldo TSB con 2,5 % de NaCl, dejándola incubar toda la noche. La cepa en medio TSB fue sembrada en placas petri con medio TSA e incubada 30 °C por 24 h.

#### **3.2.4. Selección de cepas resistentes a antibióticos**

Para determinar la resistencia de las cepas a diferentes antibióticos, se realizó una prueba de susceptibilidad:

Las cepas fueron cultivadas en TSA suplementado con 2,5 % de NaCl e incubadas a 35 °C toda la noche. Luego de la incubación se ajustó la concentración de la cepa a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml por comparación visual de su turbidez con el de un tubo de 0,5 en la escala de McFarland. Las cepas entonces fueron inoculadas en placas conteniendo agar Müller–Hinton (MH) suplementado con 2,5 % de NaCl, en el cual se colocó los discos antibióticos según la tabla 1:

Tabla 1. Antibióticos a utilizar en el ensayo de resistencia a antibióticos

Grupo	Familia	Antibiótico	Clave	Cantidad por disco (µg)
I. Inhibidores de la pared celular	Penicilinas	Ampicilina	Amp	10
	Fosfonatos	Fosfomicina	Fos	50
II. Inhibidores de la síntesis de proteínas	Fenicoles	Cloranfenicol	Clor	30
		Florfenicol	Flo	25
	Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Otc	30
		Tetraciclina	Tet	30
	Aminoglucósidos	Gentamicina	Gen	10
III. Inhibidores de la síntesis de ADN	Quinolonas	Ácido nalidíxico	Nal	30
		Enrofloxacin	Enro	5
		Norfloxacin	Nor	10

Fuente: Elaboración propia

Se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados por los discos de sensibilidad.

La determinación de la resistencia de las cepas a los antibióticos ensayados se realizó tomando como puntos de corte los que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Puntos de corte para la determinación de la sensibilidad a antibióticos en *Vibrio* spp.

Antibiótico	Concentración (µg)	Punto de corte (mm)			Referencia
		Sensible	Intermedio	Resistente	
Ampicilina	10	≥17	14-16	≤13	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Fosfomicina	50	≥20	17-19	≤16	Seguel (2009)
Cloranfenicol	30	≥18	13-17	≤12	Gómez-Gil (2005)
Florfenicol	30	≥18	13-17	≤12	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Oxitetraciclina	30	≥19	15-18	≤14	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Tetraciclina	30	≥19	15-18	≤14	CLSI (2019)
Gentamicina	10	≥15	13-14	≤12	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Acido nalidixico	30	≥19	14-18	≤13	CLSI (2019)
Enrofloxacin	5	≥21	16-20	≤15	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Norfloxacin	10	≥17	13-16	≤12	CLSI (2019)

Fuente: Elaboración propia (Basado en datos de los documentos citados en la columna referencia)

Se eligieron las cepas que mostraron resistencia a algunos de los antibióticos señalados, las que fueron usadas en los ensayos de sensibilidad frente a extractos de neem y orégano.

### **3.2.5. Preparación de los extractos de neem y orégano**

Las hojas de neem se obtuvieron de un árbol que se halla en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, y las hojas de orégano se obtuvieron de un cultivo doméstico. Estas hojas fueron procesadas en estado fresco o seco (hojas dejadas secar bajo sombra).

En el caso de las hojas frescas, estas fueron molidas en una licuadora, para obtener el jugo de las mismas. Este jugo fue mezclado con agua destilada para obtener diluciones de 25 %, 50 % del jugo de las hojas de neem.

En el caso de las hojas secas, estas fueron molidas en un molino hasta polvo fino. Se tomaron 5 g de las hojas molidas y se sometieron a extracción con 50 ml de alcohol etílico. La extracción se realizó usando dos solventes, por un lado agua hirviendo y por otro alcohol etílico. Se tomó 5 g del polvo de hojas secas y se suspendió en 50 ml de alcohol. También se tomó 5 g de polvo de hojas secas las que fueron colocadas en un matraz con 200 ml de agua hirviendo por 10 min. El sobrenadante fue separado por filtración.

Adicionalmente se realizó extracción de las hojas de neem utilizando equipo soxhlet para luego ser procesado adicionalmente en el rotaevaporador de la Facultad de Ciencias Agrarias, con la finalidad de obtener un extracto mas potente.

### **3.2.6. Ensayo de sensibilidad de las cepas resistentes a los extractos de neem y orégano**

El procedimiento fue similar al indicado en el ítem sobre determinación de resistencia a antibióticos.

Se extrajeron con un perforador de oficina, discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, los mismos que fueron colocados dentro de tubos falcon de 15 ml y esterilizados a una temperatura de 121 °C (presión de 15 psi) por 15 min.

Se prepararon soluciones acuosas y alcohólicas al 100 %, 50 % y 25 % de los extractos de neem y orégano y de estos se realizaron diluciones sucesivas de  $10^0$  hasta  $10^{-3}$ . Se agregaron 20  $\mu$ l de cada disolución a cada círculo de papel filtro. Se prepararon placas petri con medio Muller Hinton en los cuales se sembraron cepas de *Vibrio* spp. (densidad aproximada  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml equivalente a escala 0,5 de McFarland).

En cada placa se colocaron discos de papel filtro impregnado con las diluciones de los extractos vegetales, se colocaron como control negativo el solvente usado en cada dilución (agua o etanol) y como control positivo discos comerciales de 30 mg de oxitetraciclina.

Las placas petri se dejaron incubar por 24 h, luego de lo cual se midió los diámetros de los halos de inhibición.

### **3.2.7. Análisis estadístico**

Los datos de los experimentos de sensibilidad de las cepas de *Vibrio* spp, ante los extractos de neem y orégano fueron procesados como sigue:

Experimento para determinar sensibilidad ante el extracto de hojas de neem:  
En este caso, el experimento se realizó bajo el diseño completamente al azar (DCA), se utilizaron como tratamientos:

T0: Control negativo, sin aplicación de neem, solo se aplicó etanol

T1: Aplicación de extracto de neem dilución  $10^0$

T2: Aplicación de extracto de neem dilución  $10^{-1}$

T3: Aplicación de extracto de neem dilución  $10^{-2}$

T4: Aplicación de extracto de neem dilución  $10^{-3}$

T5: Control negativo, sin aplicación de neem, solo se aplicó agua destilada

T6: Aplicación de extracto de neem dilución 25 %

T7: Aplicación de extracto de neem dilución 50 %

T8: Aplicación de extracto de neem dilución 100 %

T9: Control positivo: con aplicación de un disco comercial de oxitetraciclina.

El experimento contó con cinco repeticiones, siendo cada repetición una placa Petri con agar Müller Hinton y sembrada con la cepa elegida.

Para analizar los resultados se utilizó el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de Duncan ambas con un 5 % de nivel de significancia ( $\alpha = 5 \%$ ).

Experimento para determinar sensibilidad ante el extracto de hojas de orégano:

En este caso, el experimento se realizó bajo el diseño completamente al azar (DCA), se utilizaron como tratamientos:

T0: Control negativo, sin aplicación de orégano, solo se aplicó etanol

T1: Aplicación de extracto de orégano dilución  $10^0$

T2: Aplicación de extracto de orégano dilución  $10^{-1}$

T3: Aplicación de extracto de orégano dilución  $10^{-2}$

T4: Aplicación de extracto de orégano dilución  $10^{-3}$

T5: Control negativo, sin aplicación de orégano, solo se aplicó agua destilada

T6: Aplicación de extracto de orégano dilución 25 %

T7: Aplicación de extracto de orégano dilución 50 %

T8: Aplicación de extracto de orégano dilución 100 %

T9: Control positivo: con aplicación de un disco comercial de oxitetraciclina.

El experimento contó con cinco repeticiones, siendo cada repetición una placa Petri con agar Müller Hinton y sembrada con la cepa elegida.

Para analizar los resultados se utilizaron el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de Duncan ambas con un 5 % de nivel de significancia ( $\alpha = 5 \%$ ).



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Características externas de los langostinos

Los langostinos colectados en una camaronera del Ecuador tuvieron un peso promedio de  $10,6 \pm 2,2$  g, la mayoría de los cuales (71 %) no presentaron lesiones, mientras que en los que si las presentaron generalmente las tuvieron en el abdomen.

Respecto a sus antenas, estas fueron en su mayoría rojas y cortas (79 %) y los urópodos en su mayoría enrojecidos (64 %).

Las características externas en detalle se aprecian en la tabla 3.

Tabla 3. Peso y características externas de los langostinos recolectados en camaronera de Ecuador.

Ejemplar	Peso(g)	Localización de lesiones	Antenas	Urópodos
1	9,6	Sin lesiones	Rojas y cortas	Enrojecidos
2	6,5	Sin lesiones	Rojas y cortas	Enrojecidos
3	7,2	Sin lesiones	Normales	Enrojecidos
4	8,6	Sin lesiones	Normales	Enrojecidos
5	9,1	Sin lesiones	Rojas y cortas	Enrojecidos
6	11,0	En 6to segmento abdominal y cefalotórax	Rojas y cortas	Normales
7	10,8	Sin lesiones	Rojas y cortas	Normales
8	13,3	En 1er segmento abdominal	Rojas y cortas	Enrojecidos
9	12,7	En 1er y 6to segmento abdominal	Rojas y cortas	Normales
10	10,8	En 3er segmento abdominal	Rojas y cortas	Enrojecidos
11	13,6	Sin lesiones	Normales	Normales
12	12,1	Sin lesiones	Rojas y cortas	Enrojecidos
13	11,7	Sin lesiones	Rojas y cortas	Normales
14	11,3	Sin lesiones	Rojas y cortas	Enrojecidos

Fuente: Elaboración propia

#### 4.2. Características de las colonias de *Vibrio* spp. aisladas de langostino

En la tabla 4 se aprecian las características de las colonias de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos, en la que se aprecia que éstas presentaron coloración verde (9 de 14 cepas) o amarilla (5 de 14 cepas) al ser cultivadas en medio TCBS. Las colonias tuvieron diámetros entre 1 a 5 mm y formas circulares o irregulares con bordes enteros u ondulados y superficies lisas o rugosas; además el 100 % de las colonias mostraron una elevación convexa y consistencia cremosa.

Tabla 4. Características de las colonias de cada cepa cultivadas en medio TCBS.

Cepa*	Color	Tamaño (mm)	Forma	Borde	Superficie
HP6-V	Verde	5	Circular	Entera	Lisa
HP2-V	Verde	5	Circular	Entera	Lisa
HP4-V1	Verde	4	Circular	Entera	Lisa
HP4-V4	Verde	2	Irregular	Ondulado	Rugosa
HP3-V1	Verde	3	Circular	Entera	Lisa
L4-A1	Amarilla	5	Irregular	Ondulado	Rugosa
L4-A2	Amarilla	4	Irregular	Ondulado	Rugosa
L4-V3	Verde	1	Irregular	Entera	Rugosa
HP4-V1	Verde	4	Circular	Entera	Lisa
HP4-A2	Amarilla	5	Irregular	Ondulado	Rugosa
HP4-A3	Amarilla	1	Irregular	Ondulado	Rugosa
HP2-A	Amarilla	2	Irregular	Ondulado	Rugosa
HP5-V1	Verde	2	Circular	Entera	Lisa
HP5-V2	Verde	5	Circular	Entera	Lisa

\* El 100 % de las colonias mostraron una elevación convexa y consistencia cremosa.

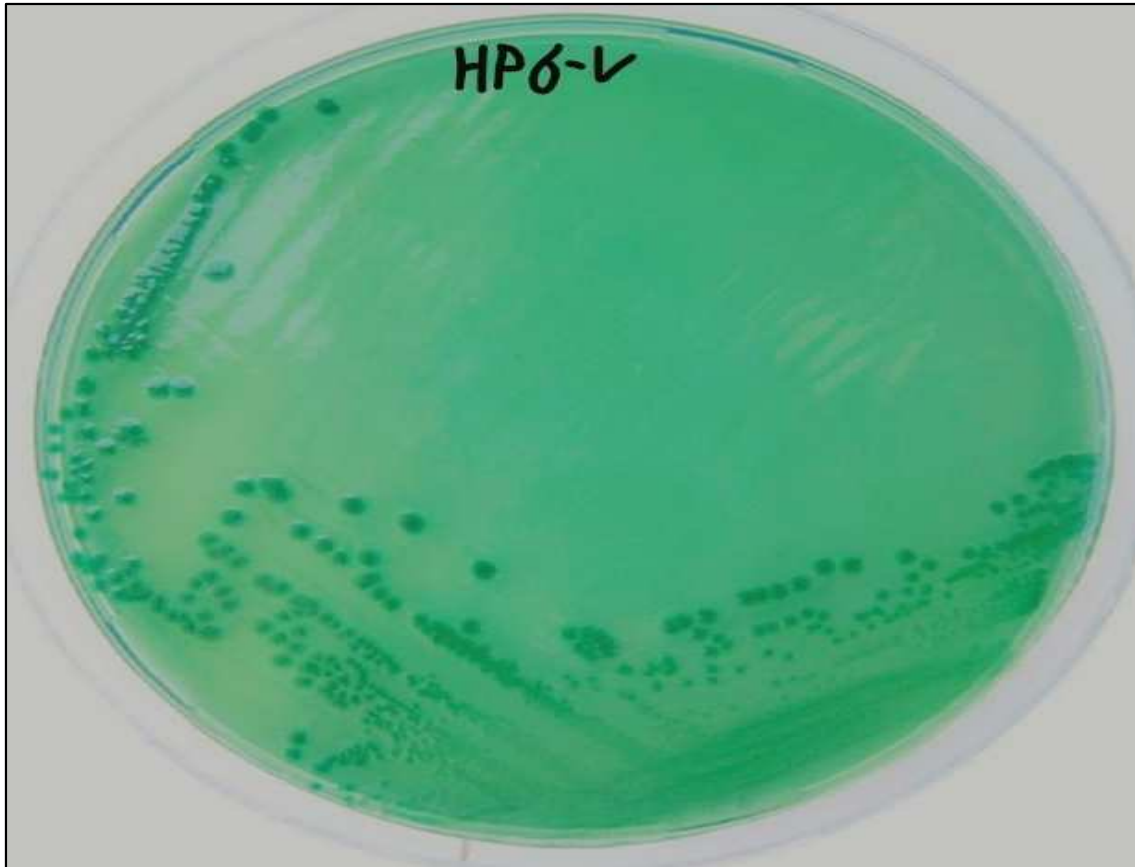


Figura 2. Fotografía de colonias de cepas de *Vibrio* spp. (cepa HP6-V) en medio TCBS

#### **4.3. Diámetro de los halos de inhibición en antibiogramas de *Vibrio* spp.**

En la tabla 5 se observa el diámetro de los halos de inhibición que se obtuvieron en los antibiogramas realizados a las cepas de *Vibrio* spp. Éstas incluyen las cepas aisladas de los langostinos muestreados, así como 12 cepas donadas por el tesista Carlos Emilio Flores Aguilar y dos cepas facilitadas por Imarpe.

Los halos de inhibición se midieron redondeando al milímetro más cercano con una regla, donde se observa el punto en el cual se puede ver una demarcación obvia entre crecimiento y ausencia de crecimiento.

En algunas cepas no fue posible determinar su halo de resistencia a algunos antibióticos, pues debido al alto número de antibióticos ensayados, fue necesario realizar el antibiograma en dos fechas distintas, siendo que algunas cepas que crecieron en el primer antibiograma no lo hicieron en el segundo, por lo que sus cepas fueron no viables.

Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición (mm) a antibióticos de las cepas aisladas.

Cepa	Peni- cili- nas	Fosfo- natos	Fenicoles		Tetracicl- nas		Amino glucó- sidos	Quinolonas		
	Ampicilina (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Acido nalidixico (30 µg)	Enrofloxacina (5 µg)	Norfloxacina (10 µg)
HP6-V	5	5	5	18	16	23	5	25	20	21
HP2-V	5	11	5	14	18	21	8	22	15	18
HP4-V1	7	5	12	5	11	22	14	11	19	17
HP4-V4	21	5	21	10	18	23	16	7	14	9
HP3-V1	21	9	37	39	8	15	12	30	28	30
L4-A1	19	5	25	23	21	27	11	21	23	23
L4-A2	22	21	5	5	5	----	11	----	----	----
L4-V3	25	19	21	29	21	25	11	15	21	19
HP4-V1	5	25	5	23	17	21	11	21	18	21
HP4-A2	19	5	23	21	22	25	18	19	20	20
HP4-A3	5	15	21	19	8	----	11	----	----	----
HP2-A	31	9	39	35	17	----	19	----	----	----
HP5-V1	16	5	24	24	24	25	26	16	22	18
HP5-V2	19	5	25	27	25	27	12	16	20	18
T1	25	9	5	5	17	15	5	5	7	5
T5	15	7	33	25	31	30	17	35	35	37
T6	5	5	23	25	11	----	9	----	----	----
ARR / CVP	5	15	25	24	10	17	12	----	25	25
ARR-2 (1) / VM2	7	17	25	25	12	----	10	----	----	----
ARR-2 / VP2	5	15	18	21	11	----	11	----	----	----
ARR-3	8	16	23	23	11	----	10	----	----	----
ARR-3 / VV1	12	21	28	29	14	----	16	----	----	----
ARR-4 / VP	9	15	23	22	12	9	12	5	5	5
AQ-2 / CVG	5	12	22	20	20	25	14	5	18	17
AQ-2 / CAM	5	15	22	22	8	12	11	23	15	18
ARR-4 / VC *	8	14	20	22	10	----	9	----	----	----
Im-Alg	25	27	29	31	5	9	25	35	27	39
Im-Tum	11	23	31	33	25	29	21	37	25	33

\*CNV= cepa no viable, significa que en el momento de realizar el antibiograma respectivo la cepa no creció, a pesar de ser varias veces sembradas, lo que indica que la misma dejó de ser viable.

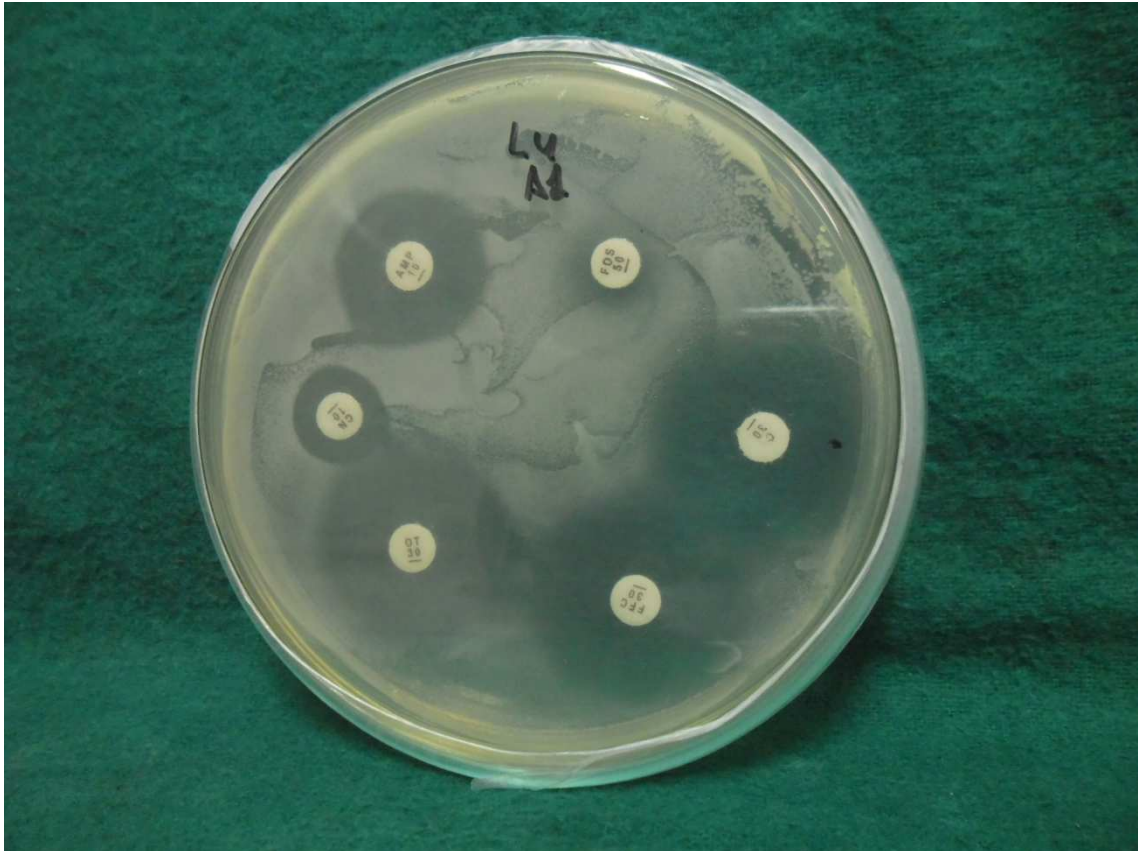


Figura 3. Fotografía de halos de inhibición de antibióticos en una de las cepas aisladas (cepa L4 A1)

#### 4.4. Sensibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp.

En la tabla 6 se muestra la sensibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp., observándose que el 100 % de las cepas mostraron resistencia al menos a uno de los antibióticos ensayados y que la cepa ARR-4/VP, mostró ser la que tuvo resistencia al mayor número de antibióticos (8 de 10).

Tabla 6. Sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas

Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles		Tetraciclinas		Aminoglucósidos	Quinolonas			N° antibióticos a los que muestra resistencia
	Ampicilina (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Acido nalidixico (30 µg)	Enrofloxacina (5 µg)	Norfloxacina (10 µg)	
HP6-V	R*	R	R	S	I	S	R	S	I	S	4
HP2-V	R	R	R	I	I	S	R	S	R	S	5
HP4-V1	R	R	R	R	R	S	I	R	I	S	6
HP4-V4	S	R	S	R	I	S	S	R	R	R	5
HP3-V1	S	R	S	S	R	I	R	S	S	S	3
L4-A1	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	2
L4-A2	S	S	R	R	R	----	R	----	----	----	4
L4-V3	S	I	S	S	S	S	R	I	S	S	1
HP4-V1	R	S	R	S	I	S	R	S	I	S	3
HP4-A2	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	1
HP4-A3	R	R	S	S	R	----	R	----	----	----	4
HP2-A	S	R	S	S	I	----	S	----	----	----	1
HP5-V1	I	R	S	S	S	S	S	I	S	S	1
HP5-V2	S	R	S	S	S	S	R	I	I	S	2
T1	S	R	R	R	I	I	R	R	R	R	7
T5	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1
T6	R	R	S	S	R	----	R	----	----	----	4
ARR / CVP	R	R	S	S	R	I	R	----	S	S	4
ARR-2 (1) / VM2	R	I	S	S	R	----	R	----	----	----	3
ARR-2 / VP2	R	R	S	S	R	----	R	----	----	----	4
ARR-3	R	R	S	S	R	----	R	----	----	----	4
ARR-3 / VV1	R	S	S	S	R	----	S	----	----	----	2
ARR-4 / VP	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	8
AQ-2 / CVG	R	R	S	S	S	S	I	R	I	S	3
AQ-2 / CAM	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	6
ARR-4 / VC *	R	R	S	S	R	----	R	----	----	----	4
Im-Alg	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	2
Im-Tum	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1

\*R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible, ---- = no se pudo determinar la sensibilidad

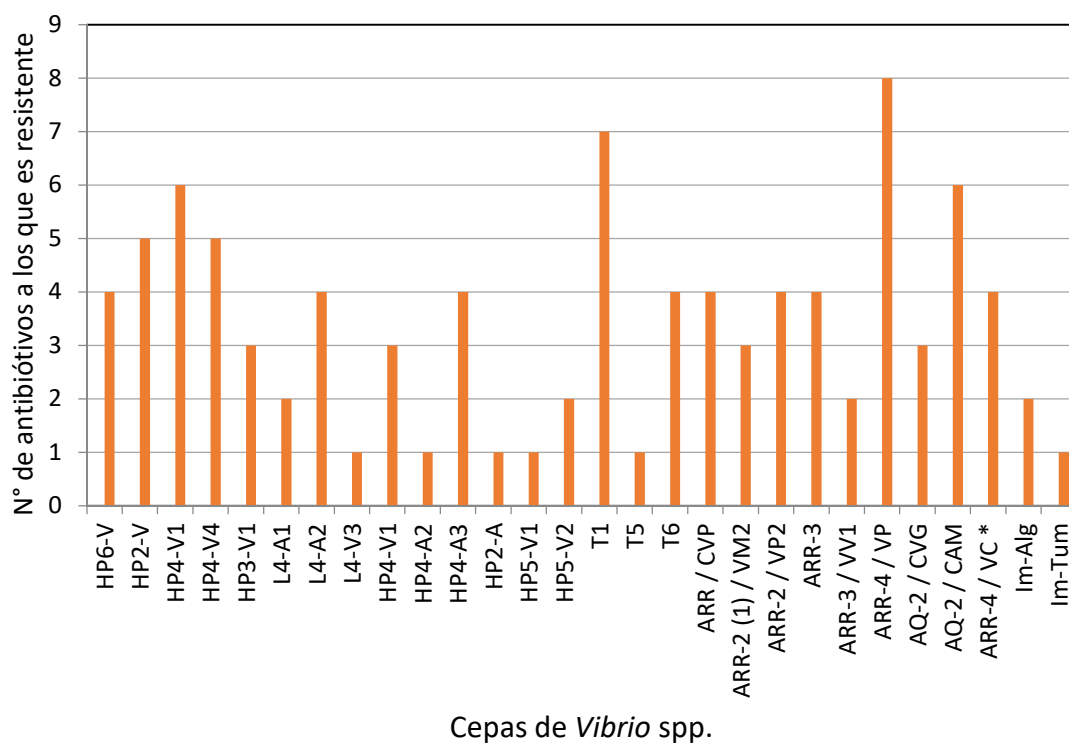


Figura 4. Resistencia de cepas de *Vibrio* spp. a diferentes antibióticos

En la tabla 7 se observa que particularmente respecto a la oxitetraciclina, que es el antibiótico usado tradicionalmente en el tratamiento de vibriosis en langostinos, se observó que 50,0 % de las cepas evaluadas se mostraron resistentes y sólo 28,6 % fueron sensibles a la misma. Se encontró además que las cepas fueron mayormente resistentes a fosfomicina (75,0 %), a gentamicina (64,3 %) y ampicilina (57,1 %), pero también fueron mayormente sensibles a florfenicol (82,1 %), cloranfenicol (78,6 %) y norfloxacina (57,1 %).

Tabla 7. Porcentaje de cepas de *Vibrio* spp. con diferentes niveles de sensibilidad a antibióticos

Antibiótico	Porcentaje de cepas			
	Resistentes	Intermedias	Sensibles	No determinadas
Ampicilina	57,1	7,1	35,7	0,0
Fosfomicina	75,0	7,1	17,9	0,0
Cloranfenicol	21,4	0,0	78,6	0,0
Florfenicol	14,3	3,6	82,1	0,0
Oxitetraciclina	50,0	21,4	28,6	0,0
Gentamicina	64,3	7,1	28,6	0,0
Tetraciclina	10,7	10,7	46,4	32,1
Acido nalidíxico	17,9	10,7	35,7	35,7
Enrofloxacina	17,9	21,4	28,6	32,1
Norfloxacina	10,7	0,0	57,1	32,1

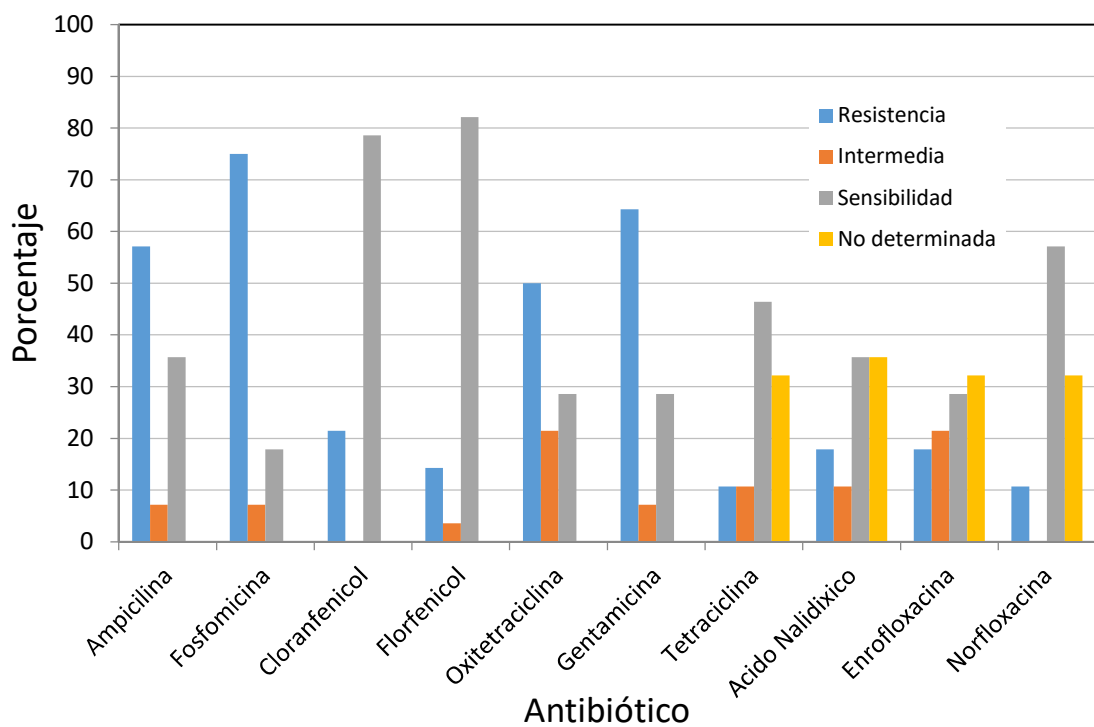


Figura 5. Porcentaje de cepas de *Vibrio* spp. con diferentes niveles de sensibilidad a antibióticos



En la tabla 8, se aprecia la resistencia de las cepas de *Vibrio* spp. a las seis familias de antibióticos empleados, todas las cepas se mostraron resistentes entre 1 a 5 de las familias, 18 de las 28 cepas evaluadas mostraron ser multirresistentes (64,3 %), con tres de ellas (10,7 %), siendo multirresistente a cinco de las seis familias de antibióticos empleados.

Tabla 8. Cepas de *Vibrio* spp. según resistencia a las familias de antibióticos ensayadas

Cepa	Familias de antibióticos a los que muestra resistencia						Cantidad de resistencias	Observación
	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles	Tetraciclinas	Aminoglu- cósidos	Quinolonas		
HP6-V	X	X	X		X		4	Multirresistente
HP2-V	X	X	X		X	X	5	Multirresistente
HP4-V1	X	X	X	X		X	5	Multirresistente
HP4-V4		X	X			X	3	Multirresistente
HP3-V1		X		X	X		3	Multirresistente
L4-A1		X			X		2	
L4-A2			X	X	X		3	Multirresistente
L4-V3					X		1	
HP4-V1	X		X		X		3	Multirresistente
HP4-A2		X					1	
HP4-A3	X	X		X	X		4	Multirresistente
HP2-A		X					1	
HP5-V1		X					1	
HP5-V2		X			X		2	
T1		X	X		X	X	4	Multirresistente
T5		X					1	
T6	X	X		X	X		4	Multirresistente
ARR / CVP	X	X		X	X		4	Multirresistente
ARR-2 (1) / VM2	X			X	X		3	Multirresistente
ARR-2 / VP2	X	X		X	X		4	Multirresistente
ARR-3	X	X		X	X		4	Multirresistente
ARR-3 / VV1	X			X			2	
ARR-4 / VP	X	X		X	X	X	5	Multirresistente
AQ-2 / CVG	X	X				X	3	Multirresistente
AQ-2 / CAM	X	X		X	X	X	5	Multirresistente
ARR-4 / VC *	X	X		X	X		4	Multirresistente
Im-Alg				X			1	
Im-Tum	X						1	

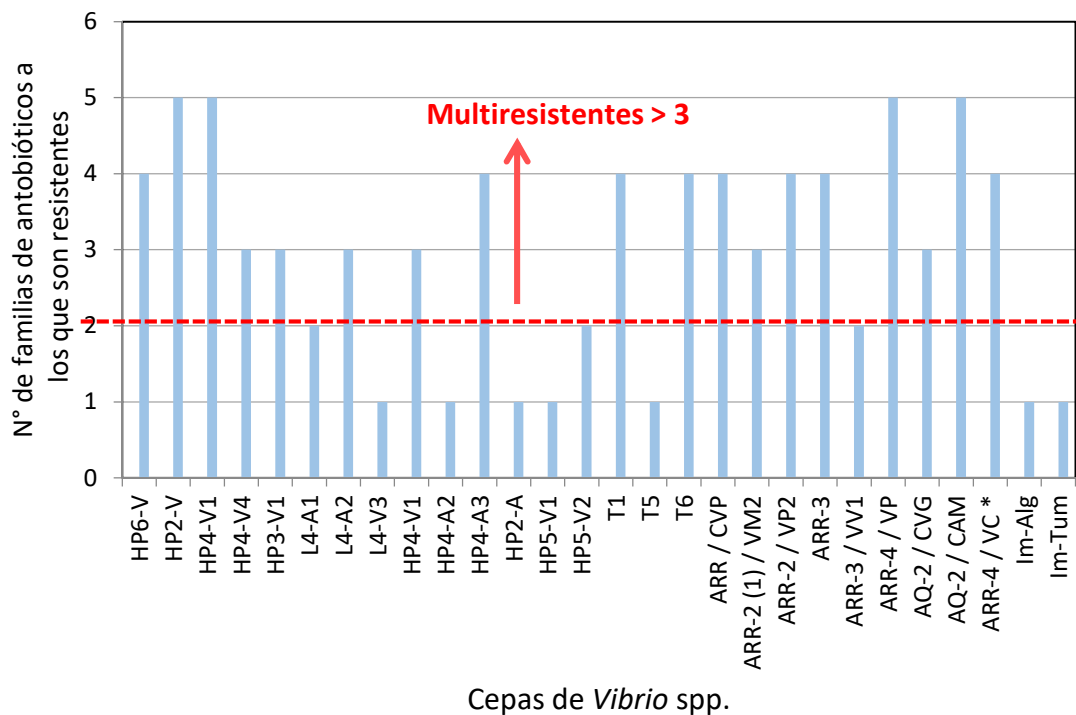


Figura 6. Cepas de *Vibrio* spp. según resistencia a las familias de antibióticos ensayadas

**4.5. Diámetro de los halos de inhibición de extracto de neem en *Vibrio* spp.**

En las tablas 9 y 10 se muestran los diámetros de los halos de inhibición que los extractos acuoso y alcohólico de neem produjeron en las cepas de *Vibrio* spp., como se observa, ninguna de los tratamientos basados en diferentes concentraciones del extracto de neem tuvieron efecto inhibitor en las cepas de *Vibrio* spp. Los discos empleados como controles negativos y que contuvieron alcohol etílico y agua destilada, como se esperaba, no produjeron inhibición en las cepas, y los discos de oxitetraciclina usado como control positivo, mostraron inhibición en todas las cepas excepto contra Im-Alg, la cual es una cepa resistente a la oxitetraciclina.

Tabla 9. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto acuoso de hojas de neem en cepas de *Vibrio* spp.

Tratamiento	Halo de inhibición (promedio $\pm$ desviación estándar)			
	HP2 V	HP4 V1	Im-Alg	Im-Tum
100 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Oxitetraciclina (30 $\mu$ g)	18,2 $\pm$ 4,1	21,0 $\pm$ 5,8	5,8 $\pm$ 1,1	17,4 $\pm$ 6,2
Agua destilada	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

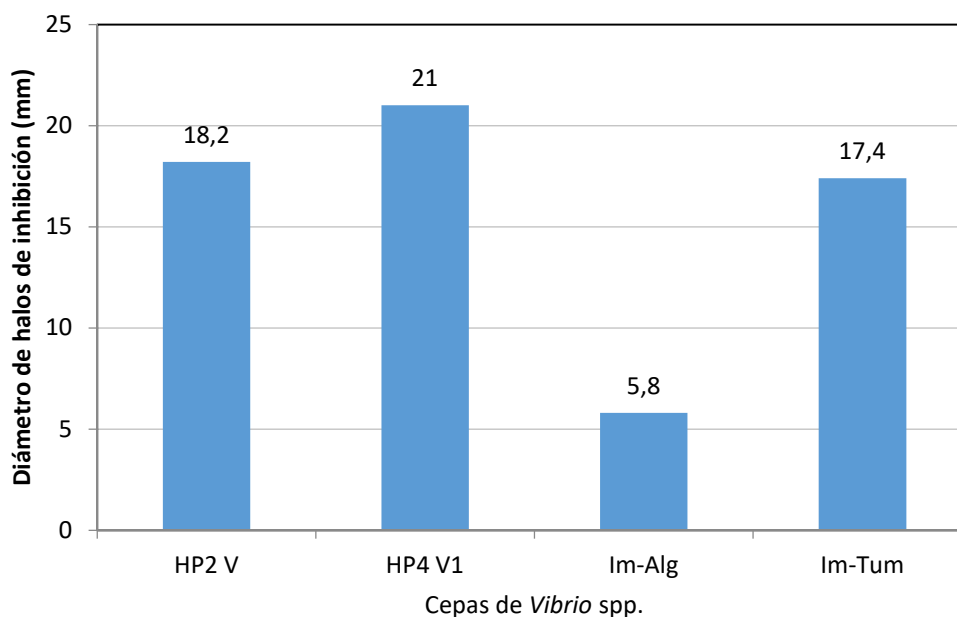


Figura 7. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de *Vibrio* spp en el ensayo del extracto acuoso de hojas de neem.

Tabla 10. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto alcohólico de hojas de neem en cepas de *Vibrio* spp.

Tratamiento	Halo de inhibición (promedio $\pm$ desviación estándar)			
	HP2 V	HP4 V1	Im-Alg	Im-Tum
100 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Oxitetraciclina (30 $\mu$ g)	19,8 $\pm$ 2,3	21,8 $\pm$ 4,8	5,4 $\pm$ 0,9	17,4 $\pm$ 6,2
Alcohol etílico	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

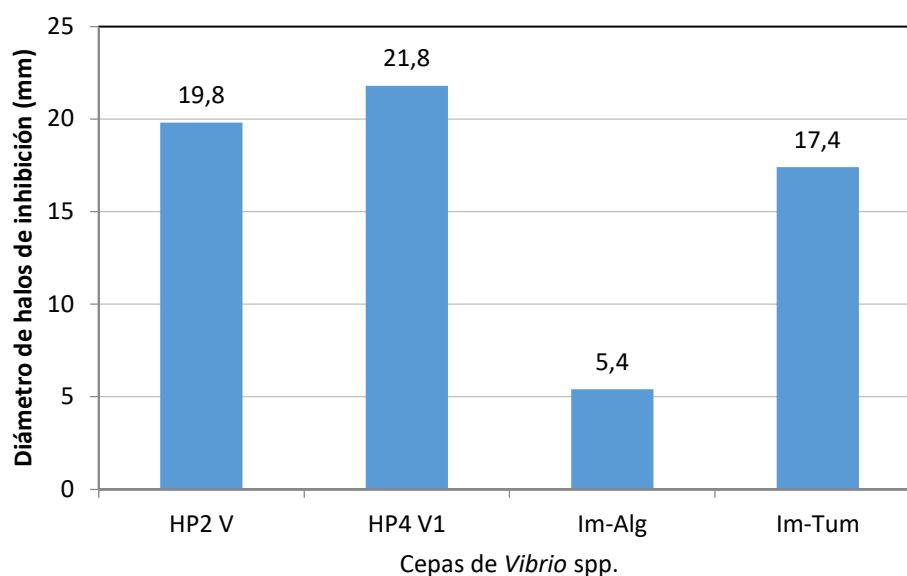


Figura 8. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de *Vibrio* spp en el ensayo del extracto alcohólico de hojas de neem

En la tabla 11, se observa los diámetros de los halos de inhibición del extracto de hojas de neem obtenido con soxhlet y rotaevaporador, si bien en

casi todos los casos no existe inhibición, sin embargo el extracto no diluido (100 % de extracto) logró inhibición en la cepa Im-Alg.

Tabla 11. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto de hojas de neem (obtenido con soxhlet y rotaevaporador) en cepas de *Vibrio* spp.

Tratamiento	Halo de inhibición (promedio $\pm$ desviación estándar)			
	HP2 V	HP4 V1	Im-Alg	Im-Tum
100 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	12,4 $\pm$ 1,7	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
100 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
50 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^0$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-1}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-2}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
25 % de extracto y dilución $10^{-3}$	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Oxitetraciclina (30 $\mu$ g)	16,6 $\pm$ 3,8	20,6 $\pm$ 3,8	5,0 $\pm$ 0,0	15,4 $\pm$ 3,8
Alcohol etílico	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

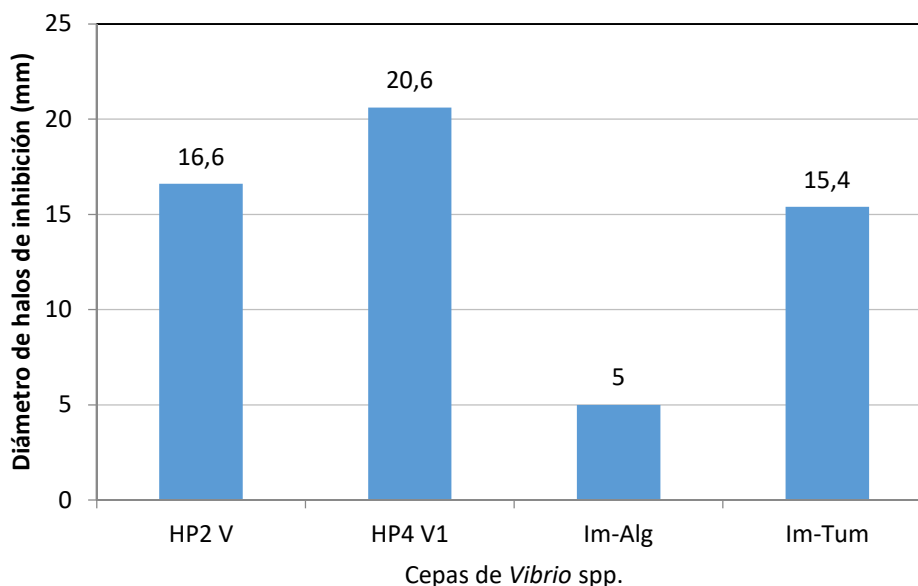


Figura 9. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de *Vibrio* spp en el ensayo del extracto de hojas de neem (obtenido con soxhlet y rotaevaporador)

#### 4.6. Diámetro de los halos de inhibición de extracto de orégano en *Vibrio* spp.

En la tabla 12 se observa que sólo el tratamiento basado en 100 % del extracto y sin ninguna dilución (dilución  $10^0$ ), mostró halo de inhibición en todas las cepas de *Vibrio* spp. con diámetros entre  $8,4 \pm 2,6$  mm y  $14,0 \pm 3,2$  mm. En estas mismas cepas el antibiótico de referencia (oxitetraciclina) produjo halos con tuvo diámetros entre  $5,4 \pm 0,8$  mm y  $19,0 \pm 3,2$  mm, en particular en el caso de la cepa Im-Alg que se mostró resistente a oxitetraciclina, el extracto de orégano al 100 % sin dilución obtuvo halos de inhibición de  $14,0 \pm 3,2$  frente a los  $5,4 \pm 0,8$  mm del disco de oxitetraciclina, lo cual significa un halo casi tres veces mayor producido por el extracto de orégano. Los discos empleados como controles negativos (conteniendo alcohol etílico y agua destilada), no produjeron inhibición en las cepas.

Tabla 12. Diámetro del halo de inhibición (mm) del extracto de hojas de orégano (obtenido con soxhlet y rotaevaporador) en cepas de *Vibrio* spp.

Tratamiento	Halo de inhibición (promedio $\pm$ desviación estándar)			
	HP2 V	HP4 V1	Im-Alg	Im-Tum
100 % de extracto y dilución $10^0$	$10,0 \pm 3,2$	$9,6 \pm 2,6$	$14,0 \pm 3,2$	$8,4 \pm 2,6$
100 % de extracto y dilución $10^{-1}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
100 % de extracto y dilución $10^{-2}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
100 % de extracto y dilución $10^{-3}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
50 % de extracto y dilución $10^0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
50 % de extracto y dilución $10^{-1}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
50 % de extracto y dilución $10^{-2}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
50 % de extracto y dilución $10^{-3}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
25 % de extracto y dilución $10^0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
25 % de extracto y dilución $10^{-1}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
25 % de extracto y dilución $10^{-2}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
25 % de extracto y dilución $10^{-3}$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Oxitetraciclina (30 $\mu$ g)	$15,8 \pm 2,3$	$18,6 \pm 2,6$	$5,4 \pm 0,9$	$19,0 \pm 3,2$
Alcohol etílico	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

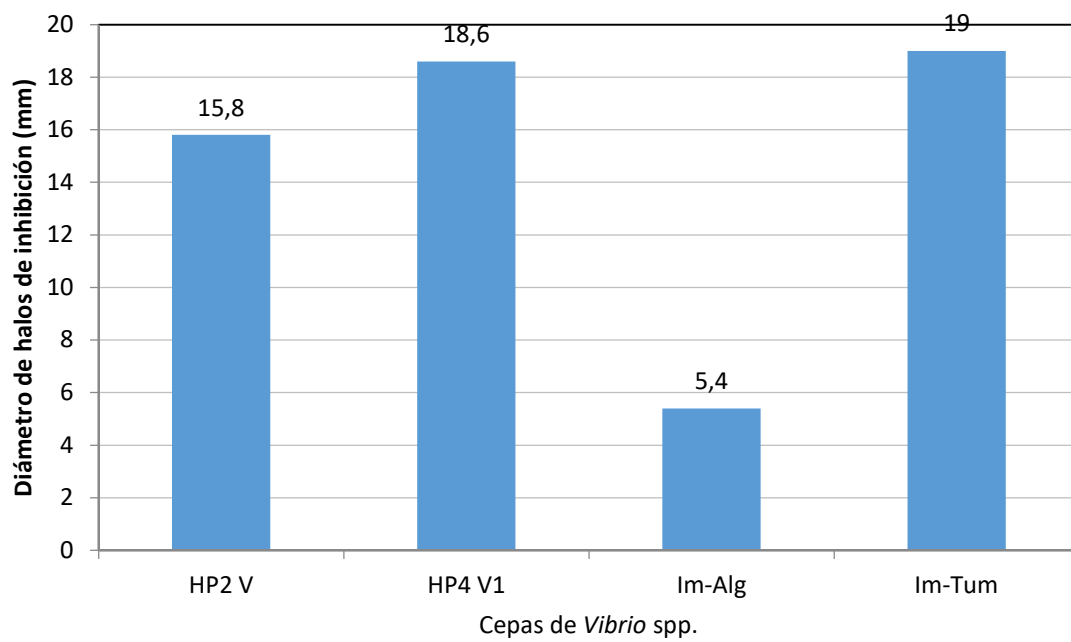


Figura 10. Diámetro del halo de inhibición (mm) de oxitetraciclina en las cuatro cepas de *Vibrio* spp en el ensayo del extracto de hojas de orégano (obtenido con soxhlet y rotaevaporador)

## V. DISCUSIÓN

La mayoría de los langostinos muestreados no presentaron lesiones, pero tuvieron sus antenas rojas y cortas y los urópodos enrojecidos, estas características han sido observadas previamente en langostinos con infecciones por *Vibrio* (Lomelí and Martínez-Díaz 2019). Algunos de los ejemplares muestreados en esta investigación aparentemente estuvieron sanos, sin embargo de ellos se también se pudo obtener cepas de *Vibrio*, puesto que estas cepas forman parte de su flora nativa y son patógenas oportunistas (Padilla 2005; Morales-Covarrubias 2008) como lo han confirmado las investigaciones de Saavedra (2016), Md Zoqratt et al. (2018) y Cornejo-Granados et al. (2017), quienes encontraron que en el microbioma de langostinos sanos, se encontraban poblaciones abundantes de *Vibrio*.

Las colonias de *Vibrio* spp. que pudieron aislarse de los langostinos crecieron en medio TCBS mostrando coloración verde o amarilla, con formas circulares o irregulares (tamaño de 1 a 5 mm), con bordes enteros u ondulados, superficies lisas o rugosas; con elevación convexa y consistencia cremosa, que son características típicas de colonias de *Vibrio* al crecer dicho medio como lo indican Sabir, Ennaji and Cohen (2013) y Oviedo (2014).

Respecto a los antibiogramas realizados se observó que el 100 % de las cepas de *Vibrio* spp. mostraron resistencia a uno o varios de los antibióticos ensayados; este valor es superior al encontrado por Rebouças et al. (2011), quienes evaluaron la resistencia a antibióticos en cepas de *Vibrio* aisladas de langostinos en el Brasil, y encontraron que 61 % de sus cepas fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos ensayados, de igual manera Albuquerque et al. (2015), precisa haber encontrado 75 % de sus cepas resistentes a al menos un antibiótico ensayado; sin embargo los resultados encontrados en esta investigación son similares a las halladas por Banerjee et al. (2012), quienes reportan que luego de aislar 42 cepas de *Vibrio* de langostineras de Malasia, 41 de ellas (97,6 %) mostraron ser resistentes a alguno de los antibióticos utilizados, esto muestra que hay variabilidad respecto a la resistencia a antibióticos en diferentes regiones, pero es bastante común que la resistencia sea alta o muy alta en cepas de *Vibrio*.



En este estudio se observó que el 57,1 % de las cepas fueron resistentes a ampicilina, lo cual es una resistencia bastante común en *Vibrio* de ambientes marinos (Ferrini et al. 2008; Oh et al. 2011), lo que es confirmado por los hallazgos de Costa et al. (2008), quienes hallaron que entre 50 a 75 % de las cepas de *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis* y *V. costicola* aisladas de centros de cultivo de langostino mostraron ser resistente a este antibiótico.

Respecto a la resistencia de las cepas de esta investigación a la oxitetraciclina, que es el antibiótico más usado en esta región para tratar la vibriosis, se observó que el 50 % de cepas fueron resistentes a oxitetraciclina, sin embargo Rebouças et al. (2011), sólo encontraron 25,8 % de resistencia a oxitetraciclina en las cepas que evaluaron, estos mismos autores indican que Kim et al. (2003), encontraron que 54,3 % de las cepas de *Vibrio* aisladas de agua y suelo de zonas acuícolas de Japón fueron resistentes a oxitetraciclina, argumentando que la menor incidencia de resistencia a la oxitetraciclina en Brasil se debe a que este antibiótico no está aprobado para uso en la acuicultura en dicho país por lo que al aplicarse menos se genera menos resistencia, aspecto que justifica el hecho de tenerse mayor resistencia a oxitetraciclina en este estudio pues dicho antibiótico es ampliamente usado en el tratamiento de vibriosis.

Por otro lado en este estudio el antibiótico que mostró ser más efectivo contra las cepas de *Vibrio* ensayadas fue el florfenicol al cual fueron sensibles 82,1 % de ellas, este resultado es similar al hallado por Rebouças et al. (2011) quien reportó que en el caso de sus cepas, el 100 % de ellas fueron más sensibles a florfenicol y a sulfametoxazol-trimetoprin.

La resistencia encontrada contra antibióticos que no son comúnmente empleados en acuicultura puede haber sido generada por factores antropogénicos como son la descarga de aguas residuales con restos de antibióticos en el manglar, por parte de poblaciones aledañas al mismo, como también lo afirman Mendoza, Tinoco, y Nieto (2016).

Existe un riesgo de que la resistencia y multirresistencia a antibióticos que poseen las cepas de *Vibrio* spp. de la zona en estudio puedan transferir dicha capacidad a bacterias de otros géneros, originando problemas ambientales o tal vez que la transfieran a cepas patógenas a humanos, lo que originaría un problema de salud pública, opinión que es compartida por Rortana et al. (2018).

Debido a lo antes señalado, en esta investigación se ensayó extractos de neem y de orégano para poder controlar a *Vibrio* spp. in vitro, sin embargo los resultados no fueron positivos en el caso de neem, puesto que sólo mostró tener poder inhibitor contra una (Im-Alg) de las cuatro cepas ensayadas, y sólo cuando su extracto fue procesado en equipo soxhlet y purificado en rotaevaporador y aplicado sin diluir, cabe mencionar que dicha cepa fue resistente a la oxitetraciclina, Banerjee et al. (2013), encontraron de manera similar que el extracto acuoso de hoja de neem no mostró efecto inhibitor en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* aislados de *L. vannamei* en Malasia, sin embargo si obtuvieron efecto inhibitor cuando ensayaron el jugo de las hojas de neem. Morales-Covarrubias et al. (2016) también ensayaron el uso de infusión de hojas de neem en cepas de *Vibrio* spp. que aisló de langostino, observando en su caso que si tuvo efecto inhibitor en las cepas pero sólo cuando se aplicó sin diluir, obteniendo halos con diámetros promedio entre 9,5 y 17 mm, en este estudio, el extracto de hoja de neem sólo fue efectivo contra una de las cepas y alcanzó diámetro de  $12,4 \pm 1,7$  mm, que están en el rango de los obtenidos por el anterior autor.

En el caso del extracto de hoja de orégano, en esta investigación se obtuvo mejores resultados, puesto que mostró inhibir a las cuatro cepas ensayadas, mostrando halos de inhibición con diámetros menores a los producidos por oxitetraciclina (diámetros entre 8,4 y 10,0 mm frente a 15,8 a 19,0 mm), a excepción del obtenido en la cepa Im-Alg, el cual mostró un diámetro casi tres veces mayor al de oxitetraciclina ( $14,0 \pm 3,2$  mm frente a  $5,4 \pm 0,9$  mm), Morales-Cobarrubias et al. (2016) también ensayó infusiones de hoja de orégano en *Vibrio* spp., encontrando que mostró poder inhibitor, produciendo halos entre 9,2 y 18,8 mm, que son parecidos a los hallados en la presente investigación ( $8,4 \pm 2,6$  a  $14,0 \pm 3,2$  mm).

## VI. CONCLUSIONES

1. De las 28 cepas de *Vibrio* spp. ensayadas, el 100 % mostraron ser resistente al menos a uno de los antibióticos utilizados. 50 % de las cepas fueron resistentes a oxitetraciclina y 64,3 % de ellas fueron multirresistentes. La cepa ARR-4/VP mostro ser la más resistente al mayor número de antibióticos (8 de 10).
2. El extracto acuoso de las hojas de neem y orégano no produjo halos de inhibición (diámetro = 0,0 mm) en el ensayo *in vitro* contra cepas de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos aisladas de *Litopenaeus vannamei*.
3. El extracto alcohólico de las hojas de neem y orégano no produjo halos de inhibición (diámetro = 0,0 mm) en el ensayo *in vitro* contra cepas de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos aisladas de *Litopenaeus vannamei*.
4. El extracto obtenido de las hojas de neem utilizando soxhlet y rotaevaporador sin dilución mostró inhibir la cepa Im-Alg (diámetro =  $12,4 \pm 1,7$  mm) en el ensayo *in vitro* contra cepas de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos aisladas de *Litopenaeus vannamei*.
5. El extracto no diluido de hoja de orégano procesado con soxhlet y rotaevaporador, inhibió las cuatro cepas de *Vibrio* spp. ensayadas, con diámetro de los halos de inhibición entre  $8,4 \pm 2,6$  mm y  $14,0 \pm 3,2$  mm.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar el efecto inhibidor de extractos de neem en mayor número de cepas de *Vibrio* spp.
2. Continuar con la investigación de los biocompuestos de la hoja de orégano que le otorgan propiedades antibióticas frente a *Vibrio* spp.
3. Monitorear permanentemente la resistencia antibiótica de cepas de *Vibrio* spp. en cultivos de langostino.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Akeel, R., A.Mateen, K. Janardhan, and V. C. Gupta. 2015. «Analysis of anti-bacterial and anti oxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts». *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1):11-14. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.08.006
- Alarcón, G. 2002. «*Actividad de extractos de plantas en el crecimiento, la producción de toxina y la unión de Vibrio cholerae a células*». Tesis de maestro en ciencias con especialidad en microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/923/1/1080124315.PDF>
- Albuquerque, R. R., R. L. Araújo, O. V. Souza, and R. H. S. F. Vieira. 2015. «Antibiotic-Resistant Vibrios in Farmed Shrimp». *BioMed Research International* 2015: 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/505914>.
- Ali, W., P. Sultana, M. Joshi, and S. Ranjendran. 2016. «A solvent induced crystallisation method to imbue bioactive ingredients of neem oil into the compact structure of poly (ethylene terephthalate) polyester». *Materials Science and Engineering C*, 64: 399-406. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.002>
- Avalos, J. 2014. «*Actividad citotóxica y estudio fitoquímico de los extractos de semilla y hoja de neem (Azadirachta indica a. juss.) de origen regional (Ebano, San Luis Potosí) comparada con la comercializada en la india*». Tesis doctoral en ciencias con acentuación en química de productos naturales. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. <http://eprints.uanl.mx/4002/1/1080253534.pdf>
- Banco Mundial. 2014. «*Reducing disease risk In aquaculture*». Washington, Washington D. C.: Banco Mundial. <http://documents.worldbank.org/curated/en/110681468054563438/pdf/882570REPLACEMENT00NAME0Reantaso0Melba.pdf>

- Banerjee, S., M. C. Ooi, M. Shariff, and H. Khatoon. 2012. «Antibiotic Resistant *Salmonella* and *Vibrio* Associated with Farmed *Litopenaeus Vannamei*». *The Scientific World Journal* 2012: 1-6. <https://doi.org/10.1100/2012/130136>.
- Banerjee, S., L. M. Kim, M. Shariff, H. Khatoon, and F. Md. Yusoff. 2013. «Antibacterial Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Leaves on *Vibrio* spp. Isolated from Cultured Shrimp». *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (2): 355-61. <https://doi.org/10.3923/ajava.2013.355.361>.
- Bermúdez, M., A. Espinosa, M. Santiago, C. Barajas, y E. Acedo. 2014. «Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aislados de los organismos». *Biotecnia*, 16(3), 29-37. [https://www.researchgate.net/publication/289824158\\_COMPORTAMIENTO\\_DE\\_OXITETRACICLINA\\_EN\\_CAMARON\\_DE\\_CULTIVO\\_Litopenaeus\\_vannamei\\_Y\\_LA\\_SENSIBILIDAD\\_A\\_TRES\\_ANTIBIOTICOS\\_DE\\_BACTERIAS\\_DE\\_Vibrio\\_AISLADAS\\_DE\\_LOS\\_ORGANISMOS](https://www.researchgate.net/publication/289824158_COMPORTAMIENTO_DE_OXITETRACICLINA_EN_CAMARON_DE_CULTIVO_Litopenaeus_vannamei_Y_LA_SENSIBILIDAD_A_TRES_ANTIBIOTICOS_DE_BACTERIAS_DE_Vibrio_AISLADAS_DE_LOS_ORGANISMOS)
- Bondad-Reantaso, M. G., R. P. Subasinghe, J. R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, S. Tan, and M. Shariff. 2005. «Disease and health management in Asian aquaculture». *Veterinary Parasitology* 132(3): 249-272. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.07.005
- Cayul, A. A. 2003. «Estudio de resistencia a antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria, de patógenos bacterianos aislados de metritis bovina en rebaños lecheros de la décima región» Tesis de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc385e/doc/fvc385e.pdf>
- Campoverde, M. 2015. «Evaluación del efecto de dos plantas medicinales, sobre la presencia de *Vibrios* sp. en agua de piscina camaronera». Tesis de Ingeniero Acuicultor. Universidad Técnica de Machala. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3040/1/CD00019\\_TRABAJO DETITULACION.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3040/1/CD00019_TRABAJO DETITULACION.pdf)

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2019. «*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100*». 29th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED29:2019&scope=user>.
- Cornejo-Granados, F., A. A. Lopez-Zavala, L. Gallardo-Becerra, A. Mendoza-Vargas, F. Sánchez, R. Vichido, L. G. Brieba, M. T. Viana, R. R. Sotelo-Mundo, and A. Ochoa-Leyva. 2017. «Microbiome of Pacific Whiteleg Shrimp Reveals Differential Bacterial Community Composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS Outbreak Conditions». *Scientific Reports* 7 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w>.
- Costa, R. A., G. H. F. Vieira, G. C. Silva, R. H. S. F. Vieira, and S. Sampaio. 2008. «Susceptibilidade "in vitro" a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará Nota prévia». *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 45(6): 458-462. <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26669/28452>
- Crespo, M. 2005. «La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla?». *Infectio*, 9(1):31-45. <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/download/225/248>
- Cuellar, J. 2013. «Vibriosis. Guía técnica – patología e inmunología de camarones penaeidos». En V. Morales & J. Cuéllar (Eds.). *Guía técnica de patología e inmunología de camarones peneidos*. Ames, USA: Iowa State University. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Delgado, G. M. 2010. «*Evaluación de extracto vegetales y aplicación de silicio para el manejo integrado de enfermedades foliares e insectos- plaga en tomate (Lycopersicon esculen mil)*». Tesis de ingeniero agrónomo. Universidad de

Guayaquil. <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/968/1/P-SENESCYT-0037.pdf>

Done, H. Y., A. K. Venkatesan, and R. U. Halden. 2015. «Does the recent growth of aquaculture antibiotic resistance threats differ from those associated with land animal production in agriculture?». *The AAPS journal* 17(3): 513-524. DOI: 10.1208/s12248-015-9722-z

Dos Santos, E. M. 2015. «*Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem*» Dissertação de mestrado em Ciências Ambientais. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. <http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/1821/1/Edela%20M%20dos%20Santos%20Boufleuer.pdf>

FAO. 2016. «*El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*». Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos». Roma, Italia: FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>

Ferrini, A. M., V. Mannoni, E. Suffredini, L. Cozzi, and L. Croci. 2008. «Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings». *Food Anal. Methods* 1:164–170. DOI 10.1007/s12161-007-9011-2

Garza, U., J. Silva, y E. Martínez. 2009. «Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana». *Salud pública de México* 51(3): 439-446. - 5. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342009000900009&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009&lng=es&nrm=iso)

Gómez-Gil, B. 2005. «Bacteriología de camarones». <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Bacteriologia%20de%20camarones.pdf>

Gracia-Valenzuela, M. H., M. J. Vergara-Jiménez, M. E. Baez-Flores, and F. Cabrera-Chavez. 2014. «Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against



vibrio bacteria in shrimps». *Arch. Biol. Sci.* 66(4):1367-1370. DOI: 10.2298/ABS1404367G

Joshi, J., J. Srisala, V. H. Truong, I-T. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C. F. Lo, T. W. Flegel, K. Sritunyalucksana, and S. Thitamadee. 2014. «Variation in *Vibrio Parahaemolyticus* Isolates from a Single Thai Shrimp Farm Experiencing an Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)». *Aquaculture* 428-429 (mayo): 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>.

Kim, S.-R., L. Nonaka, M.-J. Oh, C. R. Lavilla-Pitogo, and S. Suzuki. 2003. «Distribution of an Oxytetracycline Resistance Determinant Tet(34) among Marine Bacterial Isolates of a *Vibrio* Species». *Microbes and Environments* 18 (2): 74-81. <https://doi.org/10.1264/jsme2.18.74>.

Lomelí, O. and S. F. Martínez-Díaz. 2019. «Control of *Vibrio parahaemolyticus* in the White shrimp *Litopenaeus vannamei* by phage therapy». [https://www.researchgate.net/publication/267791719\\_Control\\_of\\_Vibrio\\_parahaemolyticus\\_in\\_the\\_White\\_shrimp\\_Litopenaeus\\_vannamei\\_by\\_phage\\_therapy](https://www.researchgate.net/publication/267791719_Control_of_Vibrio_parahaemolyticus_in_the_White_shrimp_Litopenaeus_vannamei_by_phage_therapy)

Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. «Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance». *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3): 268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

Md Zoqratt, M. Z. H., W. W. H. Eng, B. T. Thai, C. M. Austin, and H. M. Gan. 2018. «Microbiome Analysis of Pacific White Shrimp Gut and Rearing Water from Malaysia and Vietnam: Implications for Aquaculture Research and Management». *PeerJ* 6 (octubre): e5826. <https://doi.org/10.7717/peerj.5826>.

Mendoza, S., O. Tinoco, y K. Nieto. 2016. «Evaluación de la carga bacteriana y resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en zonas marinas de alta

influencia de producción larvaria en Ecuador» *Revista del instituto de investigación, FIGMMG-UNMSM* 19 (38): 137-46. <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/13580/11991>

Morales-Covarrubias, M. S. 2008. «Enfermedades Bacterianas». En *Enfermedades bacterianas Guía técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos*, editado por V. Morales y J. Cuéllar-Anjel, 117-34. Panamá, Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei. <http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf>.

Morales-Covarrubias, M. S., N. García-Aguilar, M. C. Bolan-Mejía, and A. C. Puello-Cruz. 2016. «Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity». *Diseases of Aquatic Organisms*, 122: 57–65. <https://doi.org/10.3354/dao03060>

Muñoz, L. 2002. «Plantas medicinales españolas: *Origanum vulgare* (oregano)». *Acta Botanica malacitana*, 27: 273-280. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=793435&orden=220174&info=link>

Muñoz, E. 2015. «Caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.)». Tesis de Doctor con mención honorífica en Doctorado Europeo. Universidad Complutense de Madrid. <http://eprints.ucm.es/33268/1/T36416.pdf>

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1999. «*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. NCCLS Document M7-A3*». 3rd Edition. Wayne, PA: NCCLS.

Oh, E.-G., K.-T. Son, H. Yu, T.-S. Lee, H.-J. Lee, S. Shin, J.-Y. Kwon, K. Park, and J. Kim. 2011. «Antimicrobial Resistance of *Vibrio Parahaemolyticus* and *Vibrio*

Alginolyticus Strains Isolated from Farmed Fish in Korea from 2005 through 2007». *Journal of Food Protection* 74 (3): 380-86. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-307>.

Oviedo, J. X. 2014. «*Identificación y caracterización molecular del género Vibrio en la hemolinfa y hepatopáncreas de Litopenaeus vannamei en cultivo semi-intensivo en Tumbes*». Tesis de Ingeniero pesquero, Universidad Nacional de Tumbes. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/UNITUMBES/206/TESIS%20-%20OVIDO%20CASARIEGO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Padilla, M. 2005. «*Caracterización de la Comunidad Bacteriana Presente en Cultivo de Camarón Litopenaeus vannamei Utilizando Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y PCR*». Tesis de Maestro en Ciencias con orientación en Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1131/1/168161.pdf>

Prieto, A., A. Auró, A. Fernández, and M. Pérez. 2005. «El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México». *Revista especializada en ciencias químico – Biologicos* 8(1):38-49. <https://www.redalyc.org/pdf/432/43200805.pdf>

Rebouças, R. H., O. V. de Sousa, A. S. Lima, F. R. Vasconcelos, P. B. de Carvalho, y R. H. S. dos Fernandes Vieira. 2011. «Antimicrobial Resistance Profile of Vibrio Species Isolated from Marine Shrimp Farming Environments (Litopenaeus vannamei) at Ceará, Brazil». *Environmental Research* 111 (1): 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.09.012>.

Roque, A., A. Molina-Aja, C. Bolán-Mejía, and B. Gomez-Gil. 2001. «In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico». *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17:383–387. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00308-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00308-9)

- Rortana, C., W. Wajjwalku, V. Boonyawiwat, C. Hrianpreecha, S.Thongratsakul, and P. Amavisit. 2018. «Antimicrobial Resistance and PirAB-like Profiles of *Vibrio Parahaemolyticus* in Pacific White Shrimp». *Agriculture and Natural Resources* 52 (4): 377-81. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.10.010>.
- Saavedra, K. Y. 2016. «*Caracterización molecular de la microbiota bacteriana en la hemolinfa de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), sanos y enfermos en base a técnicas de aislamiento, co-cultivo y metagenómica*». Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Tumbes. <http://repositorio.concytec.gob.pe/bitstream/CONCYTEC/268/1/Tesis%20-%20Saavedra%20Olivos%20Katherine%20Yuliana.pdf>.
- Sabir, M., M. M. Ennaji and N. Cohen. 2013. «*Vibrio Alginolyticus: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases*». *International Journal of Science and Technology* 2(4): 302-309. [https://www.researchgate.net/publication/236214804\\_Vibrio\\_Alginolyticus\\_An\\_Emerging\\_Pathogen\\_of\\_Foodborne\\_Diseases/download](https://www.researchgate.net/publication/236214804_Vibrio_Alginolyticus_An_Emerging_Pathogen_of_Foodborne_Diseases/download)
- Santiago, M., A. Espinoza, and M. Bermudez. 2009. «Uso de antibióticos en la camaricultura». *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 40:2. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57912963005.pdf>
- Seguel, V. A. 2009. «*Evaluación de la susceptibilidad y determinación de la concentración inhibitoria mínima de cuatro antibióticos blindados en agentes bacterianos asociados a enfermedades de salmonídeos*». Tesis de médico veterinario. Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc385e/doc/fvc385e.pdf>.
- Serrano, L. V. 2014. «*Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida*». Tesis de Ingeniero en Acuicultura. Escuela Politécnica del Litoral. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25086/1/Tesis%20Lizette%20Serrano.pdf>

- Silva, W., A. Olea, V. Cachicas, J. Fernández, D. Ibáñez, J. C. Hormazábal, J. García, y A. Maldonado. 2008. «*Manual de Procedimientos. Aislamiento, Identificación y Caracterización de Vibrio parahaemolyticus*». Santiago de Chile, Chile: Ministerio de Salud - Instituto de Salud Pública. <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=loPp31FnWDM%3D&tabid=783&mid=1713&language=es-ES>
- Silvester, R., D. Alexander, A. C. Antony, and M. Hatha. 2017. «GroEL PCR- RFLP – An Efficient Tool to Discriminate Closely Related Pathogenic Vibrio Species». *Microbial Pathogenesis* 105 (abril): 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.029>.
- Sosa, D., A. Escobar, y R. Faure. 2013. «Empleo de la oxitetraciclina en el cultivo del camarón con énfasis en la especie *Litopenaeus vannamei* y alternativas que favorecen la disminución o sustitución de su aplicación». *Revista electrónica de veterinaria*, 14(7):1-11. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070713/071309.pdf>
- Sotomayor, M. A., y J. L. Balcázar. 2003. «Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas». *Revista AquaTIC*, 19, 9-15. [http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19\\_2.pdf](http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_2.pdf)
- Stalin, N., and P. Srinivasan. 2016. «Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India». *Microbial Pathogenesis*, 97, 110-118. doi: 10.1016/j.micpath.2016.05.021
- Sun, M., J. Li, F. Zhao, J. Li, and Z. Chang. 2013. «Distribution and Elimination of Norfloxacin in *Fenneropenaeus chinensis* Larvae». *J. Ocean Univ. China*, 12 (3): 397-402. DOI: 10.1007/s11802-013-2179-8
- Talpur, A. D. and M. Ikhwanuddin. 2013. «*Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates*

*calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*». *Fish & shellfish immunology*, 34(1): 254-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.003>.

Thanigaivel, S., S. Vijayakumar, S. Gopinath, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, and J. Thomas. 2015. «In vivo and in vitro antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected Tilapia (*Oreochromis mossambicus*)». *Aquaculture*, 437: 252-255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.008>.

Villamil, D., N. Naranjo, y M. Van Strahlen. 2012. «Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *collaria scenica* stal (Hemiptera: Miridae)». *Entomo Brasilia*, 5(2):125-129. <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/5509359.pdf>

Williams, S. L., R. V. Jensen, D. D. Kuhn, and A. M. Stevens. 2017. «Analyzing the metabolic capabilities of a *Vibrio parahaemolyticus* strain that causes Early Mortality Syndrome in shrimp». *Aquaculture*, 476: 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.030>