

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR



**Efecto de *Bacillus* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en la  
inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp.**

TESIS

Para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero

Autor: Br. Kelvin Alexander Potosí Castillo

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR



**Efecto de *Bacillus* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en la  
inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp.**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

\_\_\_\_\_  
PRESIDENTE

Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña

\_\_\_\_\_  
SECRETARIA

Dra. Tessy Peralta Ortiz

\_\_\_\_\_  
VOCAL

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR



**Efecto de *Bacillus* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en la  
inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp.**

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y  
forma:

Br. Kelvin Alexander Potosí Castillo

---

EJECUTOR

Dr. Alberto Ordinola Zapata

---

ASESOR

Tumbes, 2024

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
VICERRECTORADO ACADEMICO  
FACULTAD DE INGENIERIA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

*"Año del Bicentenario, de la Consolidación de nuestra Independencia, y de la  
Commemoración de las Heroicas Batallas de Junín y Ayacucho"*

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Puerto Pizarro, al día ocho del mes marzo del dos mil veinticuatro, siendo las nueve horas, en el aula N° ocho de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES, se reunieron el Jurado Calificador, designado con Resolución N° 080-2021/UNTUMBES-FIPCM, Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON (Presidente), Dra. ENEDIA GRACIELA VIEYRA PEÑA (Secretaria) y Dra. TESSY PERALTA ORTIZ (Vocal), reconociendo en la misma resolución al Dr. Alberto Ordinola Zapata como asesor (CODIGO ORCID N° 0000-002-9674-0531) luego de la presentación, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: "Efecto de Bacillus spp. aislados de Litopenaeus vannamei en la inhibición in vitro e in vivo de Vibrio spp", para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO, presentado por el:

**Br. KELVIN ALEXANDER POTOSÍ CASTILLO**

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado, según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al Bachiller **KELVIN ALEXANDER POTOSÍ CASTILLO**, *aprobado*, con calificativo:

*Sobresaliente*

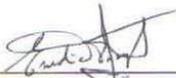
Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el Jurado le indica.

En consecuencia, queda *apto* para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Pesquero, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las *10* horas y *07* minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta de sustentación.

Tumbes, 08 de marzo del 2024

  
Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON  
CODIGO ORCID N° 0000-002-2921-4523  
DNI. N° 00250460  
Presidente

  
Dra. ENEDIA G. VIEYRA PEÑA  
CODIGO DE ORCID N° 0000-0001-6541-7075  
DNI. N° 002312236  
Secretaria

  
Dra. TESSY PERALTA ORTIZ  
CODIGO ORCID N° 0000-0001-5907-7713  
DNI. N° 00239840  
Vocal

C.C.:

- Jurado (03)  
- Interesado

- Asesor: Dr. A. ORDINOLA Z.  
- Archivo Decanato.

Los Ceibos S/N. Puerto Pizarro. Tumbes – Perú

## INFORME RESUMIDO DE TURNITIN

2024.02.24. Tesis Kelvin Alexander Potosi Castillo

### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>16%</b>	<b>16%</b>	<b>4%</b>	<b>6%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>6%</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Universidad Nacional de Tumbes</b> Trabajo del estudiante	<b>4%</b>
<b>3</b>	<b>boletin.invemmar.org.co</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.scielo.org.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>zagan.unizar.es</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>cibnor.repositorioinstitucional.mx</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>www.scribd.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<b>erp.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	

  
Dr. Alberto Ordinola Zapata  
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>  
Docente Asesor

		<1 %
10	<a href="https://repositorio.unal.edu.co">repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	<1 %
11	Ana Julia Rondón-Castillo, César A. Betancur-Hurtado, Marlen Rodríguez-Oliva, Agustín Beruvides-Rodríguez et al. "Probiotic activity of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and its mixture in broilers", Revista MVZ Córdoba, 2024 Publicación	<1 %
12	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
13	<a href="https://ri-ng.uaq.mx">ri-ng.uaq.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="https://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Fuente de Internet	<1 %
15	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1 %
16	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="https://repositorio.cientifica.edu.pe">repositorio.cientifica.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="https://riunet.upv.es">riunet.upv.es</a> Fuente de Internet	<1 %

  
 Dr. Alberto Ordínola Zapata  
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0551>  
 Docente Asesor

<1 %

19 [accesoabierto.uh.cu](http://accesoabierto.uh.cu)  
Fuente de Internet

<1 %

20 [revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe](http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe)  
Fuente de Internet

<1 %

21 [training.fema.gov](http://training.fema.gov)  
Fuente de Internet

<1 %



Dr. Alberto Ordínola Zapata  
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>  
Docente Asesor

Excluir citas      Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía      Activo

## DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada con todo mi amor y desde lo más profundo de mi corazón a Dios; por permitirme estar presente, darme fuerzas, iluminarme en esta vida llena de aprendizajes, esto me ha permitido llegar a finalizar otra etapa de vida necesaria para forjar un futuro profesional.

A mi querida madre, esposa, hijas y hermanos que durante todos estos años de estudio han estado siempre a mi lado apoyándome, orientándome y sobre todo demostrándome su cariño.

A mis abuelos, tíos y primos que siempre, y de forma sincera e incondicional me han brindado su apoyo, ánimos en aquellos momentos de angustia y desesperación.

Kelvin Alexander Potosí Castillo

## **AGRADECIMIENTO**

A mi estimado asesor Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su apoyo diario y permanente en mi tema de investigación a lo largo de mi carrera profesional; por sus consejos y recomendaciones, infinitas gracias mi estimado y gran amigo profesor.

A los miembros de jurado de esta investigación: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña y Dra. Tessy Peralta Ortiz, por sus constantes recomendaciones en el transcurso de esta investigación que sin duda alguna es un aporte para la ciencia.

A la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar por brindar acceso a todas sus instalaciones, proporcionando los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación de la mejor manera.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, que desde etapas muy tempranas inculcaron en mí conocimientos y la convicción de luchar por mis ideales esto ha permitido formar un profesional capaz de enfrentar la vida.

A los administrativos de esta casa superior de estudios que de alguna u otra forma me brindaron de su apoyo en la parte documentaria y tramites, a todos ellos muchas gracias.

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
2.1. Problemática del empleo de antibióticos en la acuicultura mundial y en el cultivo de langostino .....	19
2.2. Bacterias del género <i>Vibrio</i> .....	20
2.3. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> .....	21
2.4. Probióticos.....	22
2.5. <i>Bacillus</i> spp. ....	23
2.6. Investigaciones relacionadas.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
3.1. Material y equipo .....	28
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Obtención de langostino de cultivo y silvestres.....	30
3.2.2. Obtención de muestras de hemolinfa, hepatopáncreas e intestino .....	30
3.2.3. Cultivo de <i>Vibrio</i> spp.....	31
3.2.4. Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp .....	31
3.2.5. Confirmación de <i>Bacillus</i> spp.....	31
3.2.6. Purificación de cepas bacterianas .....	32
3.2.7. Conservación de cepas bacterianas .....	32
3.2.8. Ensayo de antibiograma de las cepas de <i>Vibrio</i> spp .....	33
3.2.9. Evaluación del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp .....	34
3.2.10. Identificación molecular de cepas bacterianas .....	35
3.2.11. Ensayo de inhibición de <i>Vibrio</i> spp. <i>in vivo</i> por <i>Bacillus</i> spp. ....	36
3.2.12. Plan de procesamiento y análisis de datos.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
4.1. Caracterización de las cepas presuntivas de <i>Vibrio</i> spp. aisladas de langostinos silvestres y de cultivo.....	40

4.2. Caracterización de cepas de <i>Bacillus</i> spp. aisladas de langostinos silvestres y de cultivo.....	41
4.3. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> spp. ....	42
4.4. Identificación de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Vibrio</i> spp. ....	44
4.5. Diámetro de halos de inhibición in vitro de bacterias aisladas de <i>Bacillus</i> spp. en <i>Vibrio</i> spp. ....	45
4.6. Supervivencia de langostino infectados con cepas de <i>Vibrio</i> spp. y tratados con cepas de <i>Bacillus</i> spp. ....	48
4.7. Conteo de <i>Vibrio</i> spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de <i>Bacillus</i> spp. ....	50
V. CONCLUSIONES .....	52
VI. RECOMENDACIONES .....	53
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Caracterización de las cepas presuntivas de <i>Vibrio</i> spp. ....	40
Tabla 2. Cepas de <i>Bacillus</i> spp. aisladas de langostino silvestre y de cultivo .....	42
Tabla 3. Características de resistencia antibiótica en cepas aisladas en TCBS (fenotípicamente compatibles o no con <i>Vibrio</i> spp.).....	42
Tabla 4. Porcentaje de resistencia antibiótica (resistentes, intermedias y sensibles) a diferentes antibióticos ensayados en cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	44
Tabla 5. Identificación molecular de cepas aisladas de <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i> .....	45
Tabla 6. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por el sobrenadante y el cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> : 3B, 60IB y 53IB en <i>Vibrio</i> spp.....	46
Tabla 7. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por el sobrenadante y el cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> : 58IB, 1B y 59IB en <i>Vibrio</i> spp.....	46
Tabla 8. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por el sobrenadante y el cultivo de las cepas de <i>Bacillus</i> : 37B, 54IB y 5B en <i>Vibrio</i> spp.....	47
Tabla 9. Diámetro promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por los tratamientos (cepas de <i>Bacillus</i> spp. aplicadas como sobrenadante y cultivo) en cepa de <i>Vibrio</i> spp. <i>in vitro</i> ..	47
Tabla 10. Carga de <i>Vibrio</i> spp. en hepatopáncreas de <i>L. vannamei</i> según tratamiento en el ensayo <i>in vivo</i> ..	51
Tabla 11. Diámetro de los halos de inhibición (mm) (media±DE) producidos por antibióticos en cepas aisladas en TCBS..	68
Tabla 12. Resistencia antibiótica en cepas aisladas en TCBS.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resistencia de cepas crecidas en TCBS a familias antibióticas..	43
Figura 2. Supervivencia de langostinos en la fase experimental según tratamiento. ....	49
Figura 3. Evolución de la carga promedio de <i>Vibrio</i> spp. en el hepatopáncreas de los langostinos en el ensayo <i>in vivo</i> .....	50
Figura 4. Obtención de ejemplares de langostino y de sus tejidos.....	70
Figura 5. Caracterización de cepas de <i>Bacillus</i> spp. ....	70
Figura 6. Antibiogramas en cepas de <i>Vibrio</i> spp. aislados de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	71
Figura 7. Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de la cepa 25 de <i>Vibrio</i> spp. por <i>Bacillus</i> spp. ....	71
Figura 8. Migración de amplicones en gel de agarosa de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias aisladas.....	71

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Diámetro de los halos de inhibición en cepas aisladas en TCBS..	68
Anexo 2. Resistencia antibiótica en cepas aisladas en TCBS.....	69
Anexo 3. Fotografías de la ejecución de la tesis. ....	70

# Efecto de *Bacillus* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en la inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp.

Br. Kelvin Alexander Potosí Castillo<sup>1</sup>  
Dr. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

## RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de *Bacillus* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en la inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos. Se obtuvieron langostinos de cultivo en una langostinera de Zarumilla y langostinos silvestres de canales de marea de Puerto Pizarro; de éstos se aislaron 26 cepas de *Bacillus* spp. y ocho cepas de *Vibrio* spp. Se evaluó la resistencia antibiótica de *Vibrio* spp. contra 10 antibióticos. Se realizó ensayo de inhibición *in vitro* utilizando el sobrenadante y cultivo de nueve de las cepas de *Bacillus* contra las ocho cepas de *Vibrio* spp. Luego se seleccionó dos de las cepas de *Bacillus*: *Bacillus licheniformis* (53IB) y *Bacillus amyloliquefaciens* (37B) y se enfrentaron contra dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (cepas Lang 60 y 25) en ensayo *in vivo*. Las cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes entre 1 a 3 de los antibióticos ensayados. Casi todas las cepas de *Bacillus* spp., excepto el sobrenadante de la cepa 5B inhibieron *in vitro* a *Vibrio* spp.; los sobrenadantes inhibieron más que los cultivos y ocho de las cepas de *Bacillus* spp. entre ellas 37B y 53IB mostraron la máxima inhibición. En el ensayo *in vivo*, las cepas 37B y 53IB inhibieron el crecimiento de las cepas de *Vibrio* Lang 60 y 25 en el hepatopáncreas de *L. vannamei*, con la misma eficiencia que la oxitetraciclina. Asimismo la supervivencia de los langostinos infectados por *Vibrio* spp. y tratados con las cepas de *Bacillus* spp. fue estadísticamente similar a la lograda con oxitetraciclina. Se concluye que las cepas de *Bacillus* spp. nativas son capaces de controlar la infección por *Vibrio* spp. al mismo nivel que la oxitetraciclina, siendo una alternativa ambientalmente amigable y de menor impacto que ésta.

**Palabras clave:** *Bacillus* spp., alternativas a antibióticos, acuicultura de camarón, probiótico, vibriosis, resistencia bacteriana.

---

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

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

Tesis presentada para obtener el título profesional de Ingeniero Pesquero  
Universidad Nacional de Tumbes

Facultad de Ingeniería Pesquera y ciencias del mar  
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera  
Calle Los Ceibos S/N Puerto Pizarro, Tumbes, Perú  
e-mail: kelvincastillo093@gmmail.com  
2024

## Effect of *Bacillus* spp. isolated from *Litopenaeus vannamei* on the *in vitro* and *in vivo* inhibition of *Vibrio* spp.

Br. Kelvin Alexander Potosí Castillo<sup>1</sup>  
Dr. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The aim of this research was to determine the effect of *Bacillus* spp. Isolated from *Litopenaeus vannamei* in the *in vitro* and *in vivo* inhibition of *Vibrio* spp. resistant and sensitive to antibiotics. Farmed shrimps were obtained in a shrimp farm in Zarumilla and wild shrimps were obtained from tidal channels in Puerto Pizarro; from these, 26 strains of *Bacillus* spp. and eight strains of *Vibrio* spp. were isolated. The antibiotic resistance of *Vibrio* spp. against 10 antibiotics was determined. An *in vitro* inhibition test was performed using the supernatant and culture of nine of the *Bacillus* strains against the eight *Vibrio* spp. strains. Then two of the *Bacillus* strains were selected: *Bacillus licheniformis* (53IB) and *Bacillus amyloliquefaciens* (37B) and they were pitted against two strains of *Vibrio parahaemolyticus* (Lang strains 60 and 25) in an *in vivo* assay. The strains of *Vibrio* spp. were resistant to between 1 to 3 of the antibiotics tested. Almost all *Bacillus* spp. strains, except the supernatant of strain 5B, inhibited *Vibrio* spp. *in vitro*; the supernatants inhibited more than the cultures and eight of the *Bacillus* spp. among them 37B and 53IB showed the maximum inhibition. In the *in vivo* assay, strains 37B and 53IB inhibited the growth of *Vibrio* strains Lang 60 and 25 in the hepatopancreas of *L. vannamei*, with the same efficiency as oxytetracycline. Likewise, the survival of shrimp infected by *Vibrio* spp. and treated with strains of *Bacillus* spp. was statistically similar to that achieved with oxytetracycline. It is concluded that the strains of *Bacillus* spp. natives are capable of controlling infection by *Vibrio* spp. at the same level as oxytetracycline, being an environmentally friendly alternative with less impact than it.

**Keywords:** *Bacillus* spp., alternatives to antibiotics, shrimp aquaculture, probiotic, vibriosis, bacterial resistance.

---

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

<sup>2</sup> Principal Professor of the Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

Thesis presented to obtain the professional title of Ingeniero Pesquero

Universidad Nacional de Tumbes

Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar

Escuela de Ingeniería Pesquera

Los Ceibos S/N Street, Puerto Pizarro, Tumbes, Peru

e-mail: kelvincastillo093@gmail.com

2024

## I. INTRODUCCIÓN

El mayor problema al cual se enfrenta la acuicultura en la actualidad son las enfermedades infecciosas que según el Banco Mundial originan miles de millones de dólares en pérdidas anuales (World Bank, 2014). Las principales enfermedades infecciosas en la acuicultura son originadas por virus y bacterias, y entre estas últimas una de las más frecuentes son las producidas por bacterias del género *Vibrio* (Flegel et al., 2008; Krishnani et al., 2015). Para tratar tales enfermedades se hace uso y más a menudo abuso de antibióticos, así Done et al. (2015) señalan un caso en Chile en 2003, en el que se hizo uso de 500 gramos de antibióticos por cada tonelada de salmón producido; como se evidencia, el uso indiscriminado de antibióticos origina un agudo impacto ambiental.

El uso excesivo e inadecuado de antibióticos afecta también al cultivo de peneidos, en éste se ha usado como un tratamiento preventivo (profiláctico) de enfermedades originadas por bacterias e incluso por virus, siendo en este último caso completamente inefectivo (Letchumanan et al., 2015; Luis-Villaseñor et al., 2015). Entre las enfermedades en que se utilizan antibióticos se hallan las originadas por *Vibrio* spp., lamentablemente la aplicación indiscriminada de antibióticos ha favorecido el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos; así existen varias investigaciones que han encontrado cepas de *Vibrio* spp. resistentes a algún antibiótico, e incluso ya existen reportes de cepas que son multirresistentes (Krishnani et al., 2015; Stalin & Srinivasan, 2016; Watts et al., 2017).

La presencia de cepas de *Vibrio* spp. que muestran resistencia a los antibióticos hacen que dichos antibióticos utilizados tradicionalmente en el tratamiento de vibriosis tengan una menor eficacia, además constituyen una amenaza a la salud del ser humano pues dichas cepas al ser ingeridas con los alimentos podrían compartir sus genes de resistencia antibiótica a bacterias que originan enfermedades en humanos, lo que podría representar un serio problema de salud

(Jeyasanta et al., 2017; Millanao et al., 2011; Shakerian et al., 2018). Por lo antes señalado, es que hay una constante búsqueda de soluciones alternativas al uso de antibióticos en la acuicultura, habiéndose investigado entre otros suplementos dietarios, fitobióticos, prebióticos, simbióticos y probióticos. Los probióticos son microorganismos que al ser ingeridos proporcionan mejora en la salud del huésped, son una de las alternativas más prometedoras y de éstas, en el caso del cultivo de langostinos, algunas de las más utilizadas corresponden a *Bacillus* spp. que ha mostrado inhibir eficazmente a *Vibrio* spp., adicionalmente producen enzimas que ayudan a descomponer los alimentos y transformarlos en moléculas más fáciles de absorber en el intestino, así como al ser bacterias productoras de esporas se pueden almacenar en un producto deshidratado, lo que es conveniente para poder almacenar y distribuir un probiótico (Obando & Suárez, 2015; Rodríguez, 2017).

Esta tesis tuvo el siguiente objetivo:

Determinar el efecto de *Bacillus* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei* en la inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Problemática del empleo de antibióticos en la acuicultura mundial y en el cultivo de langostino

El mayor problema que tiene la acuicultura mundial son las pérdidas económicas que generan las enfermedades producidas por agentes patógenos en los cultivos (Santiago et al., 2009); dichas pérdidas fueron de casi US\$ 6000 millones en el año 2014 (World Bank, 2014). Las enfermedades que afectan a los cultivos acuícolas producen un considerable impacto económico, mismo que también afecta a la acuicultura de peneidos; así según Flegel et al. (2008), en el año 2001 hubo una pérdida de US\$ 1000 millones por dicha causa. Gran parte de las enfermedades que afectan a peneidos son ocasionadas por bacterias oportunistas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Zheng et al., 2016), siendo estas últimas las que mayores mortalidades originan en los langostino cultivados (Flegel, 2012). Las bacterias de este género se hallan entre las que más frecuentemente se hallan en el cuerpo del langostino, estando presentes a nivel interno en el hepatopáncreas, intestino, branquias y a nivel externo sobre su exoesqueleto, en algunos casos también pueden estar presentes en la hemolinfa (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014). Las enfermedades causadas por *Vibrio* spp. son tratadas frecuentemente con antibióticos, que son sustancias producidas por microorganismos o modificaciones químicas de las mismas, aunque también se han desarrollado antibióticos completamente sintéticos (Santiago et al., 2009); los antibióticos actúan como bacteriostáticos, frenando el crecimiento de los patógenos pero sin matarlos; o como bactericidas destruyendo a las bacterias. Aunque algunas otras sustancias químicas reúnen estas características, por ejemplo los desinfectantes (alcohol, hipoclorito de sodio, etc.); lo que los diferencia de los antibióticos es que la toxicidad de los antibióticos para el hospedero es muy baja comparada con la de los desinfectantes, por lo que pueden utilizarse para inhibir las bacterias que se localizan al interior del organismo del hospedero (Martínez, 2018). Antibióticos tales como florfenicol, enrofloxacin y oxitetraciclina se usan

habitualmente en los cultivos de *L. vannamei* para controlar a *Vibrio* spp. (Otero, 2018).

## 2.2. Bacterias del género *Vibrio*

Las bacterias de este género se hallan muy diseminadas en los ecosistemas marinos y del manglar, normalmente son constituyentes habituales de la flora bacteriana del langostino, pero pueden convertirse en patógenos oportunistas altamente nocivos que produce mortalidades de hasta el 100% de la población cultivada de langostinos cuando estos están debilitados (Lin et al., 2018; Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014; Morales-Covarrubias, 2008). Existen más de 110 especies dentro del género *Vibrio* (Lin et al., 2018), algunas de ellas originan fuertes infecciones en el langostino como es el caso de: *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio splendidus* (Nimrat et al., 2008; Rebouças et al., 2011; Serrano, 2014). Las bacterias del género *Vibrio* se caracterizan por que son bacilos (rectos o curvos), aeróbicos o anaeróbicos facultativos, Gram negativos, presentan un pequeño tamaño (siendo menores a 2,6  $\mu\text{m}$ ), en cultivos de laboratorio, generalmente se les aprecia como varillas rectas, al ser cultivados en medio sólido, muestran un flagelo polar monotrico, el mismo que cambia a multitrico en medio líquido. En cuanto a sus características bioquímicas, son oxidasa positivas y requieren de sodio (entre 0,029 a 4,1% de NaCl, con una concentración óptima de 2,0 a 2,5%). Muchas de sus especies metabolizan el nitrato convirtiéndolo en nitrito, poseen enzimas catalasas y oxidasas, son capaces de metabolizar la glucosa pero sin producción de gas, además pueden emplear a la quitina presente en crustáceos como fuente de carbono para su crecimiento (Lin et al., 2018; Serrano, 2014; Silva et al., 2008). Una forma rápida de identificar a *Vibrio* spp. es por su capacidad de prosperar en medios no selectivos como el agar marino así como en medios diferenciales y selectivos como el agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Thompson et al., 2004).

### 2.3. Resistencia antibiótica de *Vibrio*

Como se ha mencionado, los antibióticos son sustancias que son producidas naturalmente por microorganismos para inhibir a otros microorganismos, como tal, su aparición sobre la tierra puede haberse dado desde hace mucho tiempo, así por ejemplo se han descubierto en sedimentos datados más de 30 000 años, ADN que muestra la existencia de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas y glucopéptidos. Esto indica que, como adaptación selectiva, los genes de resistencia se desarrollan como una respuesta a los antibióticos, por lo que dado que en la actualidad el uso de antibióticos tanto los generados naturalmente por microorganismos como los producidos sintética o semi sintéticamente por el ser humano impulsan al desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos (Santos, 2017).

A pesar de que la concepción general fue que las bacterias del género *Vibrio* eran muy sensibles a los antibióticos, sin embargo, en la actualidad se ha reportado de manera más frecuente casos de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos, lo cual se atribuye al uso inadecuado de los antibióticos que se da en medicina, agricultura y acuicultura; aunque en la acuicultura no se usa como promotores de crecimiento a los antibióticos, estos si se emplean como profilácticos para prevenir enfermedades incluso las virales, lo que constituye una práctica inadecuada, debido a ello la resistencia a los antibióticos usados para combatir a *Vibrio* spp. tales como orfluoroquinolona, doxiciclina, tetraciclina, ceftazidima, cefotaxima, cefuroxima y cefalotina, están en franco aumento (Albuquerque et al., 2015; Jeyasanta et al., 2017; Rico et al., 2017; Shakerian et al., 2018; Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

Casos de resistencia a antibióticos en *Vibrio* spp. aislados del cultivo de langostinos han sido reportados en particular en cepas de *Vibrio cholerae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio campbelli*, algunas de las cuales incluso son multiresistentes (Stalin & Srinivasan, 2016); las cepas antes mencionadas pueden transferir sus genes de resistencia a otras cepas ya sea de *Vibrio* o de bacterias no emparentadas; es por ello que, se propicia el uso de probióticos en vez de antibióticos en el cultivo (Balcazar et al., 2006).

## 2.4. Probióticos.

Una definición actual sobre probióticos la expresan Javadi & Khatibi (2017), quienes indican que éstos son cultivos de microorganismos mono o multiceparios que cuando son ingeridos por el huésped le proporcionan beneficios, pues mejoran la composición de su flora bacteriana nativa. Los probióticos se aplican en la dieta o en el agua de cultivo; en el primero de los casos se busca mejorar la salud de los organismos de cultivo, mientras que en el segundo lo que se busca es dar mayor calidad al agua empleada en el cultivo. Debido a estas características favorables es que los probióticos se han constituido en una de las mejores opciones para evitar el uso de antibióticos en el campo acuícola. En el caso de los langostinos en cultivo, los probióticos mejoran el balance de su flora bacteriana intestinal, puesto que las cepas probióticas colonizan el intestino y desplazan a las bacterias patógenas, privándolos de sitios de adhesión, también compiten con los patógenos por nutrientes y producen peróxido de hidrógeno, lisozimas, bacteriocinas, proteasas, sideróforos que inhiben a las bacterias patógenas; adicionalmente algunas cepas probióticas modifican el pH del intestino haciéndolo más ácido, pues producen ácidos orgánicos (Quispe, 2017). La selección de una cepa bacteriana potencialmente probiótica, requiere que ésta cumpla con ciertas características, por ejemplo no debe ser patógena sino que debería combatir a los patógenos (Javadi & Khatibi, 2017; Lamari et al., 2014). Los probióticos usados en acuicultura generalmente proceden de la comunidad de bacterias presentes en el intestino del huésped o de otros animales acuáticos del entorno; en los organismos marinos los géneros bacterianos que prevalecen corresponden a *Pseudomonas* y *Vibrio*, en tanto que en los dulceacuícolas, prevalecen las enterobacteriáceas: *Plesiomonas* y *Aeromonas*, así como Bacteroides, y especies de *Eubacterium* y *Fusobacterium*; a pesar que las bacterias del género *Bacillus* no son muy abundantes en el intestino de animales acuáticos; sin embargo, algunas de sus especies han mostrado un poder probiótico considerable y han sido utilizados ampliamente como probióticos comerciales (Balcazar et al., 2006; Pérez-Sánchez et al., 2014).

## **2.5. *Bacillus* spp.**

Los probióticos comerciales empleados en cultivos acuícolas generalmente están preparados en base a cepas de bacterias ácido lácticas tales como *Carnobacterium* y *Lactobacillus*, así como por *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Bacillus*; éstas últimas son bacilos Gram positivos, capaces de formar esporas ante condiciones ambientales adversas, la mayoría de sus cepas no son patógenas y se utilizan para producir metabolitos importantes tales como antibióticos y enzimas; Las cepas de *Bacillus* con capaces de inhibir cepas de bacterias patógenas, pues compiten con ellas por espacio y pueden modular la respuesta inmune del huésped, al incrementar la producción de peroxinectinas , superoxidasas y fenoloxidasas (Pérez-Sánchez et al., 2014).

Muchas de las cepas probióticas de *Bacillus* corresponden a especies tales como *B. cereus*, *B. clausi*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* and *B. subtilis*. Así por ejemplo una cepa de *Bacillus subtilis* aislada del robalo común (*Centropomus undecimalis*), inoculada en el agua de cultivo de alevines de robalo eliminó a las especies de *Vibrio* presentes en ella (Pérez-Sánchez et al., 2014).

## **2.6. Investigaciones relacionadas**

Varias investigaciones se han realizado evaluando el poder probiótico de cepas de *Bacillus* sp. en cultivos acuícolas, algunas de ellas se exponen a continuación:

Nimrat et al. (2008), investigaron el efecto de un probiótico (probiótico A) basado en *Bacillus* sp. en la calidad del suelo posterior al cultivo de *Penaeus monodon*, para ello realizaron un experimento en el que colocaron en tanques de fibra de vidrio, suelo del estanque recubierto del fango negro que queda en el estanque al finalizar la campaña. Se ensayaron cinco tratamientos, el último de los cuales incluyó secado al sol y labranza aplicando el probiótico A. Al finalizar el experimento concluyeron que el secado al sol y la labranza con el probiótico A fueron los mejores métodos para remover *Vibrio* y *Pseudomonas* de los fondos del estanque que contienen limo orgánico, demostrando la utilidad de la cepa de *Bacillus* sp. en el control de *Vibrio* y *Pseudomonas* en los fondos del estanque.

Liu et al. (2010), evaluaron el poder probiótico de una cepa de *B. subtilis* denominada E20, en el crecimiento, supervivencia, estado inmune y resistencia al estrés en larvas de *L. vannamei*. Aplicaron cada 3 días y por todo el periodo de cultivo (14 días), *B. subtilis* al agua de cultivo en dosis de  $10^8$  y  $10^9$  UFC/ml, adicionalmente tuvieron un tratamiento testigo en que no se aplicó. Se apreció al final del experimento que el crecimiento de las larvas fue estadísticamente superior en el tratamiento en el que se aplicó  $10^9$  UFC de *B. subtilis*, se observó que las bacterias totales y *Vibrio* en el agua fueron fuertemente inhibidas cuando se aplicó *Bacillus subtilis*. Por otro lado, en el ensayo de resistencia al estrés, las larvas mostraron excelentes resultados pues no se produjo mortalidad de las mismas cuando el agua de cultivo se enfrió desde 30 °C hasta 2 °C (tasa de disminución de 0,1 °C/min); así también, cuando a las larvas de los tratamientos con *B. subtilis* se les expuso a una salinidad alta (60‰) y baja (equivalente a agua dulce), su mortalidad acumulada fue significativamente menor. En base a los resultados observados los investigadores concluyeron que la cepa E20 de *Bacillus subtilis* administrada al agua en dosis de  $10^9$  UFC/ml es una prometedora cepa probiótica para el cultivo larvario de *L. vannamei*.

Nimrat et al. (2012), investigaron el efecto de dos probióticos (probiótico A y B) basados en *Bacillus* spp. aislados del intestino de *Penaeus monodon*, administrado en tres formas: como cepa seca y congelada, como microencapsulado o bioencapsulado en *Artemia* sp. Estas formas de administración y cepas fueron probadas respecto a su efecto en el recuento bacteriano, calidad de agua y crecimiento en larvas y poslarvas de *L. vannamei*. El experimento con larvas mostró que ni las cepas ni las formas de administrar el probiótico tuvieron influencia en las variables estudiadas, pero en el caso del experimento con poslarvas si hubo una diferencia; de manera general, todos los tratamientos con probióticos mostraron mejores resultados respecto a crecimiento y supervivencia que el tratamiento control; respecto a las formas de administración de los probióticos, resultó más efectiva la aplicación del mismo mediante microencapsulados.

Zokaeifar et al. (2012), evaluaron el efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* (L10 y G1) en la resistencia a enfermedades en *L. vannamei*, para ello realizaron un experimento en el que administraron a langostinos, por ocho semanas, alimento

balanceado con una mezcla de las dos cepas de *Bacillus subtilis* en iguales proporciones y a concentraciones de  $10^5$  (BM5) y  $10^8$  UFC/g (BM8), teniendo como control, a langostinos alimentados con alimento balanceado, pero sin las cepas indicadas. Los resultados mostraron que el crecimiento y supervivencia fueron superiores en los tratamientos con las cepas de *Bacillus subtilis*; sin embargo, no hubo diferencia en el factor de conversión alimenticio (FCA) entre éstos y el tratamiento control. Luego de este lapso, se desafió los langostinos con *Vibrio harveyi* y se halló que la mortalidad fue significativamente mayor en el control (63,3%) que en los tratamientos con *Bacillus subtilis* (BM5 con 20,0% y BM8 con 33,3%), concluyendo que ambas cepas de *Bacillus subtilis* pueden mejorar el crecimiento y la resistencia a enfermedades en *L. vannamei*.

Jayaseelan et al. (2013) evaluaron el efecto inhibitorio de siete cepas (Dahb1 a Dahb7) de *Bacillus licheniformis* obtenidas de probióticos comerciales contra 162 cepas patógenas de *Vibrio* spp. (*Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* y *Photobacterium damsela*) obtenidas de *hatcheries* y cultivos de engorde de *Penaeus monodon*. El ensayo de actividad vibriostática se hizo en pozo de agar, para ello 50  $\mu$ l del caldo de cultivo de cepas de *Vibrio* spp. crecidas por 24 h en caldo Luria Bertani (LB) a 28 °C (concentración de  $10^{-3}$  UFC/ml) fue esparcido sobre placas de agar. Las cepas de *Bacillus licheniformis*, fueron cultivadas en caldo Man Rogosa Sharp (MRS) con 2% de caldo glucosa a 37 °C por tres días. Las cepas se centrifugaron a 9600 xg por 15 minutos, el sobrenadante fue recuperado, se ajustó su pH a 7 y se filtró con membrana de 0,22  $\mu$ m para obtener un extracto libre de células. 100  $\mu$ l de estos extractos fueron colocados en pozos excavados en las placas de agar. Los resultados mostraron que el extracto libre de células de la cepa de *Bacillus licheniformis* Dab1 fue la que mayor poder inhibitorio tuvo en *Vibrio* spp. con halos de inhibición que midieron entre 6 a 12 mm. Concluyendo que la cepa de *Bacillus licheniformis* podría utilizarse como probiótico en la acuicultura de *Penaeus monodon*.

Harpeni et al. (2018), evaluaron el poder probiótico de *Bacillus* sp. (cepa D2.2) y del prebiótico extracto de camote en el crecimiento y resistencia a *Vibrio harveyi* de *L. vannamei* para ello utilizaron 360 ejemplares de langostino (PL15, con peso de  $0,02 \pm 0,002$  g) los que fueron alimentados con dieta basal como control

(tratamiento A), con dieta suplementada con 6% del probiótico y 0% del prebiótico (tratamiento B), con dieta suplementada con 6% del probiótico y 2% del prebiótico (tratamiento C) o con dieta suplementada con 6% del probiótico y 4% del prebiótico (tratamiento D); las dietas fueron preparadas mezclando fuertemente el prebiótico y probiótico con 2% de yema de huevo como ligante, se aplicó la mezcla al alimento y se dejó secar al aire a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas plásticas hasta su uso. Luego de 32 días se evaluó el crecimiento (como ganancia de peso), el incremento de peso diario y la supervivencia, encontrándose que el tratamiento D (6% del probiótico y 4% del prebiótico) produjo los mejores resultados. En la siguiente fase se seleccionó a los tratamientos control (A) y el tratamiento D, para realizar un desafío con *Vibrio harveyi*, para ello se utilizaron 240 langostinos (PL25) que fueron colocados en ocho tanques (cuatro para A y cuatro para D), se alimentó siete días según los tratamientos y luego fueron infectados por inmersión en agua conteniendo  $10^6$  UFC/ml de *Vibrio harveyi*, los resultados mostraron similares supervivencias entre ambos tratamientos, sin embargo el tratamiento con probióticos mostró ayudar a reducir las lesiones originadas por *Vibrio harveyi* en el hepatopáncreas de los langostinos. Los autores concluyeron que *Bacillus* sp. mejora el crecimiento y ayuda a proteger al langostino frente a *Vibrio harveyi*.

Gobi et al. (2016), investigaron el efecto protector de *Bacillus licheniformis* cepa Dahbli en el crecimiento y respuesta inmune y antioxidante del bagre *Pangasius hypophthalmus* desafiado con *Vibrio parahaemolyticus*, para ello se realizó un experimento en tres grupos, en el primero los bagres recibieron 1 ml de *Vibrio parahaemolyticus* a las dosis de  $10^5$  UFC/ml y  $10^7$  UFC/ml; en el segundo los bagres recibieron 1 ml de *Bacillus licheniformis* a las mismas dosis de  $10^5$  UFC/ml y  $10^7$  UFC/ml y en el tercer grupo se administró a los bagres de 1 ml de *Vibrio parahaemolyticus* a las dosis de  $10^5$  UFC/ml y  $10^7$  UFC/ml, seguido de la administración de *Bacillus licheniformis* a las mismas dosis. Se encontró que el crecimiento y la respuesta inmune y antioxidante del bagre disminuyó cuando recibió únicamente las dosis de *Vibrio parahaemolyticus*, pero se incrementaron cuando recibieron las dosis de *Bacillus licheniformis* ya sea sólo o luego de la aplicación de *Vibrio parahaemolyticus*, Concluyendo que *Bacillus licheniformis* puede incrementar el crecimiento y reducir la infección por *Vibrio parahaemolyticus* al incrementar la respuesta inmune y antioxidante de *Pangasius hypophthalmus*.

Si bien es cierto hay varias investigaciones internacionales que muestran el poder inhibitor de *Bacillus* contra *Vibrio* aislados de diversos organismos acuáticos, sin embargo luego de consultar la literatura científica, no se pudo encontrar alguna investigación que haya tratado sobre tal temática a nivel local o regional.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material y equipo

##### Material biológico

- 25 langostinos *Litopenaeus vannamei* de cultivo.
- 10 langostinos *Litopenaeus vannamei* silvestres.
- 150 juveniles de *Litopenaeus vannamei* de cultivo.

##### Materiales y equipos de laboratorio

- 400 microtubos de centrifuga de 1,5 ml
- 400 microtubos de 0,2 ml
- 1 bolsa de 1000 unidades de puntas para micropipeta de 10  $\mu$ l
- 1 bolsa de 1000 unidades de puntas para micropipeta de 100  $\mu$ l
- 1 bolsa de 1000 unidades de puntas para micropipeta de 200  $\mu$ l
- 1 bolsa de 1000 unidades de puntas para micropipeta de 1000  $\mu$ l
- 2 rollos de papel aluminio
- 1 bolsa de algodón
- 4 matraces de 1000 ml
- 2 probetas de 500 ml
- 1 juego de micropipetas de rangos entre: 100 a 1000  $\mu$ l, 20 a 200  $\mu$ l, 10 a 100  $\mu$ l y 0,5 a 10  $\mu$ l
- 70 placas Petri de vidrio
- 15 tubos falcon de 50 ml
- 50 láminas porta objeto
- 1 asa de kolle
- 1 asa de barrido
- 40 hojas de bisturí
- 4 rollos de papel kraft
- 1 estuche de disección
- 2 l de hipoclorito de sodio al 5%
- 2 litros de alcohol al 96%

- 100 unidades de papel filtro Whatman
- Filtros de membrana estériles de politetrafluoretileno (PTFE) de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro
- 1 autoclave marca Biobase modelo BKKQ-B50II
- 1 centrifuga marca Orto Alresa modelo CE113
- 1 agitador vórtex marca Topscien modelo TM-Mivot
- 1 baño maría
- 1 termociclador marca Applied Biosystem modelo SimpliAmp
- 1 microscopio marca Olympus modelo CX31RBSFA
- 1 estufa marca Mermmert modelo SN75
- 1 incubadora marca Mermmert modelo IN75
- 1 balanza electrónica con 0,1 g de precisión
- 1 equipo de electroforesis marca Cleaver scientific modelo CS 300V

#### Reactivos

- 500 g de cloruro de sodio
- 500 g de agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS)
- 500 g de agar tripticasa soya (TSA)
- 300 g de agar Merck Rogosa Sharp (MRS)
- 300 g de caldo MRS
- 200 g de medio de cultivo en caldo TSB
- 60 µl de agua ultra pura
- 30 µl de proteinasa K
- 150 µl de taq polimerasa
- 150 µl de mix de desoxiribonucleóticos trifosfato (dNTPs)
- 1 frasco de solución buffer de PCR
- 150 g de agarosa
- 60 ml de buffer tris ácido acético EDTA (TAE) 50X
- 1 kit de tinción de Gram
- 100 g de verde de malaquita

#### Material de limpieza

- 5 rollos de papel toalla
- 500 g de detergente

- 2 l de hipoclorito de sodio al 5% (lejía)

### **3.2. Métodos**

#### **- Obtención de langostinos de cultivo y silvestres.**

Se obtuvieron 25 langostinos de cultivo, los cuales fueron proporcionados por la empresa langostinera Jardlec del sector Chacra Gonzales de la provincia de Zarumilla, se colectaron 10 langostinos con peso promedio de 9,5 g y longitud promedio de 11,1 cm en el estanque 3 y 15 langostinos con peso promedio de 8,9 g y longitud promedio de 11,1 cm en el estanque 5. También se recolectaron 10 langostinos silvestres de la zona de Puerto Pizarro, con peso promedio de 7,1 g y longitud promedio de 10 cm, los cuales fueron trasladados en baldes de 12 litros (con aireación provista por un aireador portátil) hasta el Laboratorio de Microcultivos de la FIPCM como se aprecia en la figura 4a y 4b de anexos.

#### **3.2.1. Obtención de muestras de hemolinfa, hepatopáncreas e intestino.**

Los datos de langostinos recolectados de cultivo y silvestres fueron registrados en una hoja de Excel; el peso y características externas como heridas, coloración, erosiones entre otras. Posterior a ello se obtuvieron muestras de hemolinfa del seno ventral del mismo, el cual se precargó una jeringa de un 1 ml colocándole 0,1 ml de anticoagulante (citrato de sodio al 10%)(figura 4c en anexos), por otro lado se taró un microtubo de 1,5 ml para extraer un fragmento de 0,1 g de hepatopáncreas; de manera similar también se tomó una muestra de intestino y se colocó en un microtubo de centrifuga 1,5 ml. Las muestras de hepatopáncreas e intestino fueron trituradas con maceradores estériles adicionándosele solución salina al 2,5% hasta alcanzar 1 ml.

#### **3.2.2. Cultivo de *Vibrio* spp.**

En principio se procedió a aislar las cepas de *Vibrio* spp. por lo que se tomó 100 µl de la muestra recolectada de hemolinfa y se sembró en una placa petri conteniendo agar TCBS. La siembra se realizó por extensión usando un asa de siembra. Las muestras de tejidos sólidos (intestino y hepatopáncreas)

fueron trituradas con maceradores esterilizados en los microtubos de centrifuga de 1,5 ml éstos fueron designados como solución madre, posteriormente se realizaron diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ . La siembra se realizó tomando 100  $\mu$ l de cada dilución y sembrándolas en agar TCBS. Las placas petri sembradas fueron incubadas en posición invertida por 24 h a 37 °C.

### **3.2.3. Aislamiento de *Bacillus* spp.**

Se empleó la metodología de Obando & Suárez (2015), a la cual se realizó modificaciones, se tomó una porción del intestino medio y posterior del langostino, a continuación el intestino fue colocado en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml con caldo TSB suplementado con NaCl al 2,5%, después la muestra fue sometida a *shock* térmico, colocándola en baño maría a 71 °C por 5 minutos, de esta forma se propició el desarrollo de *Bacillus* spp., que poseen esporas termotolerantes que soportan temperaturas de 71 °C. Los microtubos con la muestra que recibió el *shock* térmico fueron incubados por 24 h a 37 °C, finalmente se realizó diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ , mismas que fueron sembradas por agotamiento en placas petri conteniendo TSA, luego fueron selladas con papel parafinado e incubadas a 37 °C por 24 h en posición invertida.

### **3.2.4. Confirmación de cepas de *Bacillus* spp.**

Se siguió la metodología de Obando & Suárez (2015), con ciertas modificaciones, como se especifican a continuación:

#### **1. Observación de la morfología de sus colonias.**

Se observó las colonias más representativas crecidas en TSA, se buscó las colonias con las características morfológicas compatibles a *Bacillus* spp., como tener forma de abanico, tener consistencia cremosa, seca o húmeda, lisas o rugosas y con bordes dentados y con crecimiento en masa (figura 5b de anexos); estas características fueron registradas en formatos en excel.

## **2. Observación de la morfología celular**

En esta etapa se tomó las colonias más representativas cuya morfología fue compatible con *Bacillus* spp., a éstas se les realizó una tinción de Gram para observar la morfología de sus células, las cuales fueron observadas en un microscopio a una resolución de 1000X, buscando bacterias con forma de bastones y coloración púrpura que son características de bacilos gram positivos (figura 5c de anexos).

## **3. Observación de la morfología de las endosporas**

De las cepas que se sospecharon correspondieron a *Bacillus* spp. se tomó una muestra de la superficie de la colonia, a ésta se le aplicó la tinción de Wirtz-Conklin (Schaeffer-Fulton) consistente en teñirla con solución de verde de malaquita al 5% y observarla al microscopio buscando la presencia de endosporas que es una característica de *Bacillus* spp. (figura 5a de anexos).

## **4. Producción de catalasa**

De las colonias cuya morfología celular y de la espora indicaron que pudieron corresponder a *Bacillus* spp. (bacilos Gram positivos y endosporas), se tomó una muestra de la superficie de la colonia y con ella se realizó la prueba de catalasa, para ello la muestra de la colonia se colocó sobre un portaobjeto y se le adicionó una gota de agua oxigenada (solución al 3% de peróxido de hidrógeno), luego se observó si se produjo burbujeo, indicador que la cepa fue catalasa positiva, que es una característica de las cepas de *Bacillus* sp.

Las cepas que cumplieron con las características de morfología colonial, celular, portar endosporas y ser catalasas positivas se consideraron cepas de *Bacillus* sp.

### **3.2.5. Purificación de cepas bacterianas.**

Las cepas que crecieron en medio TCBS y en MRS fueron purificadas sembrándolas por método de agotamiento en placas petri con TSA, las placas fueron selladas con cinta parafilm y se dejaron incubar por 24 h a 37 °C. Se observó la forma de las colonias, en caso dichas colonias tuvieron la misma morfología, se les consideró puras; caso contrario, se volvió a sembrar

sucesivamente las subcolonias en TSA, hasta obtener colonias de morfología similar, que es el indicador de que las mismas fueron cepas puras.

### **3.2.6. Conservación de cepas bacterianas.**

Las cepas de *Bacillus* y *Vibrio* se cultivaron en caldo TSB por 24 h a 37 °C; se prepararon tres microtubos de 1,5 ml con caldo TSB, en cada uno de los cuales se sembró 10 µl de la suspensión bacteriana del primer microtubo. Los tres microtubos se incubaron por 24 h a 37 °C, luego se les adicionó glicerol helado (concentración final: 15%) y se les conservó a -20 °C.

### **3.2.7. Ensayo de antibiograma de las cepas de *Vibrio* spp.**

Se reactivaron las cepas conservadas y se sembraron en microtubos de 1,5 ml con 1 ml de TSB por 24 h o mayor cantidad de tiempo hasta que las cepas mostraron turbidez superior a la del estándar de MacFarland 0,5.

Las bacterias que crecieron en los microtubos se centrifugaron a 10 000 xg por 3 min para obtener un *pellet* bacteriano, el cual se resuspendió en solución salina (2,5% de NaCl) en cantidad suficiente para que la cepa mostrara una turbidez equivalente a la del estándar de MacFarland 0,5 (alrededor de  $1,5 \times 10^8$  cél./ml). 100 µl de la suspensión de la cepa estandarizada se sembró extendiéndola con un asa de drigalski en placas petri con agar Müller-Hinton. Se colocaron en la placa sembrada, discos antibióticos correspondientes a 10 antibióticos de 7 familias antibióticas:

Familia penicilinas: Ampicilina (10 µg).

Familia fosfonatos: Fosfomicina (50 µg).

Familia fenicoles: Cloranfenicol (30 µg).

Familia tetraciclinas: Oxitetraciclina (30 µg) y tetraciclina (30 µg).

Familia aminoglucósidos: Estreptomicina (10 µg) y gentomicina (10 µg)

Familia quinolonas: Ácido nalidíxico (30 µg) y enrofloxacina (5 µg).

Familia Macrólidos: Azitromicina (15 µg).

Las placas luego de ser incubadas por 24 h a 37 °C, se observaron para determinar si se desarrollaron halos de inhibición alrededor de los discos antibióticos, los cuales fueron medidos usando un vernier y expresados como el diámetro del halo medido en milímetros (figura 6 de anexos).

Se determinó además su índice de multirresistencia antibiótica (MAR) como la fracción de antibióticos a los que fue resistente la cepa bacteriana, empleando la fórmula:

$$\text{MAR} = \text{NAR}/\text{NAT}$$

Donde:

NAR = Número de antibióticos a los que es resistente la cepa.

NAT = Número de antibióticos totales empleados en el antibiograma.

También se determinó si existieron cepas multirresistentes, las cuales debieron ser resistentes al menos a un antibiótico en un mínimo de tres familias de antibióticos.

### **3.2.8. Evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* de *Bacillus* spp.**

El efecto inhibitorio de las cepas de *Bacillus* sp. fue determinado mediante la técnica descrita por Lamari et al. (2014) para un ensayo de difusión en pozo de agar, con algunas modificaciones:

La estandarización de la cepa de *Vibrio* spp. al estándar de MacFarland 0,5 y su siembra en agar Muller Hinton fue similar en procedimiento al que se empleó en el antibiograma (ítem 3.2.8). Una vez sembradas las cepas de *Vibrio* spp., se construyeron pozos de 6 mm de diámetro en el agar Muller Hinton con una jeringa de 1 ml a la que se le cortó la punta, los pozos se perforaron en posiciones tal que su distancia al siguiente pozo fue de al menos de 25 mm; en cada pozo se colocó 30  $\mu$ l ya sea del cultivo bacteriano de *Bacillus* sp. o del secretoma del mismo.

El cultivo de *Bacillus* se preparó cultivándolo en TSA y estandarizando su concentración bacteriana al estándar de MacFarland 0,5. De estos se intentó obtener el secretoma (sustancias secretadas por las bacterias) por dos métodos: el primero de acuerdo a lo establecido en el proyecto de tesis, centrifugando el microtubo de 1,5 ml con el cultivo bacteriano a 10 000 rpm por 2 min, y recogiendo el sobrenadante que se supuso estar libre de bacterias y contener solo las sustancias secretadas por *Bacillus* spp.; sin embargo, dicho método no funcionó pues cuando se añadía el sobrenadante en los pozos de agar, se observó crecimiento de *Bacillus*, lo que indicaba que no se

había podido retirar completamente todas las células bacterianas. Por ello, se empleó el segundo método que consistió en tomar 1 ml del medio de cultivo, colocarlo en una jeringa de 5 ml y pasarlo por un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 25 mm de diámetro con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , con el cual se pudo retirar las bacterias del cultivo y obtener en el filtrado el secretoma.

Tanto el cultivo como el secretoma de las cepas de *Bacillus* fueron colocados en los pozos excavados en el agar. Se prepararon 3 placas petri por cada cepa, éstas se dejaron incubar por 24 h a 37 °C, a continuación se evaluó el diámetro de los halos de inhibición producidos alrededor de cada pozo midiendo su diámetro con una regla (figura 7 de anexos).

### **3.2.9. Identificación molecular de cepas bacterianas.**

Se realizó la identificación molecular de algunas de las cepas bacterianas aisladas en TCBS. Se seleccionó cinco cepas, dos cepas de los probables *Bacillus* y dos de los probables *Vibrio* seleccionados para el ensayo de inhibición *in vivo*, además de la cepa 7LC, que creció en TCBS pero fue un coco Gram positivo, por lo que no sería un *Vibrio*.

Las cepas seleccionadas se cultivaron en TSA, se centrifugaron a 16 000 xg por 5 min y se les aplicó el protocolo de extracción de ADN por *shock* térmico que consistió en suspender en un microtubo el *pellet* bacteriano en 500  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato salino (PBS) 1X, luego se centrifugó a 12 000 xg por 2 min a temperatura de 4 °C eliminándose el sobrenadante y añadiéndole 200  $\mu\text{l}$  de tris-EDTA (TE) 1X. La temperatura del microtubo se elevó hasta punto de ebullición (100 °C) durante 10 min en un termobloque, para luego transferirlo rápidamente a una bandeja con hielo por 5 minutos para producir el *shock* térmico que rompió la pared bacteriana. Luego de centrifugar el microtubo a 16 000 xg por 1 min, se tomó el sobrenadante en el cual se hallaba el ADN en otro microtubo y se diluyó 1:10 con agua ultrapura. Como último paso se agregó 2  $\mu\text{l}$  de ARNasa incubándose por 30 min a 37 °C para eliminar cualquier residuo de ARN y obtener ADN puro.

Con el ADN se realizó una reacción en cadena de polimerasa para amplificar un fragmento del gen 16S ARNr empleando los *primers forward* 27F y *reverse* 1492R (figura 8 de anexos). Los amplicones producto de la PCR fueron enviados a secuenciar a una empresa en Lima. Las secuencias obtenidas

fueron recortadas, alineadas y con ellas se construyó secuencias de consenso, las que fueron buscadas en las bases de datos de Genbank y SILVA, para la determinación de la especie a la que pertenecieron las cepas bacterianas.

### **3.2.10. Ensayo de inhibición de *Vibrio* spp. *in vivo* por *Bacillus* spp.**

Se seleccionó dos de las cepas de *Bacillus* spp. que mayor inhibición *in vitro* produjeron en *Vibrio* spp.; también se seleccionó dos cepas de *Vibrio* spp. que formaron colonias de color verde al crecer en medio TCBS (cepas capaces de fermentar sucrosa, característica que a menudo presentan las cepas que atacan langostinos); y que fueron aisladas de langostinos que mostraron mayor crecimiento de colonias de *Vibrio* en el momento del aislamiento de las cepas de *Vibrio*.

El ensayo se realizó en 12 acuarios, en cada uno de los cuales se colocó 8 juveniles de *L. vannamei*. Los langostinos se infectaron experimentalmente con las dos cepas *Vibrio* spp. seleccionadas y se les dio tratamiento con alimento balanceado al cual se aplicó como probiótico las cepas de *Bacillus* spp., así como se tuvo un control negativo en el cual se alimentó con alimento balanceado sin aplicación de cepas de *Bacillus* ni otro tipo de medicación y un control positivo en el cual se alimentó con alimento balanceado suplementado con oxitetraciclina.

La adición de las cepas de *Bacillus* spp. al alimento balanceado, se realizó según el método empleado por Esguerra (2012); es decir, se cultivó las cepas de *Bacillus* spp. en agar TSA, por un periodo de 24 a 48 h a 37 °C, después de ello se realizó diluciones hasta obtener una densidad celular de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, las cuales se agregaron al alimento balanceado de tal manera que este se humedeció uniformemente, luego se colocó al aire libre bajo sombra para que se secase y se añadió aceite de pescado para evitar que las cepas de *Bacillus* se deprendieran del alimento, el alimento preparado de tal manera se conservó en refrigeración y fue utilizado para alimentar al langostino en un periodo máximo de 4 días.

Se procedió de manera similar en el caso del alimento con oxitetraciclina, con la salvedad que este antibiótico se aplicó a razón de 10 g/kg de alimento, para lo cual se disolvió la oxitetraciclina en agua destilada y se aplicó sobre el

alimento, luego se agregó aceite de pescado para asegurar la adhesión del antibiótico al alimento y para hacerlo más atractivo al gusto y olfato del langostino. Diariamente y durante todo el lapso del experimento se evaluó la supervivencia de los ejemplares juveniles de *L. vannamei*, así también los días 1, 2, 4, 8 y 21 del experimento se determinó la carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los mismos.

### **3.2.11. Plan de procesamiento y análisis de datos**

Los datos obtenidos se resumieron en tablas y figuras, a fin de hacer facilitar su presentación e interpretación. Se prepararon tablas en las que se mostró el peso y longitud de los langostinos de los cuales se extrajeron las cepas de *Vibrio* spp. y *Bacillus* spp.; así también, se prepararon tablas que mostraron las características fenotípicas de las cepas aisladas; tablas y figuras sobre la resistencia antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp. y otra tabla sobre la identificación a nivel molecular de las cepas empleadas en el ensayo *in vivo*. El ensayo experimental en el que las cepas de *Bacillus* spp. fueron utilizadas para inhibir a *Vibrio* spp. *in vitro* se hizo con un diseño completamente al azar (DCA) y tuvo nueve tratamientos consistentes en las cepas de *Bacillus* spp. más abundantes aisladas del intestino de langostinos; las cuales fueron aplicadas como cultivo o como sobrenadante (secretoma) y ensayadas contra dos cepas de *Vibrio* spp. que fueron más abundantes al momento de su aislamiento en langostinos. Cada tratamiento se aplicó con 10 repeticiones, las unidades experimentales fueron placas petri con medio Muller Hinton en las que se sembraron las cepas de *Vibrio* spp. seleccionadas. A las 24 h de incubación a 37 °C, se midieron los diámetros de los halos de inhibición originados por los tratamientos en las cepas de *Vibrio* spp. cultivadas en las placas petri. Los datos obtenidos se procesaron con análisis de varianza complementada con la prueba de Duncan, ambas con un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 5\%$ ).

El ensayo experimental en el que las cepas de *Bacillus* spp. fueron utilizadas para inhibir a *Vibrio* spp. *in vivo* se hizo con un diseño completamente al azar (DCA) y tuvo tres tratamientos consistentes en:

T1: Alimento balanceado con la cepa 531B de *Bacillus* spp.

T2: Alimento balanceado con la cepa 37B de *Bacillus* spp.

T3: Alimento balanceado con oxitetraciclina (Control positivo)

Para el ensayo de inhibición *in vivo* se realizó un experimento bajo el diseño completamente al azar (DCA) con dos tratamientos (dos de las cepas de *Bacillus* spp. que mayor inhibición produjeron en el ensayo *in vitro*) las cuales fueron ensayadas contra la correspondiente cepa de *Vibrio* spp. (sensible a antibióticos o resistente a los mismos) contra las que fueron más efectivos en el ensayo *in vitro*. Las repeticiones fueron cuatro acuarios de 70 l en los que se colocaron 8 langostinos juveniles de apariencia saludable que fueron infectados sumergiéndolos por 10 min en un balde con agua de los mismos acuarios a los que se les agregó las cepas seleccionadas de *Vibrio* spp. en cantidad tal que la densidad bacteriana en el balde fue de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Se tuvo un tratamiento testigo o control en el que se aplicó oxitetraciclina comercial al alimento en cantidad de 10 g/kg. El experimento duró 21 días y de manera periódica se monitoreó la supervivencia y la cantidad de *Vibrio* spp. en el intestino de los langostinos. Se emplearon en el análisis estadístico del experimento las pruebas de análisis de varianza, así como la prueba de Duncan, ambas con nivel de significancia de 5 % ( $\alpha = 5\%$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de las cepas presuntivas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos silvestres y de cultivo.

En la tabla 1 se muestra las cepas que crecieron en agar TCBS procedentes tanto de langostinos silvestres como de cultivo, se aislaron 13 cepas presuntivas de *Vibrio* spp., de las cuales tres procedieron de langostinos silvestres y diez de cultivo.

Tabla 1. Caracterización de las cepas presuntivas de *Vibrio* spp.

Procedencia del langostino	Código de la cepa	Características de la colonia en TCBS			Forma de la célula	Reacción a la tinción o prueba	
		Forma	Tamaño (mm)	Color		Gram	Catalasa
Silvestres	Lang 60	Circular	1,4	Verde	Cocobacilo	Negativa	Negativa
	25	Circular	1,8	Amarillo	Cocobacilo	Negativa	Negativa
	32 LS	Puntiforme	0,5	Amarillo	Cocobacilo	Negativa	Positiva
De cultivo (Estanque 3)	21 C	Puntiforme	0,5	Amarillo	Cocobacilo	Negativa	Positiva
		Circular	1	Verde			
De cultivo (Estanque 5)	3 LC	Circular	5	Amarillo	Coco	Negativa	Positiva
	7 LC	Circular	2	Amarillo	Bacilo	Positiva	Positiva
	8 LC	Circular	3	Amarillo	Cocobacilo	Negativa	Positiva
	9 LC				Cocobacilo	Negativa	Negativa
	13 LC	Circular	4	Amarillo	Bacilo	Negativa	Positiva
	14 LC	Circular	2	Amarillo	Cocobacilo	Negativa	Positiva
	15 LC	Circular	2	Amarillo	Cocobacilo	Negativa	Positiva
	16 LC	Puntiforme	0,5	Verde	Bacilo	Positiva	Negativa
17 LC	Circular	3	Amarilla	Cocobacilo	Negativa	Positiva	

Las cepas que crecieron en el medio TCBS, tuvieron forma circular y puntiforme con tamaños entre 0,5 y 5 mm, con colores verdes y amarillos que son típicos de cepas de *Vibrio* spp. (Aguirre et al., 2021). En la mayoría de los casos las cepas presentaron formas celulares de cocobacilo y fueron Gram negativas y dieron reacción positiva a la catalasa, que son características que presentan la mayoría de cepas de *Vibrio* spp. (Alsina & Blanch, 1994), aunque también existen ciertas

cepas de *Vibrio* que son catalasa negativas (Ayibieke et al., 2023; Rivera & Gándara, 2001) como se observa en tres de las cepas aisladas.

Por otra parte y a pesar de que el medio TCBS se considera un medio selectivo para cepas de *Vibrio* spp. por su característica de inhibir a bacterias Gram positivas y a Gram negativas diferentes de *Vibrio* pues cuenta con sales biliares, citrato de sodio y colato de sodio; además su pH alcalino (alrededor de 8,6) y su concentración alta de NaCl (1%) contribuyen aún más a inhibir a bacterias que no son del género *Vibrio* como por ejemplo los coliformes; entre las que se halla el así como sus características el cual la mayoría según la tinción de Gram realizada mostraron forma de coco bacilos negativos (Becton Dickinson GMBH, 2019; Britania, 2021; Di Pinto et al., 2011; ThermoFisher Scientific, 2022); varias cepas crecieron en el medio TCBS y no cumplieron con mostrar características de *Vibrio* spp. por ejemplo: la cepa 3 LC correspondió a un coco Gram negativo, las cepas 7 LC y 16 LC fueron cocos Gram positivos y la cepa 13 LC un bacilo Gram negativo; el hallazgo de cepas como esas no es inusual pues se ha reportado que en el medio TCBS se pueden desarrollar bacilos Gram negativos como: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Proteus* así como cocos Gram positivos como *Enterococcus* y *Staphylococcus* (Becton Dickinson GMBH, 2019; Britania, 2021; Joseph et al., 1982; ThermoFisher Scientific, 2022).

#### **4.2. Caracterización de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de langostinos silvestres y de cultivo.**

Las 26 colonias aisladas en TSA que fueron presuntivas de pertenecer a *Bacillus* spp. tuvieron formas circulares o en abanico, irregulares y rizoides, colores blancos y cremas con tamaños entre 0,5 y 10 mm, bordes ondulados y enteros, elevación plana y consistencia cremosa o membranosa que son características típicas de bacterias del género *Bacillus* (Gaviria, 2023).

Todas las cepas (tabla 2) fueron bacilos Gram positivos y catalasa positivos, portadores de endosporas; que son características típica de cepas del género *Bacillus* como precisan James et al. (2021) y Obando & Suárez (2015).

Tabla 2. Cepas de *Bacillus* spp. aisladas de langostino silvestre y de cultivo.

Muestras	Cantidad	Cepas	
		Código	
Langostino silvestre	15	1 B, 3 B, 5 B, 6 B, 7 B, 8 B, 9 B, 10 B, 12 B, 13 B, 15 B, 16 B, 44 IB, 52 IB, 53 IB	
Langostino de cultivo (Estanque 3)	6	34 B, 35 B, 37 B, 38 B, 39 B y 42 B	
Langostino de cultivo (Estanque 5)	5	54 IB, 58 IB, 59 IB, 60 IB y 61 IB	

#### 4.3. Resistencia antibiótica de *Vibrio* spp.

En la tabla 3 se muestran las características de la resistencia antibiótica que las cepas que crecieron en TCBS, 13 que tuvieron características fenotípicamente correspondieron a *Vibrio* spp., así como 4 cepas que no correspondieron a *Vibrio* spp. Se observa que todas las cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes entre 1 a 3 de los antibióticos empleados, que correspondieron a entre 1 a 3 familias antibióticas. Los antibióticos a los que las cepas tuvieron mayor resistencia fueron la ampicilina y la estreptomina.

Tabla 3. Características de resistencia antibiótica en cepas aisladas en TCBS (fenotípicamente compatibles o no con *Vibrio* spp.).

Cepa	Antibióticos a los que es resistente				Índice MAR	Multi-resistente
	Antibióticos		Familias			
	Nombre	Cantidad	Nombre	Cantidad		
3 LC*	Oxitetraciclina, tetraciclina, estreptomina	3	Tetraciclinas, aminoglucósidos	2	0,3	No
7 LC*	Gentamicina, ácido nalidíxico, azitromicina	3	Aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos	3	0,3	Si
8 LC	Estreptomina, ácido nalidíxico, azitromicina	3	Aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos	3	0,3	Si
9 LC	Ampicilina, estreptomina	2	Penicilinas, aminoglucósidos	2	0,2	No
13 LC*	Ampicilina, estreptomina	2	Penicilinas, aminoglucósidos	2	0,2	No
14 LC	Ampicilina, estreptomina	2	Penicilinas, aminoglucósidos	2	0,2	No
15 LC	Estreptomina	1	Aminoglucósidos	1	0,1	No
16 LC*	Estreptomina, ácido nalidíxico	2	Aminoglucósidos, quinolonas	2	0,2	No
17 LC	Ampicilina, estreptomina	2	Penicilinas, aminoglucósidos	2	0,2	No
21 C	Ampicilina	1	Penicilinas	1	0,1	No
25	Ampicilina	1	Penicilinas	1	0,1	No
32 LS	Ampicilina, estreptomina	2	Penicilinas, Aminoglucósidos	2	0,2	No
Lang 60	Ampicilina, estreptomina	2	Penicilinas, Aminoglucósidos	2	0,2	No

\* Cepas que crecieron en medio TCBS pero que fenotípicamente no correspondieron a *Vibrio* spp.

Respecto al índice MAR, este varió entre 0,1 y 0,3 con un promedio de 0,2, siendo similar al MAR reportado por Tinoco et al. (2023), quienes también registraron un MAR promedio de 0,2 en cepas de *Vibrio* spp. aislados en Tumbes; a su vez, se halló dentro del rango de MAR reportado por Aguirre et al. (2021) que estuvo entre 0,1 y 0,8.

También se observó que 2 cepas (7 LC y 8 LC) de las 13 ensayadas fueron multirresistentes. La primera de las cuales fue un bacilo Gram positivo y por tanto no una cepa de *Vibrio*, en tanto que la segunda fue una cepa de *Vibrio* spp. resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos (figura 1); al respecto, ya ha habido reportes previos de *Vibrio* multirresistentes en Tumbes, por ejemplo a tres familias antibióticas como ciertas cepas de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Rosado, 2019) e incluso a cinco familias antibióticas (Aguirre et al., 2021).

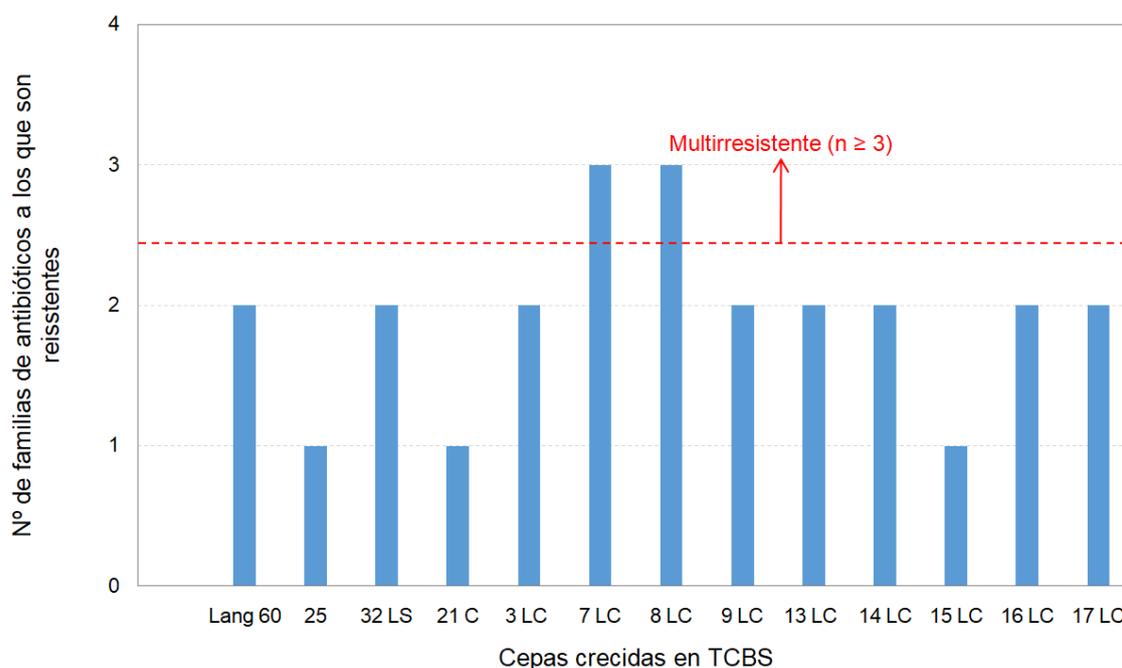


Figura 1. Resistencia de cepas crecidas en TCBS a familias antibióticas.

En la tabla 4 se observa que el 100% de las cepas de *Vibrio* spp. fueron sensibles a cloranfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina y gentamicina mientras que el 87,5% fueron sensibles a fosfomicina y ácido nalidíxico. Esto es similar a lo reportado por De Cock et al. (2022), quienes encontraron que el nivel de residuos oxitetraciclina y florfenicol en la parte comestible en cangrejos del manglar del Guayas fue muy

bajo, a pesar que existen muchas empresas langostineras que lo emplean en la zona. Otra razón también puede ser debido que al haberse reducido el empleo de antibióticos en los cultivos de langostinos en Tumbes, por consiguiente también se ha reducido la resistencia a dichos antibióticos y a otros de sus mismas familia; pues, el uso de un determinado antibiótico en el cultivo condiciona la selección de bacterias resistentes al mismo (García-Pérez et al., 2021).

Tabla 4. Porcentaje de resistencia antibiótica (resistentes, intermedias y sensibles) a diferentes antibióticos ensayados en cepas de *Vibrio* spp.

Antibiótico	Porcentaje de cepas		
	Resistentes	Intermedias	Sensibles
Ampicilina	75,0	12,5	12,5
Fosfomicina	0,0	12,5	87,5
Cloranfenicol	0,0	0,0	100,0
Oxitetraciclina	0,0	0,0	100,0
Tetraciclina	0,0	0,0	100,0
Estreptomicina	75,0	25,0	0,0
Gentamicina	0,0	0,0	100,0
Ácido nalidíxico	12,5	0,0	87,5
Enrofloxacina	0,0	50,0	50,0
Azitromicina	12,5	25,0	62,5

En la tabla 4 también se aprecia que las cepas fueron más resistentes a la ampicilina y estreptomicina con 75,0%; de manera similar, niveles altos de resistencia a ampicilina también han sido reportados por Calizaya et al. (2023) y Grande (2020); así como la resistencia a estreptomicina ha sido reportada por Albuquerque et al. (2008); en particular, la resistencia a ampicilina es bastante frecuente en *Vibrio* spp. aislados del medio marino (Oh et al., 2011).

#### 4.4. Identificación de *Bacillus* spp. y *Vibrio* spp.

En la tabla 5 se muestra la identificación molecular de cinco de las cepas bacterianas aisladas del langostino *L. vannamei* de cultivo, en dos medios de cultivo: TCBS y TSA los porcentajes de identidad de las mismas fueron muy altos (entre 99,80% y 100%) en las bases de datos de Genbank y SILVA, lo cual indica que la identificación es adecuada a nivel de especies. Dos de las cepas que crecieron en TCBS (cepas Lang 60 y 25) fueron identificadas como pertenecientes

a *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que la tercera (7 LC) correspondió a *Staphylococcus hominis*. Como se puede apreciar a pesar que el medio TCBS es un medio bastante selectivo para *Vibrio*, ello no impide que algunas otras especies de otros géneros tales como *Staphylococcus* o *Enterococcus* puedan crecer en el mismo (Becton Dickinson GMBH, 2019; Britania, 2021; Joseph et al., 1982; ThermoFisher Scientific, 2022).

Las cepas que crecieron en TSA correspondieron al género *Bacillus*, una de ellas fue de *Bacillus licheniformis* y la otra de *Bacillus amyloliquefaciens*, ello confirmó la identidad de dichas cepas que como se mencionó, tuvieron colonias y células con características fenotípicas compatibles con el género *Bacillus*, tal como por ejemplo ser bacilos Gram positivos, catalasa positivos y portar endosporas (James et al., 2021; Obando & Suárez, 2015).

Tabla 5. Identificación molecular de cepas aisladas de *Litopenaeus vannamei*.

Medio de cultivo	Cepa	Especie	% Identidad	
			GenBank	SILVA
TCBS	Lang 60	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99,80	100,00
TCBS	25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100,00	100,00
TCBS	7 LC	<i>Staphylococcus hominis</i>	100,00	100,00
TSA	53IB	<i>Bacillus licheniformis</i>	100,00	100,00
TSA	37B	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,87	99,86

#### 4.5. Diámetro de halos de inhibición *in vitro* de bacterias aisladas de *Bacillus* spp. en *Vibrio* spp.

En las tablas 6 a 8 se muestran los valores de los diámetros de inhibición producidos por las cepas de *Bacillus* spp. (aplicadas como sobrenadante o como cultivo) en las cepas de *Vibrio* spp. Se apreció que casi todas las cepas de *Bacillus* spp., con la excepción del sobrenadante de la cepa 5B inhibieron a *Vibrio* spp.

En la tabla 9 se han consolidado el promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por las cepas de *Bacillus* spp. en *Vibrio* spp. en el ensayo *in vitro*, se observa que hubo diferencia estadística significativa entre varios de los tratamientos y que de manera consistente, casi todos los sobrenadantes y cuatro de las nueve cepas aplicadas (3B, 53IB, 60IB y 1B) como cultivo lograron la mayor inhibición en *Vibrio* spp., por otra parte la cepa 5B fue la que menor poder inhibidor

mostró al ser aplicada como cultivo (3,00 mm) y aún más al ser aplicada como sobrenadante (0,00 mm).

Tabla 6. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por el sobrenadante y el cultivo de las cepas de *Bacillus*: 3B, 60IB y 53IB en *Vibrio* spp.

Cepas de <i>Vibrio</i> spp.	Sobrenadante			Cultivo		
	3B	60IB	53IB	3B	60IB	53IB
Lang 60	17	15	17	16	12	14
21C	17	16	13	16	15	10
25	15	16	18	11	14	15
44	12	11	13	17	16	16
72	14	17	15	12	11	14
20	10	13	11	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0
32C	0	0	0	0	0	0
<i>Media ± DE</i>	10,6 ± 7,0	11,0 ± 7,1	10,9 ± 7,1	9,0 ± 7,7	8,5 ± 7,2	8,6 ± 7,3

Tabla 7. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por el sobrenadante y el cultivo de las cepas de *Bacillus*: 58IB, 1B y 59IB en *Vibrio* spp.

Cepas de <i>Vibrio</i> spp.	Sobrenadante			Cultivo		
	58IB	1B	59IB	58IB	1B	59IB
Lang 60	16	16	15	8	8	13
21C	13	11	15	10	7	5
25	13	15	14	12	7	4
44	13	15	16	7	7	8
72	16	15	15	0	10	0
20	13	10	10	0	0	0
48	0	0	0	8	9	8
32C	0	0	0	0	9	4
<i>Media ± DE</i>	10,5 ± 6,6	10,3 ± 6,7	10,6 ± 6,8	5,6 ± 4,9	7,1 ± 3,1	5,3 ± 4,4

Tabla 8. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por el sobrenadante y el cultivo de las cepas de *Bacillus*: 37B, 54IB y 5B en *Vibrio* spp.

Cepas de <i>Vibrio</i> spp.	Sobrenadante			Cultivo		
	37B	54IB	5B	37B	54IB	5B
Lang 60	16	15	0	10	19	7
21C	14	13	0	0	0	0
25	15	15	0	0	0	0
44	14	20	0	10	8	0
72	15	14	0	10	8	9
20	12	10	0	0	0	0
48	0	0	0	11	0	0
32C	0	0	0	4	0	8
<i>Media ± DE</i>	<i>10,8 ± 6,7</i>	<i>10,9 ± 7,3</i>	<i>0,0 ± 0,0</i>	<i>5,6 ± 5,1</i>	<i>4,4 ± 6,9</i>	<i>3,0 ± 4,2</i>

Tabla 9. Diámetro promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por los tratamientos (cepas de *Bacillus* spp. aplicadas como sobrenadante y cultivo) en cepa de *Vibrio* spp. *in vitro*.

Tratamiento		Diámetro promedio del halo de inhibición (mm)*
Cepa de <i>Bacillus</i> spp.	Tipo de aplicación	
60IB	Sobrenadante	11,00 <sup>a</sup>
53IB	Sobrenadante	10,88 <sup>ab</sup>
54IB	Sobrenadante	10,88 <sup>ab</sup>
37B	Sobrenadante	10,75 <sup>ab</sup>
59IB	Sobrenadante	10,63 <sup>ab</sup>
3B	Sobrenadante	10,63 <sup>ab</sup>
58IB	Sobrenadante	10,50 <sup>ab</sup>
1B	Sobrenadante	10,25 <sup>abc</sup>
3B	Cultivo	9,00 <sup>abcd</sup>
53IB	Cultivo	8,63 <sup>abcd</sup>
60IB	Cultivo	8,50 <sup>abcd</sup>
1B	Cultivo	7,13 <sup>abcde</sup>
37B	Cultivo	5,63 <sup>bcde</sup>
58IB	Cultivo	5,63 <sup>bcde</sup>
59IB	Cultivo	5,25 <sup>cde</sup>
54IB	Cultivo	4,38 <sup>def</sup>
5B	Cultivo	3,00 <sup>ef</sup>
5B	Sobrenadante	0,00 <sup>f</sup>

En investigaciones como las de Jayaseelan et al. (2013), Avery et al. (2020) y (Shaheer et al., 2021), se ha observado que el sobrenadante, es decir el extracto libre de células, tuvo un mayor efecto inhibitor en cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos; esto, porque muchas de estas cepas son productoras de lipopéptidos cíclicos que presentan fuerte actividad antimicrobiana y surfactante, tales como surfactinas, iturinas, y fengicinas. Adicionalmente sintetizan varios poliketidos derivados de los macrólidos así como péptidos no ribosomales, dihidroisocumarinas y lipopéptidos lineales con propiedades antimicrobianas, que forman parte del amplio arsenal antibacteriano de *Bacillus* spp. (Kaspar et al., 2019).

#### **4.6. Supervivencia de langostinos infectados con cepas de *Vibrio* spp. y tratados con cepas de *Bacillus* spp.**

Como se aprecia en la figura 2, la supervivencia de los langostinos tanto en los tratamientos que recibieron las cepas de: *Bacillus licheniformis* (53IB) y *Bacillus amyloliquefaciens* (37B) fueron estadísticamente similares a las del testigo en el que se aplicó oxitetraciclina al alimento.

Se debe indicar que en la determinación de la supervivencia no se incluyó aquellos langostinos que fueron sacrificados periódicamente para determinar la carga de *Vibrio* spp. en sus hepatopáncreas.

Las tasas de supervivencia en todos los tratamientos al final de los 22 días de experimentación se mostraron bastante elevadas, correspondiendo a valores entre 85,71% a 96,42%.

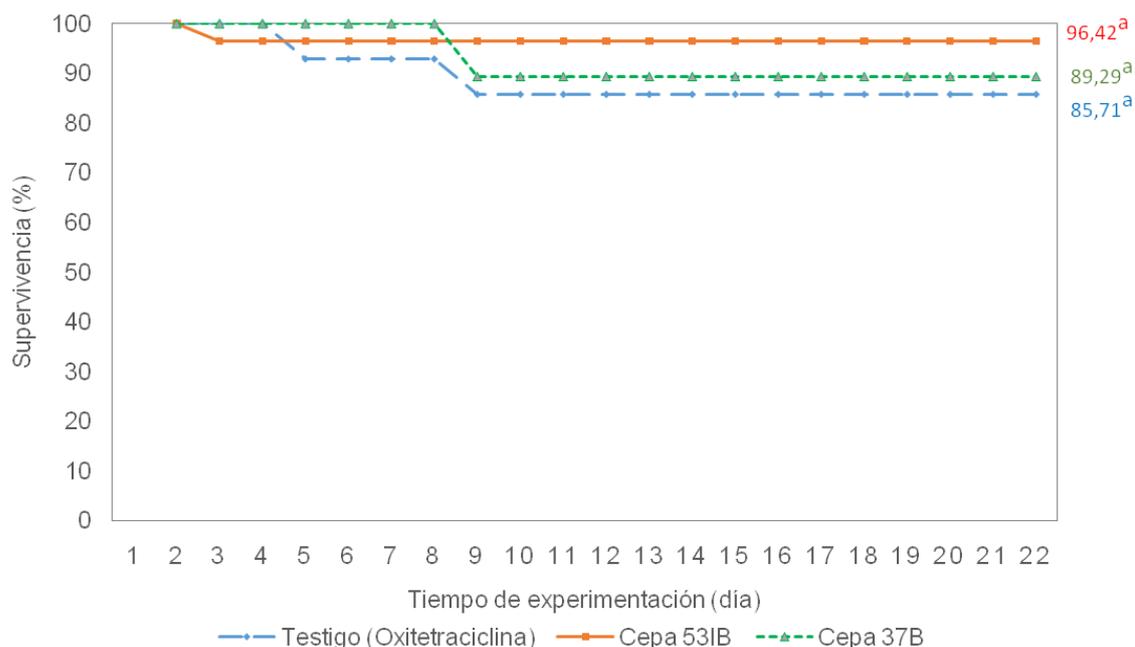


Figura 2. Supervivencia de langostinos en la fase experimental según tratamiento.

\* Las letras que acompañan a las cantidades indican el resultado de la prueba de Duncan, letras iguales indican resultados estadísticamente similares.

El hecho que la supervivencia de los langostinos se halla mantenido en niveles tan altos, probablemente se deba a que las cepas de *Vibrio* spp. empleadas en el ensayo fueron poco patógenas, esto a pesar de que las cepas empleadas (Lang 60 y 25) correspondieron a *Vibrio parahaemolyticus* uno de los principales patógenos para *L. vannamei* (Chang et al., 2023). Sin embargo, como se ha observado en otras investigaciones, no todas las cepas de *V. parahaemolyticus* son patógenas, sino que lo son aquellas que presentan genes de patogenicidad como la hemolisina termostable directo (*tdh*), la hemolisina relacionada a la *tdh* (*trh*), dos sistemas de secreción tipo III (T3SS1 y T3SS2) y dos tipos de sistemas de secreción VI (T6SS1 and T6SS).

Por otro lado, como se ha observado, la supervivencia de los langostinos infectados con las cepas de *Vibrio* spp. fue la misma entre los que recibieron el antibiótico de elección (oxitetraciclina), con los que recibieron las cepas de *Bacillus*, lo cual evidencia la eficiencia de dichas cepas para mantener altas supervivencias en *L. vannamei*; resultados como los antes señalados no son extraordinarios, ciertas cepas probióticas tales como bacterias ácido lácticas han mostrado tener la misma capacidad, por ejemplo Karthik et al. (2014) encontraron supervivencias entre 88 y

94% en langostinos tratados con *Lactobacillus* spp., así como Tinoco et al. (2023) encontraron una supervivencia de 92,3% para langostinos infectados con *Vibrio* spp. y tratadas con cepas de bacterias ácido lácticas.

#### 4.7. Conteo de *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de *Bacillus* spp.

La carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos infectados experimentalmente (figura 3) tuvo un comportamiento que mostró el éxito de la infección experimental y el efecto inhibitor progresivo de las cepas de *Bacillus* y de la oxitetraciclina.

Se aprecia que el primer día del ensayo (antes de realizarse la infección experimental), la carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos fue baja (alrededor de  $3,2 \times 10^1$  UFC/g); luego de la infección, al segundo día, la carga se incrementó en gran manera alcanzando  $3,2 \times 10^4$  UFC/g; a partir de este momento, se observa una reducción progresiva de la carga de *Vibrio* spp. que coincide con el inicio del tratamiento con las cepas y con la oxitetraciclina.

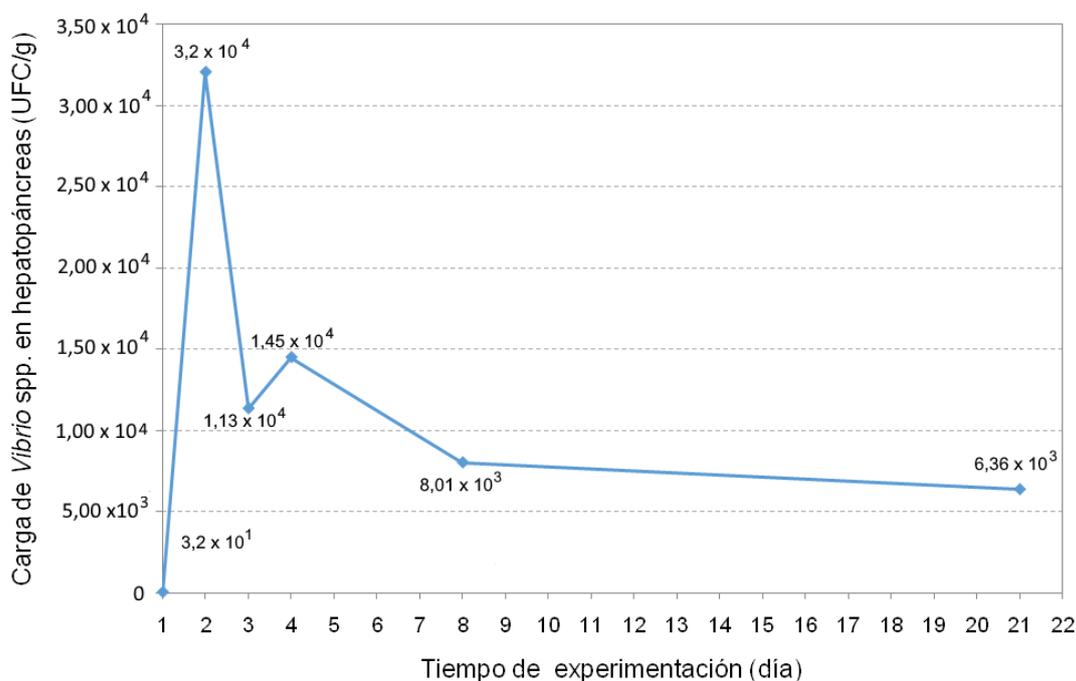


Figura 3. Evolución de la carga promedio de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos en el ensayo *in vivo*.

Por otra parte, la carga de *Vibrio* spp. antes de la infección fue estadísticamente similar ( $p < 0,05$ ) (tabla 10) con valores bastante bajos (entre  $1,45 \times 10^1$  y  $2,6 \times 10^1$  UFC/g); así también al finalizar el ensayo *in vivo*, en el día 21, la carga de *Vibrio* spp. fue también estadísticamente similar ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos con cepas de *Bacillus* spp. y el testigo con oxitetraciclina, esto indica que las cepas de *Bacillus* spp. fueron capaces de reducir la carga de *Vibrio* spp. al mismo nivel que lo hizo la oxitetraciclina.

Tabla 10. Carga de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de *L. vannamei* según tratamiento en el ensayo *in vivo*.

Momento	Tratamiento		
	Testigo (Oxitetraciclina)	Cepa 53IB	Cepa 37B
Inicio (día 1)	$2,6 \times 10^1 \pm 3,7 \times 10^0$ <sup>a</sup>	$1,45 \times 10^1 \pm 1,9 \times 10^0$ <sup>a</sup>	$2,0 \times 10^1 \pm 1,6 \times 10^0$ <sup>a</sup>
Fin (día 22)	$5,71 \times 10^3 \pm 2,65 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$6,80 \times 10^3 \pm 5,83 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$6,57 \times 10^3 \pm 3,18 \times 10^3$ <sup>a</sup>

\* Las letras que acompañan a las cantidades indican el resultado de la prueba de Duncan, letras iguales indican resultados estadísticamente similares.

Las cepas de *Bacillus* spp. mostraron tener la misma eficiencia que la oxitetraciclina para reducir la carga de *Vibrio* spp. en langostinos; esto a pesar que en el ensayo *in vitro*, los cultivos y sobrenadantes de estas cepas de *Bacillus* produjeron halos de inhibición en las cepas de *Vibrio* spp. (Lang 60 y 25) entre 0 y 16 mm, que fueron muy inferiores a los de la oxitetraciclina (20,3 a 28,7 mm), por lo que se puede suponer que adicionalmente a su actividad antibacteriana las cepas de *Bacillus* pueden haber estimulado el sistema inmune de los langostinos para que puedan inhibir a *Vibrio* spp., pues varias cepas de *Bacillus* tienen capacidad inmunoestimulante como lo han reportado varios estudios como los de Eissa et al. (2022), Kumar et al. (2022), Lee et al. (2021) y Tepasamordech et al. (2019).



## V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron en medio TCBS, a partir de muestras de langostinos silvestres y de cultivo, 13 cepas bacterianas, de las cuales ocho tuvieron características fenotípicas de *Vibrio* spp.
2. Se aislaron y caracterizaron 26 cepas bacterianas con características fenotípicas compatibles con *Bacillus* spp.
3. Todas las cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes entre 1 a 3 antibióticos de los 10 antibióticos ensayados, siendo una de ellas multirresistente. 75% de las cepas fueron resistentes a ampicilina y estreptomina, pero el 100% fueron sensibles a cloranfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina y gentamicina.
4. Casi todas las cepas de *Bacillus* spp., con la excepción del sobrenadante de la cepa 5B inhibieron *in vitro* a *Vibrio* spp., observándose que los sobrenadantes produjeron mayor inhibición que los cultivos de *Bacillus*; estadísticamente los cultivos o sobrenadantes de ocho de las cepas entre las que se hallaron las cepas 37B (*Bacillus amyloliquefaciens*) y 53IB (*Bacillus licheniformis*) mostraron máxima inhibición en *Vibrio* spp.
5. En el ensayo *in vivo*, las cepas 37B y 53IB de *Bacillus* spp. inhibieron el crecimiento de las cepas Lang 60 y 25 (ambas correspondientes a *Vibrio parahaemolyticus*) en el hepatopáncreas de *L. vannamei*, con la misma eficiencia que la oxitetraciclina. Asimismo la supervivencia de los langostinos *L. vannamei* infectados por *Vibrio* spp. fue estadísticamente similar a la lograda con el tratamiento con oxitetraciclina. Esto demuestra que las cepas de *Bacillus* spp. son capaces de controlar la infección por *Vibrio* spp. al mismo nivel que la oxitetraciclina, siendo una alternativa ambientalmente amigable y de menor impacto que la oxitetraciclina.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto de las cepas potencialmente probióticas de *Bacillus* spp. contra cepas de *Vibrio* spp. altamente patógenas en ensayo *in vivo*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, L. E., Sánchez-Suárez, H. A., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4), e19386. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Albuquerque, R., Araújo, R. L., Souza, O. V., & Vieira, R. H. S. (2015). Antibiotic-resistant vibrios in farmed shrimp. *BioMed Research International*, 2015, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/505914>
- Albuquerque, R., Vieira, G. H. F., Silva, G. C., Vieira, R. H. S. F., & Sampaio, S. (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.
- Alsina, M., & Blanch, A. R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(1), 79-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04419.x>
- Avery, S. E., Ruzbarsky, S. P., Hise, A. M., & Schreier, H. J. (2020). Antibacterial activity of *Bacillus inaquosorum* strain T1 against *pirAB*<sup>VP</sup>-bearing *Vibrio parahaemolyticus*: Genetic and physiological characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21), e01950-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01950-20>

- Ayibieke, A., Nishiyama, A., Senoh, M., & Hamabata, T. (2023). Gene expression analysis during the conversion from a viable but nonculturable to culturable state in *Vibrio cholerae*. *Gene*, 863, 147289. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147289>
- Balcazar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Becton Dickinson GMBH. (2019). *BD TCBS agar*. Becton Dickinson GMBH. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25732>
- Britania. (2021). *T.C.B.S. medio*. Britania. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60709410a2736.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60709410a2736.pdf)
- Calizaya, C. D., Reátegui, E. H., Silva, J. C., Velazco, R., Rodríguez, L., Angulo, D. R., Llontop, C. A., Salcedo, L. A., & Villena, C. A. (2023). Resistencia antimicrobiana en los principales recursos acuícolas de los departamentos de Tumbes, Piura, San Martín y Puno. *Uniciencia*, 37(1), 1-16. <https://doi.org/10.15359/ru.37-1.30>
- Chang, Y.-T., Ko, H.-T., Wu, P.-L., Kumar, R., Wang, H.-C., & Lu, H.-P. (2023). Gut microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exhibits distinct responses to pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology Spectrum*, 11(5), e01180-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01180-23>
- De Cock, A., Forio, M. A. E., Croubels, S., Granda-Dominguez, L., Jacxsens, L., Lachat, C., Roa-López, H., Ruales, J., Scheyvaert, V., Solis, M., Spanoghe, P., Tack, F., & Goethals, P. (2022). Health risk-benefit assessment of the

- commercial red mangrove crab: Implications for a cultural delicacy. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4221859>
- Di Pinto, A., Terio, V., Novello, L., & Tantillo, G. (2011). Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and Chromagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 22(1), 124-127. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.013>
- Done, H. Y., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2015). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *The AAPS Journal*, 17(3), 513-524. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9722-z>
- Eissa, E. H., Ahmed, N. H., El-Badawi, A. A., Munir, M. B., Abd Al-Kareem, O. M., Eissa, M. E. H., Hussien, E. H. M., & Sakr, S. E. (2022). Assessing the influence of the inclusion of *Bacillus subtilis* Aqua-grow® as feed additive on the growth performance, feed utilization, immunological responses and body composition of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 53(18), 6606-6615. <https://doi.org/10.1111/are.16129>
- Esguerra, D. A. (2012). *Evaluación en un sistema cerrado de cuatro aislados bacterianos con potencial probiótico en la dieta de tilapia Oreochromis niloticus* [Tesis de Biólogo Marino, Universidad Jorge Tadeo Lozano]. <http://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/1313/T996.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>

- Flegel, T. W., Lightner, D. V., Lo, C.-F., & Owens, L. (2008). Shrimp disease control: Past, present and future. En M. G. Bondad-Reantaso, C. V. Mohan, M. Crumlish, & R. P. Subasinghe (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture VI* (pp. 355-378). Asian Fisheries Society. [http://www.fhs-afs.net/daa\\_vi\\_files/27.pdf](http://www.fhs-afs.net/daa_vi_files/27.pdf)
- García-Pérez, J., Ulloa-Rojas, J. B., & Mendoza-Elvira, S. (2021). Patógenos bacterianos y su resistencia a los antimicrobianos en los cultivos de tilapia en Guatemala. *Uniciencia*, 35(2), 1-14. <https://doi.org/10.15359/ru.35-2.4>
- Gaviria, C. A. (2023). *Aislamiento y caracterización de aislados del género Bacillus spp. Con potencialidades de bioestimulación del crecimiento vegetal de cultivos de plátano* [Tesis de Microbiólogo, Universidad Libre Seccional Pereira]. <http://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/25702>
- Grande, F. J. (2020). *Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana de Vibrio spp. aislado de langostinos blancos (Litopenaeus vannamei) cultivados en Tumbes* [Tesis de Maestro en Sanidad Acuícola, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8591/Caracterizacion\\_GrandeAvalos\\_Francisco.pdf](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8591/Caracterizacion_GrandeAvalos_Francisco.pdf)
- Greeshma, J., Bini, D., Seená, J., & Rejish, V. J. (2021). *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International*, 29(1), 323-353. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00630-0>
- Harpeni, E., Santoso, L., Supono, S., Wardiyanto, W., Widodo, A., & Yolanda, L. (2018). Effects of dietary probiotic *Bacillus* sp. D2.2 and prebiotic sweet potato extract on growth performance and resistance to *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultura Indonesiana*, 18(2), 55. <https://doi.org/10.21534/ai.v18i2.107>

- Javadi, A., & Khatibi, S. A. (2017). Effect of commercial probiotic (Protexin®) on growth, survival and microbial quality of shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ). *Nutrition & Food Science*, 47(2), 204-216. <https://doi.org/10.1108/NFS-07-2016-0085>
- Jayaseelan, B. D., Vaseeharan, B., Maharajan, A., Shanthi, S., & Vinoj, G. (2013). Vibriostatic effects of probiotic *Bacillus licheniformis* Dabhb1 and its molecular phylogeny resolved through RAPD markers. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1601-1609. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0623-z>
- Jeyasanta, K. I., Lilly, T., & Patterson, J. (2017). Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistants. *Asian Journal of Applied Science and Technology*, 1(8), 100-111.
- Joseph, S. W., Colwell, R. R., & Kaper, J. B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 10(1), 77-124. <https://doi.org/10.3109/10408418209113506>
- Karthik, R., Hussain, A. J., & Muthezhilan, R. (2014). Effectiveness of *Lactobacillus* sp (AMET1506) as probiotic against vibriosis in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp aquaculture. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(SE), 297-305. <https://doi.org/10.13005/bbra/1423>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2038-2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Krishnani, K. K., Kathiravan, V., Shakil, N. A., Singh, M. K., Brahmane, M. P., Meena, K. K., Sarkar, B., Choudhary, K., Singh, M. K., & Kumar, J. (2015). Bactericidal activity of nanopolymers against shrimp pathogenic bacterium

- Vibrio harveyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(4), 1079-1086. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0517-x>
- Kumar, S., Verma, A. K., Singh, S. P., & Awasthi, A. (2022). Immunostimulants for shrimp aquaculture: Paving pathway towards shrimp sustainability. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(10), 25325-25343. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18433-y>
- Lamari, F., Sadok, K., Bakhrouf, A., & Gatesoupe, F.-J. (2014). Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on artemia nauplii. *Aquaculture International*, 22(2), 699-709. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9699-5>
- Lee, C., Kim, S., Shin, J., Kim, M.-G., Gunathilaka, B. E., Kim, S. H., Kim, J. E., Ji, S.-C., Han, J. E., & Lee, K.-J. (2021). Dietary supplementations of *Bacillus* probiotic improve digestibility, growth performance, innate immunity, and water ammonia level for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 29(6), 2463-2475. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00760-z>
- Letchumanan, V., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* specie. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00735>
- Lin, H., Yu, M., Wang, X., & Zhang, X.-H. (2018). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of vibrios. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4531-2>
- Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., & Liu, C.-H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress

- tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 837-844. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.012>
- Lomelí-Ortega, C. O., & Martínez-Díaz, S. F. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>
- Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Gomez-Gil, B., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. I., Audelo-Naranjo, J. M., & Zamudio-Armenta, O. O. (2015). Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Latin american journal of aquatic research*, 43(4), 766-775. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue4-fulltext-15>
- Martínez, C. (2018). *Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <http://eprints.ucm.es/46375/1/T39569.pdf>
- Millanao B, A., Barrientos H, M., Gómez C, C., Tomova, A., Buschmann, A., Dölz, H., & Cabello, F. C. (2011). Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. *Revista Médica de Chile*, 139(1), 107-118. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872011000100015>
- Morales-Covarrubias, M. S. (2008). Enfermedades bacterianas. En V. Morales & J. Cuéllar-Anjel (Eds.), *Enfermedades bacterianas Guía técnica—Patología e inmunología de camarones penaeidos* (1.ª ed., pp. 117-134). Programa

CYTED Red II-D Vannamei. <http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf>

Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3-4), 443-450. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>

Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P., & Vuthiphandchai, V. (2008). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, 285(1-4), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.020>

Obando, O. R., & Suárez, Y. G. (2015). *Obtención de cepas autóctonas de Bacillus spp. y su evaluación probiótica in vitro* [Tesis de Médico Veterinario, Universidad Nacional Agraria]. <http://repositorio.una.edu.ni/3213/1/tnl70o12.pdf>

Oh, E.-G., Son, K.-T., Yu, H., Lee, T.-S., Lee, H.-J., Shin, S., Kwon, J.-Y., Park, K., & Kim, J. (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), 380-386. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-307>

Otero, J. P. (2018). *Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco Litopenaeus vannamei y sus métodos de control* [Trabajo de titulación de Ingeniero Acuicultor, Universidad Técnica de Machala]. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12225/1/DE00002\\_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12225/1/DE00002_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf)

- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Quispe, W. R. (2017). *Aislamiento de Lactobacillus sp. de "trucha arco iris" Oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a Yersinia ruckeri en Puno* [Tesis de Licenciado en Biología, Universidad Nacional del Altiplano]. [http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe\\_Gallegos\\_Wilson\\_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe_Gallegos_Wilson_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rebouças, R. H., de Sousa, O. V., Sousa, A., Vasconcelos, F. R., Barroso, P., & Silva, R. H. (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>
- Rico, A., Jacobs, R., Van den Brink, P. J., & Tello, A. (2017). A probabilistic approach to assess antibiotic resistance development risks in environmental compartments and its application to an intensive aquaculture production scenario. *Environmental Pollution*, 231, 918-928. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.079>
- Rivera, S. A. H., & Gándara, J. M. (2001). Aislamiento y caracterización de bacterias del género *Vibrio* de aguas contaminadas por hidrocarburos. *Foresta Veracruzana*, 3(1), 17-21.
- Rodríguez, A. (2017). *Probióticos en la producción piscícola* [Tesis de Especialista en Biotecnología Agraria, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. <http://repository.unad.edu.co:8080/bitstream/10596/13466/1/1075539267.pdf>

- Rosado, A. A. (2019). *Detección de especies patogénicas del género Vibrio en langostino blanco (Litopenaeus vannamei) de centros de crianza de la región Tumbes, mediante la aplicación de un protocolo de PCR múltiple* [Tesis de Maestro en Sanidad Acuícola, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. [http://190.116.48.43/bitstream/handle/upch/7028/Deteccion\\_RosadoSalazar\\_Armando.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://190.116.48.43/bitstream/handle/upch/7028/Deteccion_RosadoSalazar_Armando.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Santiago, M. L., Espinosa, A., & Bermúdez, M. C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32.
- Santos, A. (2017). *Importancia de los plásmidos ColE1 en la resistencia a antibióticos* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <http://eprints.ucm.es/44191/1/T39064.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>
- Shaheer, P., Sreejith, V., Joseph, T., Murugadas, V., & Lalitha, K. (2021). *Quorum quenching Bacillus spp.: An alternative biocontrol agent for Vibrio harveyi infection in aquaculture*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 146, 117-128. <https://doi.org/10.3354/dao03619>
- Shakerian, A., Barton, M. D., Akinbowale, O. L., & Khamesipour, F. (2018). Antimicrobial resistance profile and resistance genes of *Vibrio* species isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) raised in

- Iran. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68(1), 79-88.  
<https://doi.org/10.12681/jhvms.15566>
- Silva, W., Olea, A., Cachicas, V., Fernández, J., Ibáñez, D., Hormazábal, J. C., García, J., & Maldonado, A. (2008). *Manual de procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de Vibrio parahaemolyticus* (1ra edición). Ministerio de Salud - Instituto de Salud Pública. [https://www.medica-tec.com/arg/files/Manual%20de%20Procedim.%20Chrom.Vibrio%20-%20Chile\[1\].pdf](https://www.medica-tec.com/arg/files/Manual%20de%20Procedim.%20Chrom.Vibrio%20-%20Chile[1].pdf)
- Stalin, N., & Srinivasan, P. (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. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.021>
- Tepaamorndech, S., Chantarasakha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M., Kirschke, C. P., Huang, L., & Visessanguan, W. (2019). Effects of *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 4-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.010>
- ThermoFisher Scientific. (2022). *T.C.B.S. cholera medium CM0333B, CM0333T*. ThermoFisher Scientific. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%20FMBD%20Instructions%20FMBD\\_BT\\_IFU-0546%20CM0333B%20T.C.B.S%20CHOLERA%20MEDIUM.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%20FMBD%20Instructions%20FMBD_BT_IFU-0546%20CM0333B%20T.C.B.S%20CHOLERA%20MEDIUM.pdf)

- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Tinoco, V. Y., Peralta, T., & Ordinola, A. (2023). Inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. Aislados del langostino *Litopenaeus vannamei* utilizando bacterias ácido lácticas nativas. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 52(1), Article 1. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2023.52.1.1156>
- Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1-14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Watts, J., Schreier, H., Lanska, L., & Hale, M. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6), 158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- World Bank. (2014). *Reducing disease risk in aquaculture*. World Bank. <http://documents.worldbank.org/curated/en/110681468054563438/pdf/882570REPLACEM00NAME0Reantaso0Melba.pdf>
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X.-H. (2016). Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 451, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., & Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance,

digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 683-689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>

## **ANEXOS**

### Anexo 1. Diámetro de los halos de inhibición en cepas aisladas en TCBS

Tabla 11. Diámetro de los halos de inhibición (mm) (media±DE) producidos por antibióticos en cepas aisladas en TCBS.

Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles	Tetraciclinas		Aninoglucósidos		Quinolonas		Macrólidos
	Ampicilina (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg)	Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico (30µg)	Enrofloxacin (5 µg)	Azitromicina (15 µg)
3 LC	14,7 ± 0,6	20,7 ± 0,6	25,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	9,7 ± 0,6	15,7 ± 0,6	25,0 ± 0,0	26,0 ± 0,0	17,7 ± 3,8
7 LC	17,3 ± 0,6	26,0 ± 1,0	24,7 ± 0,6	30,3 ± 0,6	26,7 ± 0,6	12,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	24,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0
8 LC	25,7 ± 0,6	39,7 ± 0,6	30,0 ± 0,0	32,7 ± 1,2	30,7 ± 1,2	12,0 ± 0,0	24,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	26,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0
9 LC	10,0 ± 0,0	22,7 ± 0,6	26,3 ± 0,6	20,3 ± 0,6	21,7 ± 1,2	11,0 ± 1,0	15,7 ± 0,6	21,3 ± 1,2	20,0 ± 0,0	15,3 ± 0,6
13 LC	6,7 ± 0,6	19,7 ± 0,6	25,3 ± 0,6	18,3 ± 0,6	20,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	14,7 ± 0,6	21,0 ± 0,0	18,0 ± 0,0	25,7 ± 1,2
14 LC	9,3 ± 0,6	20,0 ± 0,0	19,7 ± 0,6	20,7 ± 1,2	23,7 ± 1,2	11,7 ± 0,6	17,3 ± 2,3	23,0 ± 1,7	21,0 ± 1,7	22,0 ± 1,7
15 LC	14,7 ± 0,6	24,3 ± 0,6	25,0 ± 0,0	22,3 ± 0,6	23,0 ± 1,0	12,0 ± 1,0	16,0 ± 0,0	24,7 ± 0,6	20,3 ± 0,6	22,3 ± 0,6
16 LC	25,0 ± 0,0	44,7 ± 0,6	25,7 ± 0,6	27,3 ± 0,6	34,7 ± 0,6	10,3 ± 0,6	22,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	26,7 ± 0,6	24,0 ± 0,0
17 LC	8,0 ± 1,0	19,7 ± 0,6	30,0 ± 1,7	20,7 ± 1,2	19,0 ± 1,0	11,0 ± 0,0	16,3 ± 0,6	22,0 ± 0,0	21,0 ± 1,0	26,7 ± 0,6
21 C	8,0 ± 0,0	20,7 ± 0,6	25,7 ± 0,6	22,3 ± 1,2	21,0 ± 1,0	14,7 ± 0,6	17,0 ± 0,0	26,7 ± 0,6	25,0 ± 0,0	25,3 ± 0,6
25	12,3 ± 3,8	19,3 ± 1,2	25,0 ± 4,6	20,3 ± 0,6	20,7 ± 1,2	16,0 ± 5,6	20,0 ± 4,4	21,7 ± 3,8	17,0 ± 2,0	17,0 ± 1,0
32 LS	9,3 ± 0,6	20,7 ± 0,6	24,3 ± 2,1	20,0 ± 0,0	21,0 ± 0,0	10,7 ± 0,6	15,3 ± 0,6	22,0 ± 0,0	19,3 ± 0,6	16,3 ± 0,6
Lang 60	9,7 ± 8,5	22,3 ± 2,3	30,0 ± 6,2	28,7 ± 3,2	28,7 ± 6,4	11,0 ± 5,3	20,7 ± 0,6	23,0 ± 2,6	24,7 ± 4,5	18,3 ± 5,5

## Anexo 2. Resistencia antibiótica en cepas aisladas en TCBS

Tabla 12. Resistencia antibiótica en cepas aisladas en TCBS

Cepa		Penicilinas	Fosfonatos	Fenicolos	Tetraciclinas		Aninoglucósidos		Quinolonas		Macrólidos	Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que resiste	Índice MAR	Multirresistente
		Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg)	Tetraciclina (30µg)	Estreptomicina (10 µg)	Gentamicina (10µg)	Ácido nalidíxico (30µg)	Enrofloxacina (5 µg)	Azitromicina (15 µg)				
Langostino silvestres	Lang 60	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	2	2	0,2	No
	25	R	I	S	S	S	I	S	S	I	S	1	1	0,1	No
	32 LS	R	S	S	S	S	R	S	S	I	I	2	2	0,2	No
Langostino de cultivo estanque 3	21 C	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
Langostino de cultivo estanque 5	3 LC	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	3	2	0,3	No
	7 LC	S	S	S	S	S	I	R	R	S	R	3	3	0,3	Si
	8 LC	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	3	3	0,3	Si
	9 LC	R	S	S	S	S	R	S	S	I	I	2	2	0,2	No
	13 LC	R	S	S	I	S	R	S	S	I	S	2	2	0,2	No
	14 LC	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	2	2	0,2	No
	15 LC	I	S	S	S	S	R	S	S	I	S	1	1	0,1	No
	16 LC	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	2	2	0,2	No
	17 LC	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	2	2	0,2	No

### Anexo 3. Fotografías de la ejecución de la tesis

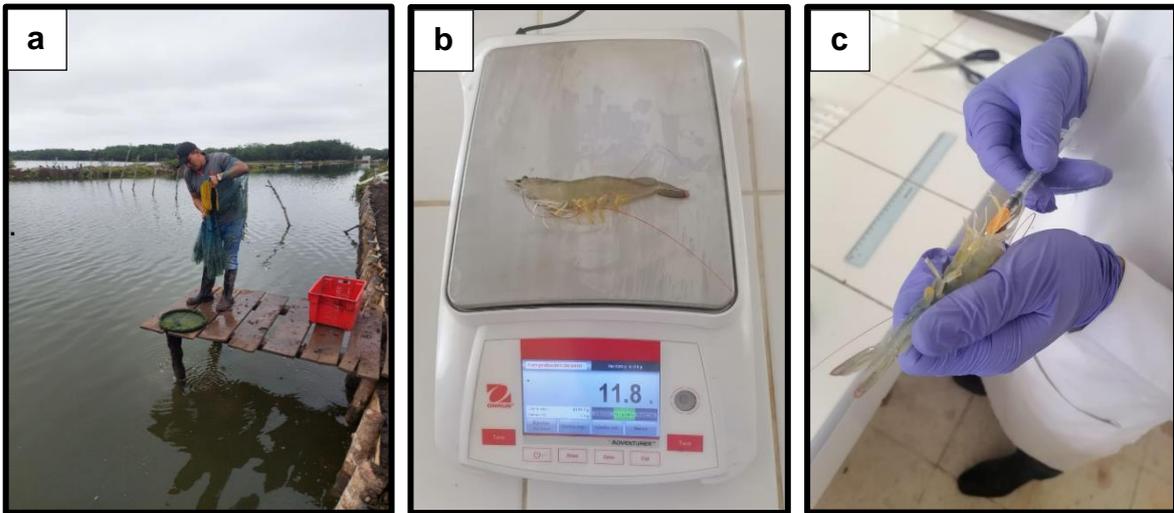


Figura 4. Obtención de ejemplares de langostino y de sus tejidos. a) Muestreo de langostino de cultivo langostinera Jardlec del sector chacra Gonzales de la provincia de Zarumilla, b) Determinación del peso de langostino, c) Extracción de hemolinfa del langostino.

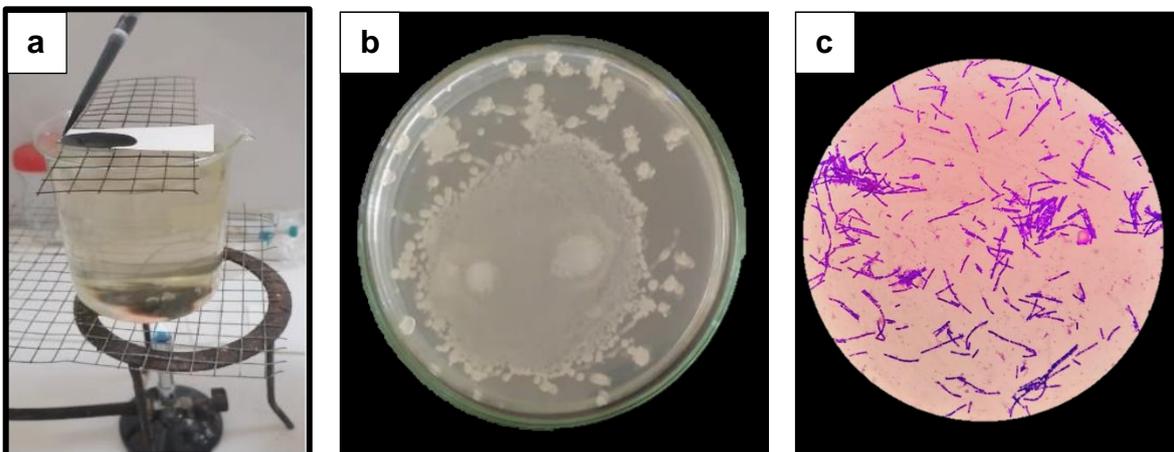


Figura 5. Caracterización de cepas de *Bacillus* spp. a) Tinción con verde de malaquita al 5% para observación de endospora en *Bacillus* spp., b) Crecimiento de *Bacillus* spp. en agar TSA, c) Observación microscópica a 1000 X de cepa de *Bacillus* sp.

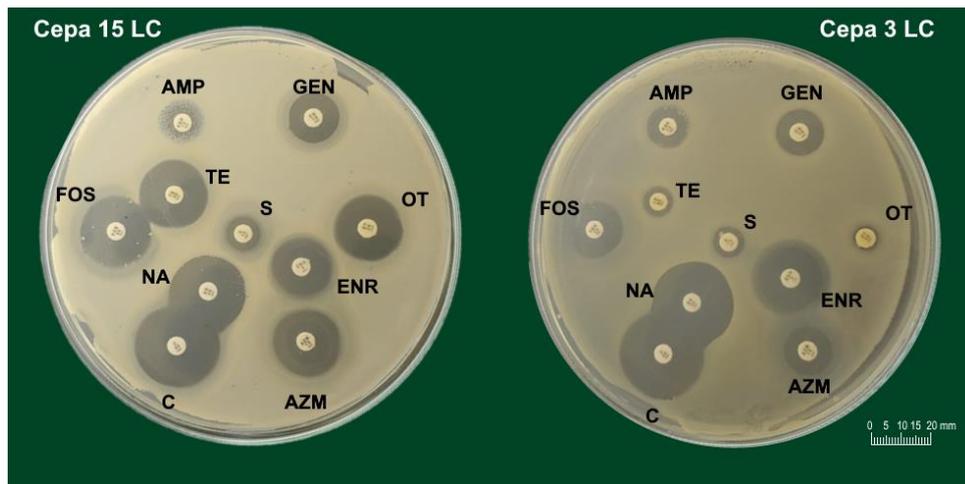


Figura 6. Antibiogramas en cepas de *Vibrio* spp. aislados de *Litopenaeus vannamei*.

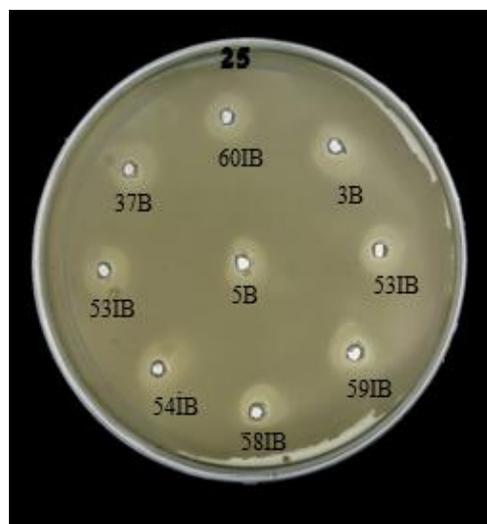


Figura 7. Ensayo de inhibición *in vitro* de la cepa 25 de *Vibrio* spp. por *Bacillus* spp.

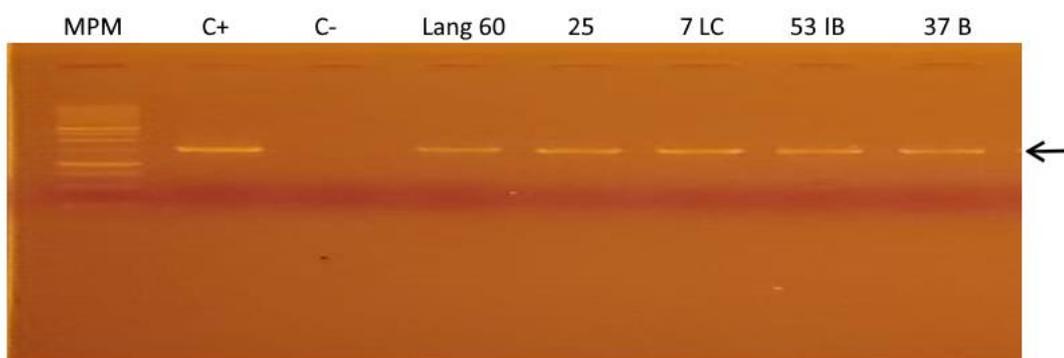


Figura 8. Migración de amplicones en gel de agarosa de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias aisladas. MPM: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, Lang 60 y 25: cepas de *Vibrio*, 53 IB y 37 B: cepas de *Bacillus*, 7 LC: cepas de otra especie.