

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN
AMBIENTAL



**Utilización de bacterias ácido lácticas y extractos vegetales como
alternativas para reducir el uso de antibióticos en el cultivo de
*Litopenaeus vannamei***

**Tesis para optar el grado académico de Maestra en Ciencias con
mención en Gestión Ambiental**

Autora

Br. Nicole Alessandra Vergara Alfaro

Tumbes, 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL



Utilización de bacterias ácido lácticas y extractos vegetales como alternativas para reducir el uso de antibióticos en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón
ORCID: 0000-0003-2921-4523

PRESIDENTE

Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña
ORCID: 0000-0001-6541-7075

SECRETARIA

Dr. Alberto Ordinola Zapata
ORCID: 0000-0002-9644-0531

VOCAL Y ASESOR

Tumbes, 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL



Utilización de bacterias ácido lácticas y extractos vegetales como alternativas para reducir el uso de antibióticos en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*

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

Br. Nicole Alessandra Vergara Alfaro
ORCID: 0009-0005-7465-3957


AUTORA

Dr. Alberto Ordinola Zapata
ORCID: 0000-0002-9644-0531


ASESOR

Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suárez
ORCID: 0000-0003-2395-5056


COASESOR

Mg. John Estuardo Sandoval Ramayoni
ORCID: 0000-0002-9928-5805


COASESOR

Tumbes, 2026

Acta de revisión y defensa de tesis



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

"Año de la Esperanza y el Fortalecimiento de la Democracia"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los veintitrés días del mes de enero del dos mil veintiséis, siendo las dieciséis horas en el aula N° 02 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes se reunieron los miembros del jurado calificador constituidos con la **RESOLUCIÓN N° 048-2024/UNTUMBES-EPG-D** del nueve de febrero de 2024, presidido por el **Dr. Auberto Hidalgo Mogollón** e integrado por la **Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña** (secretaria) y el **Dr. Alberto Ordinola Zapata** (vocal y asesor). Se contó con la presencia del **Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suarez** y del **Mg. John Estuardo Sandoval Ramayoni**, coasesores de la tesis, reconocidos con la **RESOLUCIÓN N° 547-2023/UNTUMBES-EPG-D** del 14 de noviembre de 2023.

Instalado el jurado, se procedió a la evaluación, deliberación y calificación del acto de la sustentación de la tesis titulada: **"Utilización de bacterias ácido lácticas y extractos vegetales como alternativas para reducir el uso de antibióticos en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*"**, presentada por la maestranda: **Nicole Alessandra Vergara Alfaro**, del programa de Maestría en Ciencias con mención en Gestión Ambiental.

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte de la sustentante y después de la correspondiente deliberación, el jurado conforme a lo normado en el artículo N° 111 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, declara a la egresada **...APROBADA...** con el calificativo de **...SORPRESALIENTE...**

Por lo anterior, la sustentante está expedita para iniciar los trámites correspondientes y conducentes a la obtención del grado académico de **Maestro en Ciencias con mención en Gestión Ambiental**, en conformidad con lo normado en la Ley Universitaria N° 30220, el Texto Único Ordenado del Estatuto, el Reglamento General, el Reglamento General de Grados y Títulos y el Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las diecisiete horas y cero minutos, del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de público asistente.

Tumbes, 23 de enero de 2026

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón
(Presidente)
DNI 00250460

<https://orcid.org/0000-0003-2921-4523>

Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña
(Secretaria)
DNI 00217076

<https://orcid.org/0000-0001-6541-7075>

Dr. Alberto Ordinola Zapata
(Vocal y asesor)
DNI 00326333

<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>

C. c.
Jurado de Tesis (3)
Coasesores (2)
Interesada (1)
Unidad de investigación (1)
Archivo (Director EPG) (1)

Nicole Alessandra VERGARA ALFARO

2026.01.09. Tesis Maestría. Nicole Alessandra Vergara Alfaro (1)

 Tesis de posgrado

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:545061204

Fecha de entrega

9 ene 2026, 13:49 GMT-5

Fecha de descarga

9 ene 2026, 14:17 GMT-5

Nombre del archivo

2026.01.09. Tesis Maestría. Nicole Alessandra Vergara Alfaro (1).docx

Tamaño del archivo

8,7 MB

87 páginas

19.928 palabras

114.127 caracteres



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




6% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el Informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

- 5%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de Integridad

N.º de alertas de Integridad para revisión

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



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

Fuentes principales

- 5% Fuentes de Internet
- 1% Publicaciones
- 2% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	repositorio.untumbes.edu.pe	4%
2	Trabajos del estudiante	Universidad Nacional de Tumbes on 2020-10-01	<1%
3	Internet	www.tci-thaijo.org	<1%
4	Internet	www.biorxiv.org	<1%
5	Trabajos del estudiante	Universidad Nacional de Tumbes on 2018-06-14	<1%
6	Internet	1library.co	<1%
7	Publicación	Ayerim García, Carlos Martínez, Rosa Isela Juárez, René Téllez et al. "Resistencia a...	<1%
8	Internet	lume.ufrgs.br	<1%
9	Trabajos del estudiante	Universidad Nacional de Tumbes on 2024-01-17	<1%
10	Trabajos del estudiante	Universidad de las Islas Baleares on 2021-09-14	<1%
11	Internet	repositorio.upec.edu.ec	<1%

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

12 Internet

revistas.uas.edu.mx

<1%

13 Internet

www.colibri.udelar.edu.uy

<1%



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

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios Padre Celestial por darme la salud para avanzar en mis estudios de posgrado. Le agradezco por ser mi guía y compañía constante en cada etapa de mi vida profesional.

A mis dos hermanas que son mi motivación en esta nueva etapa profesional; de igual manera a mí tío Hugo Alfaro por sus valiosos consejos y apoyo incondicional, a mis abuelas, bisabuela, tías y tíos.

A mis padres por ser mi mayor inspiración y motivación, que con su apoyo incondicional han sido pilares fundamentales en mis estudios de maestría.

A mi prometido Wagner Paúl Campaña Maza por su gran apoyo durante la fase de la ejecución de mi tesis. Sus consejos sabios y su constante motivación fueron fundamentales para que pudiera avanzar con entusiasmo y dedicación mi trabajo de investigación. Su acompañamiento ha sido un pilar esencial en este proceso.

Nicole Alessandra Vergara Alfaro

AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud a la Universidad Nacional de Tumbes por el financiamiento otorgado al Proyecto de Investigación de canon y sobrecanon petrolero, denominado: “Desarrollo de alternativas terapéuticas para el desarrollo de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos en *Litopenaeus vannamei*” aprobado mediante Resolución N° 0904-2018/UNTUMBES-CU. Asimismo, agradezco al Dr. Alberto Ordinola Zapata, responsable del mencionado proyecto de investigación, por permitirme desarrollar mi tesis dentro del proyecto que dirige, este proyecto desempeño un papel fundamental en la realización de mi tesis, ya que apoyo su financiamiento.

Agradezco sinceramente a mi asesor, Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su constante apoyo y orientación durante todas las etapas de esta investigación: desde la elaboración del proyecto hasta la ejecución y redacción de los resultados. De igual manera, extiendo mi gratitud a mis coasesores, el Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suárez y el Mg. John Estuardo Sandoval Ramayoni, ya que cuyas sugerencias y aportes fueron fundamentales para el éxito y la culminación de esta tesis.

Agradezco a los miembros de mi jurado: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña y Dr. Alberto Ordinola Zapata, por sus valiosas contribuciones y recomendaciones, las cuales permitieron enriquecer tanto mi proyecto de tesis como el informe final.

A los técnicos de laboratorio y personal que labora en los proyectos de investigación de los docentes Renacyt de la FIPCM: Mg. Wagner Paul Campaña Maza, Mg. Yeni Emperatriz Seminario Yamunaqué, Técnico Pedro Masías Ramírez, Mg. Robert Peralta Otero y Ing. Cristhofer Joel Villar Cruz, por su desinteresado apoyo en la ejecución de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	21
2.1. Bases teóricas.....	21
2.1.1. Manglares del Perú	21
2.1.2. Polución asociada a antibióticos	21
2.1.3. Uso de antibióticos en la acuicultura	22
2.1.4. Enfermedades causadas por <i>Vibrio</i>	23
2.1.5. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> en el cultivo de langostino	23
2.1.6. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas	24
2.1.7. Uso de bacterias ácido lácticas en la acuicultura	24
2.1.8. Fitobióticos	25
2.1.8. Uso de neem y orégano como fitobióticos	26
2.2. Antecedentes	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Lugar y periodo de ejecución de la investigación	31
3.2. Tipo y diseño de investigación.....	31
3.3. Población y muestra de estudio.....	31
3.4. Lugar de recolección de las muestras.	31
3.5. Recolección de la muestra langostinos silvestres y de cultivo.....	32
3.6. Obtención de muestras de hepatopáncreas e intestino para el cultivo bacteriano.....	32
3.7. Aislamiento de <i>Vibrio</i> spp.	32
3.8. Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas.....	32
3.9. Purificación de colonias.	33
3.10. Conservación de cepas bacterianas.....	33
3.11. Resistencia antibiótica de cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	33
3.12. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de las bacterias ácido lácticas	35
3.13. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los extractos de neem y orégano.	36
3.14. Ensayo de inhibición <i>in vivo</i>	36

3.15. Identificación molecular de las cepas bacterianas.....	37
3.16. Plan de procesamiento y análisis de datos.....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Características externas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	40
4.2. Aislamiento de cepas bacterianas en medio de cultivo Hi Crome y MRS en langostinos silvestres y de cultivo.....	41
4.3. Caracterización de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres en medio de cultivo Hi crome Vibrio agar.	42
4.4. Caracterización de cepas bacterianas aisladas de langostinos de cultivo en medio MRS.....	44
4.5. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres y de cultivo.....	46
4.6. Resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres.....	47
4.7. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas bacterianas aislados de langostinos silvestres.....	49
4.8. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de extractos vegetales frente a cepas de <i>Vibrio</i> spp. aisladas de langostinos silvestres.....	53
4.9. Carga de <i>Vibrio</i> spp. en hepatopáncreas de langostinos infectados experimentalmente y tratados con extractos de neem y orégano.	56
4.10. Supervivencia de langostinos infectados con cepas de <i>Vibrio</i> spp. y tratados con extractos vegetales neem y orégano.	58
4.11. Conteos de <i>Vibrio</i> spp. en langostinos infectados y tratados con cepas de BAL.....	60
4.12. Supervivencia de langostinos infectados con cepas de <i>Vibrio</i> spp. y tratados con cepas de BAL.....	61
V. CONCLUSIONES.....	63
VI. RECOMENDACIONES	64
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Lista de antibióticos empleados en el ensayo <i>in vitro</i> contra <i>Vibrio</i> spp. .	34
Tabla 2. Peso y longitud (Media \pm DE) de langostino silvestre y de cultivo colectados en el manglar de Tumbes	40
Tabla 3. Cepas bacterianas aisladas de langostino silvestre y del cultivo en medio de cultivo HiCrome Vibrio agar y MRS	41
Tabla 4. Caracterización de colonias aisladas del hepatopáncreas de langostinos silvestres en medio de cultivo HiCrome Vibrio.....	43
Tabla 5. Caracterización y tinción Gram de cepas bacterianas aisladas en MRS a partir del intestino de langostino de cultivo.....	45
Tabla 6. Identificación molecular de cepas aisladas de langostino silvestre (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	47
Tabla 7. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> spp. aislados e identificados de langostinos silvestres	48
Tabla 8. Resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas en medio de cultivo Hicrome Vibrio en langostinos silvestres	49
Tabla 9. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas <i>Vibrio</i> spp. aislados de langostino silvestre	50
Tabla 10. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas en medio de cultivo Hicrome Vibrio en langostinos silvestres	52
Tabla 11. Enfrentamiento <i>in vitro</i> extractos vegetales diluidos en alcohol contra cepas de <i>Vibrio</i> spp.	54
Tabla 12. Diámetro de los halos de inhibición producidos <i>in vitro</i> por el de extracto de orégano diluido en alcohol contra <i>Vibrio</i> spp.....	54
Tabla 13. Diámetros de los halos de inhibición (mm) producidos por bacterias ácido lácticas en cepas de <i>Vibrio</i> spp. <i>in vitro</i>	56
Tabla 14. Carga de <i>Vibrio</i> spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos tratados con extracto de neem durante el ensayo <i>in vivo</i>	57
Tabla 15. Carga de <i>Vibrio</i> spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos tratados con extracto de orégano durante el ensayo <i>in vivo</i>	57
Tabla 16. Carga de <i>Vibrio</i> spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos tratados con extracto de ácido lácticas durante el ensayo <i>in vivo</i>	61

Tabla 17. Diámetro de halos de inhibición (mm) en cepas de <i>Vibrio</i> spp. aisladas de langostinos silvestres	91
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Puntos de corte para determinación de resistencia de <i>Vibrio</i> spp. a varios antibióticos.....	34
Figura 2. Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas de <i>Vibrio</i> spp. aislados de langostinos silvestres	51
Figura 3. Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas aisladas en medio HiCrome Vibrio en langostinos silvestres	53
Figura 4. Supervivencia de langostinos aplicando extracto de neem en el ensayo <i>in vivo</i> sin considerar los sacrificios del experimento	59
Figura 5. Supervivencia de langostinos aplicando extracto de orégano en el ensayo <i>in vivo</i> sin considerar los sacrificios del experimento	59
Figura 6. Supervivencia de los langostinos considerando el sacrificio intencional de langostinos	62
Figura 7. Biometría en ejemplares de <i>Litopenaeus vannamei</i>	85
Figura 8. Toma de tejidos de langostinos silvestres.....	85
Figura 9. Siembra de cepas en medio HiCrome Vibrio y MRS.....	86
Figura 10 Procedimiento de tinción de Gram	86
Figura 11. Pruebas bioquímicas aplicadas en <i>Vibrio</i> spp.....	86
Figura 12. Realización de antibiogramas de cepas bacterianas.	87
Figura 13. Antibiograma realizado en las cepas DRTS-50 y DRTS-44 de <i>Vibrio</i> spp. aisladas de langostinos silvestres	87
Figura 14. Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición utilizando cepas de BAL etiquetadas como LCL contra la cepa DRTS de <i>Vibrio</i> spp.....	88
Figura 15. Extracción de ADN usando el protocolo de PBS.....	89
Figura 16. Preparación de las muestras para la PCR.	89
Figura 17. PCR y electroforesis.....	89
Figura 18. Ensayo <i>in vivo</i>	90
Figura 19. Tratamiento a los langostinos infectados.	90

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Formulario de registro de datos de langostinos silvestres.....	83
Anexo 2. Recolección de langostinos silvestres y obtención de tejidos	84
Anexo 3. Microbiología de trabajo de investigación	85
Anexo 4. Procedimiento para la identificación molecular de las cepas	89
Anexo 5. Ensayos <i>in vivo</i>	90
Anexo 6. Diámetros de halos de inhibición producidos por antibióticos en cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	91

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial terapéutico de cepas nativas ácido lácticas (BAL) aisladas de *Litopenaeus vannamei*, así como de extractos vegetales de neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*), con la finalidad de inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. y reducir el uso de antibióticos aplicados en la acuicultura. Se utilizaron 10 langostinos silvestres de las zonas de Puerto Pizarro y La desembocadura río Tumbes. Además, se recolectaron 10 ejemplares de langostinos de cultivo, adquiridos de una empresa langostinera ubicada en Puerto Hualtaco (Ecuador). Los ejemplares fueron sacrificados disminuyendo la temperatura corporal. Se extrajeron muestras de hepatopáncreas e intestinos y fueron sembradas en medio HiCrome Vibrio agar y medio MRS para el aislamiento de *Vibrio* spp. y BAL, las cepas se purificaron en TSA y se realizaron antibiogramas para determinar la resistencia antibiótica de las cepas bacterianas frente a 10 antibióticos. Las cepas de *Vibrio* spp. mostraron resistencia a la ampicilina (100%), fosfomicina (33,3%), oxitetraciclina y estreptomicina (16,7%). En el ensayo *in vitro* de extractos vegetales, se evidenció que los mejores resultados fueron para el extracto de orégano, que inhibió a todas las cepas de *Vibrio* spp. e incluso fue capaz de inhibir a una de ellas en una dilución 10^{-3} . En el ensayo *in vivo* utilizando los extractos de neem y orégano se observó que con casi todas las dosis aplicadas en el alimento (2,5, 5 y 10 g/kg) se redujo la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas hasta 0 UFC/g al final del experimento. En el ensayo *in vivo* utilizando cepas de BAL se observó que todas las cepas aplicadas en el alimento redujeron la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas al final del experimento. Finalmente, los extractos vegetales y las cepas de BAL mostraron supervivencia de 100% durante el ensayo *in vivo*.

Palabras clave: BAL, extractos, neem, *in vivo*, *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the therapeutic potential of native lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from *Litopenaeus vannamei*, as well as plant extracts of neem (*Azadirachta indica*) and oregano (*Origanum vulgare*), to inhibit the growth of *Vibrio* spp. and reduce the use of antibiotics in aquaculture. Ten wild shrimps from the Puerto Pizarro and Tumbes River mouth areas were used. In addition, 10 farmed shrimps were collected from a shrimp farm located in Puerto Hualtaco, Ecuador. The shrimps were euthanized by lowering their body temperature. Samples of hepatopancreas and intestines were extracted and cultured on HiCrome *Vibrio* agar and MRS medium for the isolation of *Vibrio* spp. In the LAB assay, the strains were purified in TSA and antibiograms were performed to determine the antibiotic resistance of the bacterial strains to 10 antibiotics. *Vibrio* spp. strains showed resistance to ampicillin (100%), fosfomicin (33.3%), oxytetracycline, and streptomycin (16.7%). In the *in vitro* assay of plant extracts, the best results were obtained with oregano extract, which inhibited all *Vibrio* spp. strains and was even able to inhibit one of them at a 10^{-3} dilution. In the *in vivo* assay using neem and oregano extracts, it was observed that with almost all doses applied in the feed (2.5, 5, and 10 g/kg), the *Vibrio* load in the hepatopancreas was reduced to 0 CFU/g at the end of the experiment. In the *in vivo* assay using LAB strains, all strains applied in the feed reduced the *Vibrio* load in the hepatopancreas at the end of the experiment. Finally, the plant extracts and LAB strains showed 100% survival during the *in vivo* assay.

Keywords: BAL, extracts, neem, *in vivo*, *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN.

El manglar es un ecosistema acuático altamente productivo y rico en biodiversidad a nivel global. A pesar de su importancia, enfrenta graves amenazas, se estima que entre 1996 a 2020, es decir en el lapso de 25 años, ha perdido el 3,4% de su extensión mundial (Arnaud et al., 2023; Rull, 2023; Segaran et al., 2023).

En Perú, el ecosistema del manglar más extenso e importante se encuentra en la región de Tumbes, aunque existen manglares más pequeños en la región Piura (Martinez, 2022; Seminario-Córdova et al., 2022); el manglar de Tumbes constituye la porción más septentrional de la región biogeográfica Tumbes-Chocó-Magdalena, la cual es el noveno *hotspot* más biodiverso del planeta (Pérez-Escobar et al., 2019).

Entre las principales fuentes de contaminación en el manglar, se destaca la contaminación provocada por antibióticos, que a su vez origina la selección de bacterias resistentes así como de sus genes de resistencia, todos ellos son considerados también elementos contaminantes (Jang et al., 2018; Ruan et al., 2020; Yang et al., 2018).

Los residuos antibióticos, bacterias resistentes y sus genes pueden migrar desde los componentes no bióticos, como los sedimentos y el agua, hacia los componentes bióticos, ingresando a la cadena alimentaria. Esto puede llevar a que lleguen finalmente a los seres humanos pudiendo dar lugar a graves infecciones nosocomiales que causan anualmente 700 000 muertes (Chow et al., 2021; Yuan et al., 2019).

Las tetraciclinas, y en particular la oxitetraciclina (OTC), son antibióticos ampliamente utilizados a nivel mundial (Guo et al., 2021; Liu et al., 2019). Dado que la OTC, así como otros antibióticos, como la enrofloxacin, florfenicol y norfloxacin se utilizan con frecuencia en la alimentación de langostinos cultivados en zonas cercanas al manglar para tratar infecciones por *Vibrio* spp. que es el principal patógeno bacteriano para estos animales (Tinoco et al., 2023), es probable que dichos antibióticos también estén ingresando al manglar contaminándolo (Aguirre et al., 2021; Rosado, 2018).

Los antibióticos son muy utilizados en acuicultura y ganadería (Mog et al., 2020), lamentablemente, mucho del antibiótico proporcionado (hasta 80%) no permanece en el organismo tratado sino que escapa por la orina y heces pasando a contaminar el ambiente (Manage, 2018).

Debido al impacto ambiental que producen los antibióticos, su uso cada vez está siendo más restringido en acuicultura, por lo que se están buscando alternativas para tratar enfermedades de los animales en cultivo sin el uso de los mismos. Dos de dichas alternativas son el uso de probióticos y de plantas con propiedades antibacterianas (Mendoza & Ordinola-Zapata, 2022; Tinoco et al., 2023).

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son bacterias frecuentemente utilizadas como probióticos puesto que muestran una fuerte actividad antimicrobiana y son reconocidos como microorganismos generalmente seguros (Khelissa et al., 2021; Tinoco et al., 2023).

Entre las plantas que han demostrado poder antibacteriano contra *Vibrio* spp. se tienen al neem (*Azadirachta indica*) y al orégano (*Origanum vulgare*) (Herrera-Calderon et al., 2019).

Estas bacterias y plantas se hallan en la región Tumbes, son asequibles, por lo que podrían ser investigadas para determinar si presentan un poder antibacteriano suficiente como para poder ser utilizados en reemplazo de antibióticos en el tratamiento de infecciones por *Vibrio* spp. en el cultivo de langostino (*L. vannamei*).

En consecuencia, el objetivo de esta investigación fue:

Evaluar el potencial terapéutico de cepas nativas de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei*, y de extractos vegetales de neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*), para inhibir *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos aislados de *Litopenaeus vannamei*.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Bases teóricas.

2.1.1. Manglares del Perú

Los manglares en Perú se distribuye principalmente en los departamentos costeros más septentrionales: Tumbes y Piura, siendo Tumbes la región con mayor extensión, con aproximadamente 4 541 hectáreas, en comparación con sólo 300 hectáreas registradas en Piura (Ordinola, 2022; Ordinola-Zapata et al., 2020). El manglar tumbesino incluye zonas protegidas como es el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes, con un área de 2972 ha y zonas no protegidas como Puerto Pizarro, en el cual se realizan diversas actividades humanas, que incluye entre otros la acuicultura de langostinos (Morán & Hidalgo, 2018; Ordinola-Zapata et al., 2019).

Los manglares en todo el mundo están amenazados por la contaminación por diferentes tipos de poluentes, como metales pesados, microplásticos, compuestos disruptores endocrinos (EDCs), productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), poluentes orgánicos persistentes (POPs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) e incluso antibióticos. Estos últimos son considerados contaminantes emergentes en estos ecosistemas (Deng et al., 2021; Maiti & Chowdhury, 2013; Zheng et al., 2021).

2.1.2. Polución asociada a antibióticos

La industria de antibióticos ha experimentado un aumento en su producción considerable, con grandes cantidades de antibióticos veterinarios fabricados en los Estados Unidos y China. La elevada producción de estos aunados a que una parte significativa de estos no se metaboliza en los animales y personas (entre 25% y 75% de los antibióticos se excretan sin metabolizar), lo que conduce a incrementar, en los ecosistemas receptores naturales, los residuos de antibióticos (Xu et al., 2021) y por consiguiente a su contaminación. Se espera que la producción de antibióticos continúe aumentando, lo que representa un desafío adicional para el

mundo pues deberá enfrentar un nivel más alto de contaminación por estas sustancias (Van Boeckel et al., 2015)

2.1.3. Uso de antibióticos en la acuicultura

El crecimiento acelerado de la acuicultura impulsada por la necesidad de suplir alimentos de origen acuático, aunado a su intensificación y globalización ha propiciado la emergencia de nuevas enfermedades que atacan a los organismos acuáticos cultivados, principalmente por bacterias gram negativas; por ello se ha incrementado el uso de antibióticos, dadas las características de los animales en cultivo y del medio acuático, en el que es impráctico tratar de medicar solo a los organismos enfermos, sino que el antibiótico debe ser aplicado al alimento de manera que alcance a los animales enfermos e incluso a los sanos, es por ello que se puede dar algunas veces una sub dosificación; sin embargo, los antibióticos en el medio acuático se aplican en dosis superiores a las aplicadas en el medio terrestre, esto puede darse de manera desproporcionada, como es el caso del cultivo del salmón en Chile, en que se han empleado hasta 660 g de antibióticos por cada tonelada de salmón producida (Bondad-Reantaso et al., 2023; Hossain et al., 2022).

El cultivo de langostinos *L. vannamei*, de igual manera, ha mostrado un notorio crecimiento en los últimos años debido a la alta demanda a nivel mundial. Sin embargo, también se ha incrementado las enfermedades originadas por diversos patógenos las cuales periódicamente producen brotes epidémicos, de los cuales el más reciente fue el síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) que es originada por bacterias del género *Vibrio* (Flegel, 2019). En el tratamiento de estas enfermedades, se ha utilizado habitualmente florfenicol, enrofloxacin y oxitetraciclina (Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

Los langostinos reciben antibióticos a través del alimento balanceado; la lixiviación del fármaco, el alimento medicado no consumido así como las excretas de los langostinos en los que se pueden expulsar entre 25 y 75% del antibiótico, contribuyen a acumular en los sedimentos los residuos antibióticos, lo que puede promover la selección de cepas bacterianas que resisten o incluso multirresisten a los antibióticos (Santiago et al., 2009).

2.1.4. Enfermedades causadas por *Vibrio*

Una serie de enfermedades son originadas por bacterias *Vibrio* spp., de manera genérica se denominan vibriosis, estas han provocado mortalidades elevadas en los cultivos de *L. vannamei*, resultando en pérdidas económicas a nivel global de miles de millones de dólares, según datos del Banco Mundial en 2014 (World Bank, 2014).

Las cepas de este género son principalmente oportunistas, se encuentran comúnmente en las branquias, el intestino y el exoesqueleto de langostinos. Estas pueden ingresar a través de heridas y causar manchas oscuras en el exoesqueleto de los langostinos. El intestino medio, que alberga la glándula digestiva o hepatopáncreas, es otro órgano afectado por estas bacterias, que pueden ingresar a través del agua, los alimentos o los sedimentos (Morales-Covarrubias, 2008).

Una de las enfermedades provocadas por *Vibrio* spp. es la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), que ha causado graves pérdidas en la industria de la cría de langostinos. Esta enfermedad se manifiesta con altas tasas de mortalidad en todas las etapas del cultivo, desde la pre-cría hasta el engorde. El agente etiológico de esta enfermedad correspondió a ciertas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que poseen como parte de su genoma un plásmido que porta genes denominados *PirAB*, los que codifican una toxina que destruye las células del hepatopáncreas y desencadenan el síndrome, fueron el primer agente etiológico identificado para dicha enfermedad; pero, posteriormente, se descubrió que otras cepas de *Vibrio* como *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. owensii* y *V. punensis* también portaban este plásmido y producían la misma toxina (Aranguren et al., 2020; Soto-Rodriguez et al., 2024; Williams et al., 2017)

2.1.5. Resistencia antibiótica de *Vibrio* en el cultivo de langostino

La resistencia antibiótica se origina a través de mutaciones en los genes que codifican las dianas de los antibióticos, proteínas o enzimas que participan en las vías metabólicas en las que actúan los antibióticos, o incluso en las bombas de eflujo que expulsan activamente el antibiótico del citoplasma. Una vez que un gen ha mutado y se ha convertido en un gen de resistencia antibiótica, puede transmitirse tanto vertical como horizontalmente, lo que facilita la propagación de la resistencia a los antibióticos entre las comunidades microbianas acuáticas,

incluyendo las bacterias patógenas para los humanos (Magiorakos et al., 2012; Pepi & Focardi, 2021).

2.1.6. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas

Los probióticos son utilizados en la producción animal, incluyendo la acuicultura, estas son cepas microbianas beneficiosas, en el caso de las bacterias pueden corresponder a diversos grupos, como las bacterias ácido lácticas (BAL), *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Las BAL son bacterias bacilares gram positivas no esporulantes, inmóviles y, fundamentalmente, capaces de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico. Se ha demostrado que estas bacterias pueden colonizar rápidamente el intestino, competir eficazmente por espacio y nutrientes, inhibir a muchos patógenos y modular el sistema inmune del hospedero al estimular la síntesis de enzimas como la superoxidasa, fenoloxidasas y peroxinectinas (Pérez-Sánchez et al., 2014; Quispe et al., 2020).

2.1.7. Uso de bacterias ácido lácticas en la acuicultura

Las BAL se usan ampliamente para combatir enfermedades infecciosas originadas por diversas bacterias y que afectan a la acuicultura; Pérez-Sánchez et al. (2014) mencionan que en numerosos estudios se han empleado bacterias del género *Lactobacillus* spp. y *Carnobacterium* spp. en la acuicultura para tratar diversas enfermedades bacterianas en peces y langostinos. Así se han utilizado *L. carnarum*; para inhibir *Vibrio alginolyticus* en el langostino (*Litopenaeus vannamei*). *L. rhamnosus* y *L. sakei* para tratar la enfermedad originada en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por *Aeromonas salmonicida* a; *Carnobacterium inhibens* para inhibir *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* en la trucha *O. mykiss*, así como para inhibir *Vibrio* spp. en el rodaballo *Scophthalmus maximus*. *Lactobacillus plantarum* ha demostrado ser eficaz contra *Aeromonas salmonicida* en la trucha *Salmo trutta* y contra *Vibrio* spp. en el pez *Scophthalmus maximus*.

Adicionalmente, los estudios de Tinoco et al. (2023), Huynh et al. (2019), Tank et al. (2018) y Sha et al. (2016) han demostrado la capacidad inhibidora de cepas de BAL tales como *Enterococcus faecium*, *L. pentosus*, *L. plantarum* sobre *Vibrio* spp. en el langostino *L. vannamei*.

2.1.8. Fitobióticos

Los fitobióticos son productos o compuestos derivados de plantas que pueden tener beneficios en la salud animal e incluso en la salud humana. Los fitobióticos se obtienen de vegetales como frutas, hierbas, legumbres y aceites esenciales. Pueden ser utilizados como plantas enteras o más comúnmente extrayendo sus compuestos bioactivos, que incluyen entre otros, compuestos fenólicos, carotenoides y alcaloides. Las características de los fitobióticos se determinan según la presencia de estos compuestos bioactivos. Por ejemplo, la existencia de compuestos fenólicos en los fitobióticos puede contribuir a su propiedad antioxidante. Además, se ha informado que los fitobióticos tienen otras notables características, como propiedades anti-inflamatorias y antimicrobianas. Por ello, se emplean ampliamente en la producción animal como promotores del crecimiento y de la producción (Kari et al., 2022).

Numerosas plantas contienen compuestos metabólicos que pueden utilizarse con fines medicinales como lignanos, lactonas, limonoides, melicianinas, simarubalidanos, terpenoides, quinonas, cumarinas, flavonoides, taninos, alcaloides entre otros. Aunque la proporción de tales compuestos en la planta puede variar de acuerdo a la parte de la planta, la zona geográfica y el tiempo de cosecha (Mohammadi & Kim, 2018; Prieto et al., 2005)

Algunas investigaciones muestran que los extractos obtenidos de diversas plantas, entre las cuales se mencionan a *Thymus vulgaris* (tomillo), *Salvia officinalis* (salvia), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Hyssopus officinalis* (hisopo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Melissa officinalis* (bálsamo), *Origanum vulgare* (orégano) y *Azadirachta indica* (neem) tienen un fuerte poder antibacteriano, por lo que representarían una buena alternativa a los antibióticos en la acuicultura del langostino (Aguirre et al., 2021; Campoverde, 2015).

En la región de Tumbes, existen numerosas plantas con propiedades fitobióticas antimicrobianas que podrían reemplazar a los antibióticos en el cultivo de *L. vannamei*; plantas, como *A. indica* y *O. vulgare* que han demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Vibrio* y otras bacterias Gram negativas (Aguirre et al., 2021; Banerjee et al., 2013; Kannappan et al., 2018).

2.1.9. Uso de neem y orégano como fitobióticos

Azadirachta indica, conocido como neem, es un árbol de la familia Meliaceae que se ha utilizado en la medicina tradicional para tratar enfermedades de la piel, como antipirético, diurético, antiséptico, antitumoral, inductor de interferón y agente antibacteriano. El aceite esencial del neem contiene numerosos compuestos bioactivos, como azadiractina, gedunina, isomargolonona, margolona, nimbidina, nimbina, nimbolida y salanina, que le confieren propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, repelentes de insectos y anticancerígenas, entre otras (Ghosh et al., 2016).

El aceite esencial de neem ha mostrado ser tan efectivo como ciertos antibióticos, como la tetraciclina, ampicilina y ciprofloxacina, contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Vibrio parahaemolyticus* (Ghosh et al., 2016), *Salmonella paratyphi* y *Salmonella typhi* (Al Akeel et al., 2015), así como contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Quelemes et al., 2015).

El orégano (*Origanum vulgare*) es otra planta que se ha utilizado como fitobiótico debido a que contiene flavonoides, alcoholes alifáticos, fenoles (timol y carvacrol), ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico y clorogénico), taninos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. Su aceite esencial tiene propiedades antimicrobianas contra bacterias ya sean del grupo de las Gram positivas o de las Gram negativas, debido a su acción en los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana. Son efectivos contra diversos patógenos entre los que se mencionan a *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhinurium*, (Aguirre et al., 2021; Campoverde, 2015).

2.2. Antecedentes

Algunas investigaciones que emplearon bacterias ácido lácticas para combatir *Vibrio* spp. en langostinos *Litopenaeus vannamei* se resumen a continuación:

Sha et al. (2016), investigaron la capacidad probiótica de BAL, incluida *Lactobacillus pentosus*, contra *Vibrio* spp. aisladas a partir de *Litopenaeus*

vannamei. Los tratamientos consistieron en cepas de bacterias ácido lácticas solas o combinadas: T1 (*Enterococcus faecium*), T2 (*L. pentosus* cepa HC-2), T3 (cultivo mixto de *E. faecium* y *L. pentosus* cepa HC-2), T4 (control sin cepas bacterianas probióticas), T5 (polimixina B, control positivo) y T6 (caldo Man Rogosa Sharpe o MRS sin cepas bacterianas, control negativo). El experimento se llevó a cabo *in vitro* empleando la técnica de difusión en pozo de agar. *L. pentosus* HC-2 demostró una alta actividad probiótica contra cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*, lo que lo convierte en una posible alternativa para controlar a *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*.

Huynh et al. (2019), llevaron a cabo un experimento en el que combinaron la BAL probiótica *Lactobacillus plantarum* con tres prebióticos: fructooligosacárido, galactooligosacárido y manano oligosacárido. La combinación de *L. plantarum* y galactooligosacárido se evaluó en términos de crecimiento, conteo de *Vibrio* spp. en el tracto intestinal y producción de enzimas digestivas. Aunque esta combinación no aumentó el crecimiento de los langostinos, permitió a los langostinos producir más ácido láctico y proteasas. Además, incrementó la actividad de la leu-aminopeptidasa y β -galactosidasa, mientras que redujo el conteo de *Vibrio* spp. Esto demostró la utilidad de esta combinación como probiótico en el cultivo de langostinos.

Delgado-Díaz et al. (2022), evaluaron 40 cepas de BAL probióticas nativas aisladas de langostinos *Litopenaeus vannamei*. Dos cepas, *Lactobacillus paracasei* (E91) y *Lactococcus lactis* (E33), cumplieron con los requisitos necesarios para ser utilizadas como probióticos. Estas cepas se probaron en un ensayo a nivel de campo, donde se compararon con un biorremediador comercial y un probiótico comercial. *In vitro*, *Lactobacillus paracasei* E91 y *Lactococcus lactis* E33 demostraron inhibir a *Vibrio* spp. La combinación de las cepas BAL y el biorremediador mejoró la calidad del agua de cultivo, así como aumentó la supervivencia y el rendimiento de los langostinos en el cultivo.

En relación a investigaciones realizadas en Tumbes sobre BAL nativas usadas como probióticos en el cultivo de langostino, la literatura científica es limitada. No obstante, se encontró un estudio realizado por Tinoco et al. (2023), que evaluó las

propiedades probióticas de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas aisladas del langostino blanco *L. vannamei* contra cepas de *Vibrio* spp., resistentes o sensibles a antibióticos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se observó que *in vitro* las cepas BAL: F1L, F3L y C1L, inhibieron todas las cepas de *Vibrio* spp.. Además, *in vivo*, las cepas C1L y F1L inhibieron el crecimiento de *Vibrio* spp. evidenciado por el menor número de colonias que se hallaron de esta bacteria en el hepatopáncreas de los langostinos, las cepas de BAL también aumentaron la supervivencia, indicando que son capaces de ejercer actividad probiótica contra *Vibrio* spp.

Respecto a estudios sobre el uso de extractos de neem y de orégano contra *Vibrio* spp. en el cultivo de langostinos, se tiene:

Banerjee et al. (2013), investigaron en cultivos de langostinos en la India, el efecto evaluado mediante dos parámetros, por un lado la concentración inhibitoria mínima también denominada MIC, y por otra parte, la concentración bactericida mínima también llamada MBC, que el extracto obtenido a partir de las hojas de *Azadirachta indica* tuvo en cepas de *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Para este propósito, obtuvieron extracto acuoso y el jugo de las hojas del vegetal, que aplicaron a cultivos de estas bacterias. Descubrieron que la MIC para *V. alginolyticus* fue de 6,25% y para *V. parahaemolyticus* de 3,13%; en tanto que la MBC fue de 25% y 12,5% respectivamente. En conclusión, las hojas de neem preparadas como jugo mostraron efectividad en inhibir a *Vibrio* spp.

Morales-Covarrubias et al. (2016), investigaron la eficacia, evaluada mediante la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la medición de los diámetros de los halos de inhibición (HI), de extractos acuosos de plata coloidal, orégano y neem en el crecimiento de cepas de *V. parahaemolyticus* que se aislaron de langostinos *L. vannamei* cultivados en agua con 5 ‰ de salinidad. Respecto a la actividad de los extractos vegetales, estos tuvieron una MIC equivalente a 62,50 mg/ml y un HI máximo de 19 mm. En tanto, que se observó una MIC de 2 mg/ml en el caso de la plata coloidal, con un HI máximo de 18,8 mm. Lo cual mostró la eficacia de estos extractos vegetales como agentes antimicrobianos.

Gracia-Valenzuela et al. (2014), estudiaron los efectos de la incorporación de orégano en forma de aceite esencial en la dieta del langostino *Litopenaeus vannamei* que fueron infectados con una dosis de 10^6 UFC/ml de *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Se evaluó la carga de *Vibrio* en el tejido muscular del langostino. Los resultados mostraron un aumento en la cantidad de bacterias en el tratamiento control, en el que no se aplicó el aceite esencial en su dieta, mientras que en los tratamientos en que sí se aplicó, la cantidad de bacterias disminuyó. Se concluyó que aplicando diariamente el aceite esencial se logró eliminar a *Vibrio* spp. en los langostinos cultivados.

Campoverde (2015), evaluó los efectos del orégano (*O. vulgare*) y de la hierba luisa (*Aloysia triphilla*) en cepas del género *Vibrio* presentes en el agua de estanques de cultivo langostinos. Para llevar a cabo este estudio, se preparó una infusión 1:1 (w/v) de la planta en agua hirviendo. Se utilizaron 21 acuarios de 2 litros y se aplicaron tres volúmenes de la infusión: 6, 8 y 10 ml. Se analizó la carga de *Vibrio* en el agua a las 12, 24 y 48 h, sembrando 10 μ l de la misma en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), y contando las colonias bacterianas luego de 24 horas de incubación. Los resultados mostraron que *Vibrio* spp. tuvieron un crecimiento menor con las infusiones de *Origanum vulgare* y de *Aloysia triphilla*.

Por último, respecto a la utilización del orégano y neem contra *Vibrio* spp. obtenidos a partir de langostinos de cultivo en Perú, existe un único antecedente:

Aguirre et al. (2021), investigaron la capacidad de extractos tanto de neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*O. vulgare*) para inhibir a *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos obtenidos de *Litopenaeus vannamei*. Se aislaron 14 cepas de *Vibrio* a partir de langostinos de cultivo de Ecuador. Además, obtuvieron una donación de 14 cepas adicionales de langostinos cultivados en Tumbes. Se determinó la resistencia de las cepas de *Vibrio* spp. frente a antibióticos, luego se determinó su sensibilidad, ante extractos acuosos, alcohólicos y extractos purificados usando soxhlet y rotaevaporador de orégano y neem. Al ensayar estos extractos contra cuatro cepas de *Vibrio*, dos de ellas resistentes y dos multirresistentes a antibióticos, se determinó que los extractos alcohólicos o acuosos de orégano y neem, no lograron inhibir ninguna de las cuatro cepas probadas. Sin embargo, el

extracto purificado mediante soxhlet y rotaevaporador de neem, al ser aplicado sin dilución, fue capaz de inhibir al 25% de las cepas resistentes a antibióticos, demostrando así tener un efecto inhibitor prometedor.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y periodo de ejecución de la investigación

La recolección de muestras para la obtención de cepas bacterianas se realizó entre marzo y diciembre de 2024. El aislamiento y los ensayos de inhibición *in vitro* se realizaron en la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (FIPCM) de la Universidad Nacional de Tumbes, específicamente en el Laboratorio de Microcultivos así como en el de Biología Molecular.

Los ensayos de inhibición *in vivo* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Acuicultura II de la FIPCM.

3.2. Tipo y diseño de investigación

La investigación correspondió al tipo aplicado y respecto a su diseño de investigación se trató de una experimental.

3.3. Población y muestra de estudio

Población. Correspondió a las cepas de BAL y de *Vibrio* presentes en los langostinos (*Litopenaeus vannamei*) provenientes del manglar de Tumbes así como de una empresa langostinera de la zona de Puerto Hualtaco (Ecuador), en el año 2024.

Muestra. La muestra estuvo compuesta por las cepas que se pudieron aislar a partir de 40 langostinos (20 silvestres y 20 de cultivo) que incluyeron tanto ejemplares saludables como presuntamente enfermos.

3.4. Lugar de recolección de las muestras.

Los langostinos silvestres fueron recolectados por pescadores artesanales en los canales de marea de dos zonas del manglar: Puerto Pizarro así como la desembocadura del río Tumbes.

En el caso de los langostinos provenientes de cultivo, estos fueron donados por una langostinera de Puerto Hualtaco (Ecuador), e incluyeron ejemplares saludables así como presuntamente afectados por vibriosis.

3.5. Recolección de la muestra langostinos silvestres y de cultivo

Diez langostinos silvestres (*L. vannamei*) fueron capturados por un pescador y transportados en baldes con agua del lugar de colecta. Se aseguró el suministro de aire con un aireador portátil, los ejemplares fueron transportados hasta el Laboratorio de Microcultivos de la FIPCM, donde se llevó a cabo su procesamiento.

3.6. Obtención de muestras de hepatopáncreas e intestino para el cultivo bacteriano

Los datos de los langostinos recolectados fueron registrados en un formato, incluyendo tanto las características externas, como heridas, color y erosiones, así como su peso y longitud.

Cada langostino fue sacrificado de manera humanitaria, reduciendo progresivamente la temperatura de su cuerpo al añadir hielo al agua en la que se encontraba. Tras su muerte, se obtuvo una porción de su hepatopáncreas equivalente a 0,1 g, así como su intestino completo. Finalmente, los tejidos fueron triturados en microtubos de 1,5 ml con maceradores metálicos previamente esterilizados. Una vez triturado el tejido, se incorporó solución salina al 2,5% hasta completar 1ml de volumen.

3.7. Aislamiento de *Vibrio* spp.

Se realizaron diluciones, de los tejidos de intestino y hepatopáncreas, en el rango de 10^0 a 10^{-4} . Se tomaron 20 μ l de inóculo de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Luego se sembraron en una placa Petri con agar HiCrome Vibrio. Las placas se sellaron con cinta parafilm y se incubaron por 24 horas a 37 °C en posición invertida.

3.8 Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas

Para el aislamiento de las BAL, se siguió la metodología de Quispe et al. (2020) con algunos cambios. El intestino se trituró con caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) estéril y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C. Culminado el periodo de incubación, se sembraron 50 μ l con un asa de Drigalsky en una placa Petri que

contenía agar MRS. Finalmente, las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas en posición invertida a 37 °C durante 48 horas.

3.9. Purificación de colonias.

Las cepas bacterianas que crecieron tanto en el medio HiCrome Vibrio como en MRS fueron seleccionadas, eligiendo las colonias más representativas. Estas se subcultivaron por agotamiento en placas con medio agar tripticasa soya (TSA), luego se sellaron con cinta parafilm y se dejaron incubar por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, para cada colonia se evaluó su morfología y se consideraron puras aquellas que presentaron la misma forma, tamaño y color.

3.10. Conservación de cepas bacterianas.

Se tomaron microtubos de 1,5 ml con 1 ml de caldo tripticasa soya (TSB). En cada uno de ellos se colocó una colonia de las cepas puras correspondientes a *Vibrio* y BAL. Los microtubos se colocaron en la incubadora durante 24 h a 37 °C. Luego de que se produjo el crecimiento de las cepas en los tubos, se preparó un microtubo de 1,5 ml adicional para cada cepa, para realizar una réplica de respaldo. En ese nuevo microtubo se colocó 950 µl de caldo TSB y 50 µl de la suspensión bacteriana de la primera siembra. Se incubaron por 24 h a 37 °C; luego, se añadió glicerol hasta una concentración final de 15 % y se conservó a -30 °C en una ultracongeladora.

3.11. Resistencia antibiótica de cepas de *Vibrio* spp.

Las cepas conservadas se reactivaron y sembraron cada una de ellas en un microtubo con 1 ml en caldo TSB, los cuales se colocaron a incubar por 24 h a 37 °C. Las bacterias que mostraron crecimiento se centrifugaron a 10 000 xg por 3 minutos para obtener un *pellet* bacteriano. Luego, se realizaron los lavados en solución salina al 2,5% con la finalidad de estandarizar la cepa a una densidad equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ cél./ml). Se tomó 100 µl de la cepa estandarizada, se colocó en una placa Petri conteniendo agar Mueller-Hinton y se esparció por toda la superficie con un asa de Drigalski. Una vez que estuvieron sembradas las cepas en las placas petri, se aplicaron los discos de antibióticos comerciales correspondientes a 10 antibióticos de 7 familias, según se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1

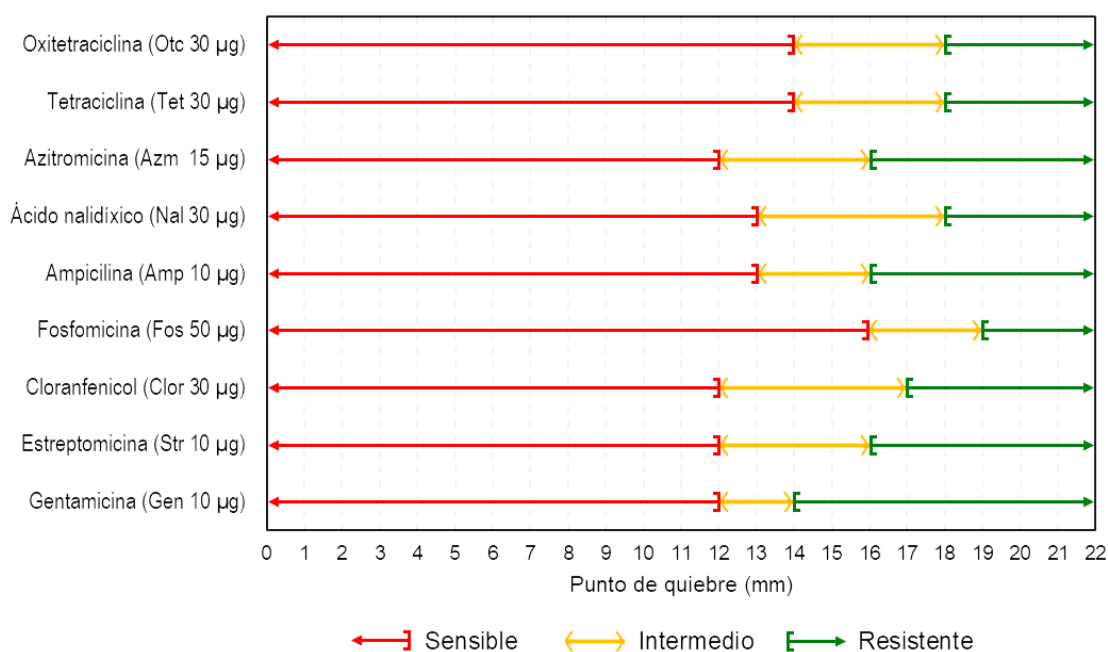
Lista de antibióticos empleados en el ensayo in vitro contra Vibrio spp.

Familia	Antibiótico	Dosis (µg)
Aminoglucósidos	Gentamicina	10
Fenicoles	Florfenicol	25
	Cloranfenicol	30
Fosfonatos	Fosfomicina	50
Penicilinas	Ampicilina	10
Quinolonas	Norfloxacin	10
	Enrofloxacin	5
	Ácido nalidíxico	30
Tetraciclinas	Tetraciclina	30
	Oxitetraciclina	30

Una vez incubadas las placas, se procedió a medir con una regla el diámetro del halo de inhibición. También se compararon los diámetros contra los puntos de corte para *Vibrio* spp. como se muestra en la figura 1.

Figura 1

Puntos de corte para determinación de resistencia de Vibrio spp. a varios antibióticos



Una vez determinada la sensibilidad o resistencia de cada cepa de *Vibrio* spp. a los antibióticos, se calculó el índice de resistencia a múltiples antibióticos (MAR) con la fórmula:

$$\text{MAR} = \text{RAN}/\text{TAN}$$

Donde:

RAN = cantidad de antibióticos a los que es resistente la cepa bacteriana

TAN= Cantidad total de antibióticos

También se determinó su multirresistencia antibiótica, cuando fue resistente al menos a un antibiótico de al menos tres familias antibióticas.

3.12. Efecto inhibitorio *in vitro* de las bacterias ácido lácticas

El efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas se determinó empleando la metodología de Lamari et al. (2014) y Rebouças et al. (2011), consistente en un ensayo de difusión en pozo de agar con algunas adaptaciones: Se estandarizó la cepa de *Vibrio* spp. a la escala de MacFarland 0,5, se sembraron 100 µl de la cepa en una placa Petri que contenía agar Müeller-Hinton y se dejó reposar durante 10 minutos. Se reactivó la bacteria ácido láctica en caldo TSB; una vez que hubo crecido, se procedió a tomar 1 ml del cultivo con una jeringa de 5 ml a la cual se añadió un filtro de membrana de Polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,22 µm, con la finalidad de retener las bacterias y obtener en el líquido filtrado el secretoma (sustancias secretadas naturalmente por las bacterias, que pueden incluir compuestos antibacterianos). a continuación, se procedió a construir, en el agar, los pozos de 6 mm de diámetro con una jeringa de 1 ml a la que se le removió la punta con un bisturí cada pozo se le adicionaron 30 µl del secretoma obtenido de la bacteria ácido láctica. Cada cepa de *Vibrio* se sembró en tres placas petri en las que se hizo el ensayo con los secretomas de las BAL; además, se emplearon discos de papel filtro previamente esterilizado como control negativo, a los cuales se les añadió solución salina al 2,5%. Como control positivo, se utilizó un disco con el antibiótico al que la cepa de *Vibrio* spp. fue más sensible. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Finalmente, se midieron los diámetros de los halos de inhibición con una regla.

3.13. Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos de neem y orégano.

Se estandarizó la cepa de *Vibrio* spp. a la escala de MacFarland 0,5, se sembraron 100 µl de la cepa en una placa Petri que contuvo agar Müeller-Hinton, luego se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación, se emplearon discos de papel filtro de 6 mm esterilizados, a los que se les agregó los extractos vegetales en diferentes concentraciones (diluciones desde 10^0 hasta 10^{-3}); los extractos fueron diluidos en alcohol. Cada cepa de *Vibrio* se sembró en tres placas petri en las que se hizo el ensayo con los extractos vegetales; además, se emplearon discos de papel filtro previamente esterilizados como control negativo, a los cuales se les añadió solución salina (2,5% de NaCl). Como control positivo, se utilizó un disco con el antibiótico al que la cepa de *Vibrio* spp. fue más sensible. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Finalmente, se midieron los halos de inhibición con una regla.

3.14. Ensayo de inhibición *in vivo*

Se evaluó el efecto inhibitorio *in vivo* de bacterias probióticas y extractos vegetales. Las cepas elegidas y las concentraciones de los extractos se seleccionaron según los siguientes criterios:

A) En el caso de las cepas de bacterias ácido lácticas, se seleccionó la que mejor efecto inhibitorio obtuvo en el ensayo *in vitro*, al igual que las cepas de *Vibrio* spp. contra las que tuvieron mejor efecto.

B) En cuanto a los extractos, se eligió la concentración que mayor efecto inhibitorio obtuvo en el ensayo *in vitro*.

Las cepas de BAL seleccionadas fueron LCL-4, LCL-23, y LCL-18; mientras que las concentraciones de los extractos vegetales de neem y orégano que se emplearon fueron al 2,5, 5, 10 g por cada kilogramo de alimento.

Se realizó el ensayo en dos fases, en la primera se evaluó el efecto de las cepas de BAL en el control de *Vibrio* spp. *in vivo* y en la segunda fase se hizo con los extractos de neem y orégano. En la primera fase se emplearon 12 acuarios de 60 l, en el caso de la segunda fase se emplearon 21 acuarios de 60 l. En cada acuario se colocaron 13 langostinos juveniles que fueron aclimatados previamente durante una semana, los cuales fueron infectados.

La infección experimental se realizó preparando una mezcla de las cuatro cepas de *Vibrio* spp. seleccionadas. Estas se hicieron crecer en caldo TSB hasta alcanzar una concentración superior a la del estándar 0,5 de MacFarland. En el caso de la

cepa 25, obtuvo una densidad óptica (OD) de 1,80; para la cepa DRTS-49, se observó una OD de 2,19; para la cepa DRTS-78, una OD de 1,89; y para la cepa DRTS-50, una OD de 2,94. En base a las OD de las cuatro cepas se calcularon los volúmenes de cultivo necesarios para obtener concentración de $1,5 \times 10^8$ para el *mix* de bacterias, en el caso de la otra fase, la cepa 25 presentó una densidad óptica de 2,00 (OD); la cepa DRTS-49 mostro una OD de 1,74; la cepa DRTS-78, una OD de 1,53; y DRTS-50, una OD de 1,42. En este caso, también se realizó el cálculo para ajustar la concentración $1,5 \times 10^8$ para el *mix* de la infección.

Para el ensayo, se utilizaron langostinos juveniles que fueron aclimatados durante una semana. Se tomó una muestra de langostinos de cada acuario, los que fueron sacrificados para determinar la carga de *Vibrio* spp. en sus hepatopáncreas. La infección de los langostinos se realizó mediante inmersión, por 10 min, en agua en la que se aplicó el *mix* de cepas de *Vibrio* spp. a una concentración de 10^6 UFC/ml. Posteriormente, se distribuyeron en acuarios de 70 litros, colocándose 13 langostinos por acuario. Se tomó una muestra al azar de langostinos de cada acuario para realizar un análisis microbiológico, con la finalidad de asegurarse de que la infección tuvo éxito.

En cuanto a la preparación del tratamiento, se utilizó alimento balanceado que se suplementó con extractos vegetales. Se siguió la metodología basada en la preparación de soluciones etanólicas, utilizando concentraciones del 2,5, 5 y 10 g de extracto por kilogramo de alimento. Luego de ello, se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se le añadió aceite de pescado, a una dosis de 10 g/kg, con la finalidad de evitar enmascarar el olor de los extractos. Un día después de la infección, se procedió a medicar con los tratamientos propuestos. Este ensayo se llevó a cabo durante 15 días. Además, se registraron las tasas de supervivencia, el peso y la carga de *Vibrio* spp.

3.15. Identificación molecular de las cepas bacterianas

Las cepas del ensayo *in vitro* e *in vivo*, candidatas a probióticos, y los posibles *Vibrio* spp. ya puros se reactivaron en caldo TSB durante 24 h a una temperatura de 37 °C. Luego de ello, se extrajo el ADN utilizando el protocolo de extracción con fosfato buferado salino (PBS). A continuación, se realizó la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr, el cual fue enviado a secuenciar a una empresa en el exterior. Finalmente, una vez recibidas las secuencias, se procedió a depurarlas y establecer

secuencias de consenso entre las cadenas secuenciadas correspondientes a cada cepa bacteriana. Las secuencias de consenso se usaron para realizar búsquedas en las bases de datos de SILVA (<https://www.silva.de>) y GenBank (en este último caso se utilizó el software en línea Nucleotide Blast) para determinar la especie a la que perteneció cada cepa.

3.16. Plan de procesamiento y análisis de datos

Se prepararon tablas en las que se resumió las variables investigadas tales como peso y longitud de los langostinos; características fenotípicas e identificación molecular de las cepas de *Vibrio* spp. y BAL además de la resistencia antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp.

En el ensayo *in vitro*, se llevaron a cabo varios experimentos siguiendo un diseño completamente aleatorio (DCA). Se tuvieron 11 tratamientos, cada uno de ellos correspondió a una de las 11 cepas de BAL que se aplicaron como sobrenadante, que consistieron en cepas de este grupo presentes en el intestino de langostinos que mejor resultado tuvieron contra las cepas de *Vibrio* spp. también se seleccionaron seis cepas de *Vibrio* spp. para el desafío. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones consistentes cada una en una placa Petri con una cepa de *Vibrio* spp. El control positivo consistió en el antibiótico al que la respectiva cepa de *Vibrio* spp. fue más sensible en el ensayo *in vitro*, y el control negativo fue una solución de NaCl al 2,5%. La evaluación se basó en la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los pozos en el agar de las placas Petri.

En el caso de los extractos vegetales, se probaron cinco diluciones (desde 10^0 hasta 10^{-4}) para cada extracto. Estas diluciones se ensayaron contra las mismas ocho cepas de *Vibrio* spp. mencionadas anteriormente.

La evaluación estadística se llevó a cabo mediante análisis de varianza y prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 5%.

Para el ensayo de inhibición *in vivo*, se realizó un experimento bajo un diseño completamente aleatorio (DCA). En el caso de las BAL, se seleccionaron las cepas entre las que mayor inhibición contra *Vibrio* spp. mostraron en el ensayo *in vitro*. Estas cepas se ensayaron contra las cepas de *Vibrio* spp. que más inhibieron *in vitro*. Se tuvieron cuatro tratamientos, cada uno de ellos consistió en una cepa de BAL aplicada como cultivo o como sobrenadante. Se utilizaron 12 acuarios de 60 litros, el cual se ensayaron tres cepas BAL (LCL-4, LCL-23, y LCL-18) cada cepa

con tres repeticiones (tres acuarios) y control positivo con oxitetraciclina (OTC) con tres repeticiones (tres acuarios), en los que se colocaron juveniles de *L. vannamei* aparentemente sanos, y se aplicaron en el agua las cepas de *Vibrio* spp. mencionadas anteriormente. El control positivo consistió en el antibiótico de elección (oxitetraciclina), y el control negativo no incluyó ningún tipo de medicación. La evaluación se centró en la supervivencia de los langostinos y el conteo de *Vibrio* spp. en el intestino de los langostinos. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante análisis de varianza y prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 5%.

En el caso de los extractos vegetales, se seleccionaron las dosis que mostraron mayor inhibición contra *Vibrio* spp. *in vitro*. Estos extractos se probaron contra las cepas de *Vibrio* spp. que más inhibieron *in vitro*. Se tuvieron siete tratamientos, cada uno de ellos consistió en una concentración del extracto predefinida. Se tuvieron tres repeticiones consistentes en acuarios de 60 litros, en los que se colocaron juveniles de *L. vannamei* aparentemente sanos, y se aplicaron en el agua las cepas de *Vibrio* spp. mencionadas anteriormente. El control positivo consistió en el antibiótico de elección (oxitetraciclina), y el control negativo no incluyó ningún tipo de medicación. La evaluación se centró en la supervivencia de los langostinos y el conteo de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante análisis de varianza y prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 5%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características externas de *Litopenaeus vannamei*.

En la tabla 2 se muestran los 20 langostinos, tanto silvestres como de cultivo, recolectados en la zona de la desembocadura del río Tumbes y en la langostinera de Puerto Hualtaco (Ecuador). Los langostinos silvestres y de cultivo presentaron pesos y longitudes promedios estadísticamente similares ($p < 0,05$). Además, se observó que en ambos muestreos predominaron los machos, mientras que en el 15% de los ejemplares no se pudo determinar el sexo por su pequeño tamaño.

Tabla 2

Peso y longitud (Media \pm DE) de langostinos silvestres y de cultivo colectados en el manglar de Tumbes.

Zona	Tipo de muestra	Peso (g) (Media \pm DE)	Longitud (cm) (Media \pm DE)	Sexo (%)		
				Macho	Hembra	Indeterminado
La desembocadura del río Tumbes	Langostinos silvestres*	3,61 \pm 1,30 ^a	8,09 \pm 1,00 ^a	50	35	15
Langostinera Puerto Hualtaco	Langostinos de cultivo**	3,69 \pm 1,38 ^a	8,01 \pm 1,50 ^a	45	40	15

*Muestras de langostinos silvestres se emplearon para el aislamiento de *Vibrio* spp.

**Muestras de langostinos de cultivo se emplearon para el aislamiento de BAL.

Los langostinos silvestres y de cultivo presentaron tamaños adecuados para la extracción de tejidos (intestino y hepatopáncreas), lo que facilitó la toma de muestras para realizar la siembra microbiológica. Según Cesasin (2003), cuando los langostinos tienen un peso y una longitud mayores a las de las postlarvas, es más fácil extraer los tejidos.

4.2. Aislamiento de cepas bacterianas en medio de cultivo Hi Crome y MRS en langostinos silvestres y de cultivo.

En la tabla 3 se presenta el número de cepas aisladas de langostinos silvestres y de cultivo. Para los ejemplares colectados en la zona de la desembocadura del río Tumbes, se aislaron 27 cepas del hepatopáncreas de los langostinos silvestres en medio HiCrome Vibrio. Además, se aislaron 23 cepas en medio de cultivo MRS específicos para BAL, a partir de muestras de intestino de langostinos de cultivo extraídos de la langostinera Puerto Hualtaco (Ecuador).

Tabla 3

Cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres y de cultivo en medio de cultivo HiCrome Vibrio agar y MRS

Zona	Muestra	Cantidad	Medio de cultivo	Código de cepas
La desembocadura del río Tumbes	Langostinos silvestres	27	HiCrome Vibrio agar	DRTS-40 a DRTS-78
Langostinera Puerto Hualtaco (Ecuador)	Langostinos de cultivo	23	MRS	BL-1 a BL-16 PL-17 a PL-23

El aislamiento de *Vibrio* spp. se realizó utilizando el medio selectivo HiCrome Vibrio agar, diseñado específicamente para favorecer el crecimiento de este género. Canal et al. (2017) señalan que este medio contiene sustratos de beta-galactosidasa que no solo permiten el crecimiento, sino también la diferenciación de especies como *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y otras, a través de la coloración diferencial de sus colonias debido a la presencia de un sustrato cromogénico.

Por otro lado, se empleó el medio de cultivo MRS para el aislamiento de BAL, diseñado para el crecimiento de este género; asimismo, Chino De La Cruz et al. (2023) mencionan que este medio es específico para el crecimiento de bacterias con potencial probiótico como son las BAL, que incluyen géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*; además también pueden crecer cepas que no son ácido lácticas como *Bacillus*.

4.3. Caracterización de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres en medio de cultivo Hi crome Vibrio agar.

En la tabla 4, se muestra la caracterización de colonias, incluyendo la tinción de Gram en cepas bacterianas aisladas en medio de cultivo HiCrome Vibrio agar, las cuales presentaron coloraciones lila, crema, turquesa y azul, y que tuvieron tamaños entre 1,5 mm a 10 mm. Las colonias tuvieron formas circulares y puntiformes, con borde entero, consistencia cremosa, elevación convexa y superficie lisa; por otro lado, las células bacterianas de esas cepas se presentaron como coco bacilos Gram negativos.

Estas características en cuanto a la coloración son comunes al utilizar un medio específico como HiCrome Vibrio agar; pues existen investigaciones como las de Canal et al. (2017), quienes aislaron cepas de *Vibrio* spp. en mejillones (*Aulacomya atra*) que tuvieron coloraciones verdes azuladas, las cuales mencionaron que posiblemente se trataron de *V. parahaemolyticus*, también obtuvieron colonias de color purpura que se tratarían de las especies *V. vulnificus* y *V. cholerae*. Por último, obtuvieron colonias incoloras que se tratarían de *V. alginolyticus*; así mismo Pereira et al. (2007) confirmaron que *Vibrio parahaemolyticus* se presenta como colonias de color verde azulado y que *V. alginolyticus*, como colonias incoloras. El empleo de HiCrome Vibrio agar para identificación de cepas de *Vibrio* spp. es una estrategia adecuada pues este medio ha demostrado una mejor sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos tradicionales, como el cultivo en medio TCBS como lo precisan Yeung & Thorsen (2016).

Tabla 4

Caracterización de colonias aisladas del hepatopáncreas de langostinos silvestres en medio de cultivo HiCrome Vibrio

Código	Características de colonias**		
	Color	Tamaño (mm)	Forma
DRTS-40*	Lila	2,5	Circular
DRTS-41	Crema	4,0	Circular
DRTS-42	Crema	2,0	Circular
DRTS-43	Turquesa	1,5	Puntiforme
DRTS-44	Turquesa	4,0	Circular
DRTS-45	Turquesa	1,5	Puntiforme
DRTS-46	Lila	1,5	Circular
DRTS-47	Turquesa	3,0	Circular
DRTS-48	Crema	2,0	Circular
DRTS-49	Turquesa	6,0	Circular
DRTS-50	Turquesa	3,5	Circular
DRTS-51	Crema	1,5	Puntiforme
DRTS-52	Crema	1,5	Puntiforme
DRTS-63	Turquesa	4,0	Circular
DRTS-65	Turquesa	5,0	Circular
DRTS-66	Turquesa	6,5	Circular
DRTS-67	Turquesa	10,0	Circular
DRTS-68	Lila	2,0	Circular
DRTS-69	Lila	5,0	Circular
DRTS-70	Azul	3,5	Circular
DRTS-71	Turquesa	3,5	Circular
DRTS-72	Turquesa	7,0	Circular
DRTS-73	Azul	4,0	Circular
DRTS-74	Turquesa	5,0	Circular
DRTS-75	Turquesa	5,0	Circular
DRTS-76	Turquesa	3,0	Circular
DRTS-77	Azul	3,0	Circular
DRTS-78	Lila	2,0	Circular

* La codificación de cada cepa se estableció con textos que indicaron la zona de muestreo, procedencia del langostino y número correlativo de cepa aislada. Ej. DRTS-40 (DRT = Desembocadura del río Tumbes, S = langostino silvestre y 40 = cepa 40).

** Todas las cepas correspondieron a coco bacilos Gram negativos.

4.4. Caracterización de cepas bacterianas aisladas de langostinos de cultivo en medio MRS.

En la tabla 5 se muestran 23 colonias aisladas en el medio cultivo MRS, las cuales fueron identificadas de manera presuntiva como pertenecientes a las bacterias ácido lácticas. Estas colonias mostraron una morfología redonda y puntiforme, con una coloración crema y tamaños que oscilaron entre 0,5 y 4,0 mm. A nivel macroscópico, las colonias bordes enteros y una elevación convexa, rasgos fenotípicos clásicos asociados al crecimiento de bacterias ácido lácticas. Estas características coinciden con lo descrito en la literatura por autores como Quevedo (2020) y Sánchez et al. (2013), quienes indican que dichas morfologías son comunes en cepas de este grupo de bacterias.

La identificación presuntiva se sustentó no solo en las características morfológicas, sino también en el uso de un medio de cultivo específico como el agar MRS, formulado para estimular el crecimiento de bacterias ácido lácticas e inhibir a su vez el desarrollo de otros grupos bacterianos. En este sentido, Moreira & Mendez (2024) señalan la importancia de emplear medios selectivos como MRS para obtener aislamientos representativos de BAL, especialmente en muestras complejas como las provenientes de productos acuáticos o ambientes naturales asociados a crustáceos.

Desde el punto de vista microscópico y bioquímico, las cepas aisladas mostraron una morfología compatible con bacilos y cocos Gram positivos, excepto dos cepas que resultaron Gram negativas (LCL-5 y LCL-10), lo cual podría indicar la presencia de bacterias contaminando el medio o de géneros diferentes. Además, todas fueron catalasa negativas, una característica distintiva de las bacterias del género *Lactobacillus*, ya que este género carece de la enzima catalasa, incluso en condiciones aerobias, características que corresponden a *Lactobacillus* según Sánchez et al. (2013).

Tabla 5

Caracterización y tinción de Gram de cepas bacterianas aisladas en MRS a partir del intestino de langostinos de cultivo

Código	Características de colonias*		Tinción de Gram	
	Tamaño (mm)	Forma	Forma	Reacción
LCL-1	2,0	Circular	Coco	+
LCL-2	3,0	Circular	Bacilo	+
LCL-3	3,0	Circular	Coco	+
LCL-4	1,5	Circular	Coco	+
LCL-5	2,0	Circular	Bacilo	-
LCL-6	1,5	Circular	Bacilo	+
LCL-7	2,5	Circular	Bacilo	+
LCL-8	0,5	Puntiforme	Coco	+
LCL-9	2,0	Circular	Coco	+
LCL-10	2,5	Circular	Bacilo	-
LCL-11	1,5	Circular	Bacilo	+
LCL-12	1,5	Circular	Coco	+
LCL-13	2,5	Circular	Coco	+
LCL-14	3,0	Circular	Estreptococo	+
LCL-15	1,5	Circular	Coco	+
LCL-16	3,5	Circular	Bacilo	+
LCL-17	4,0	Circular	Coco	+
LCL-18	2,5	Circular	Coco	+
LCL-19	2,0	Circular	Bacilo	+
LCL-20	3,0	Circular	Bacilo	+
LCL-21	3,5	Circular	Coco bacilo	+
LCL-22	1,0	Puntiforme	Coco	+
LCL-23	0,5	Puntiforme	Coco	+

* Todas las colonias tuvieron coloración crema.

Existen reportes de cepas de *Lactobacillus* aisladas en trucha arcoíris, que formaron colonias pequeñas, con diámetros que oscilaron entre 2 mm a 5 mm, con elevación convexa, consistencia suave, márgenes enteros y coloraciones opacas. Además, presentaron forma de bacilos cortos Gram negativos (Quevedo, 2020), que son similares a las características de las cepas observadas en esta investigación.

4.5. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres y de cultivo.

En la tabla 6 se observa que las cepas cultivadas en el medio selectivo Hicrome Vibrio, correspondieron a *Vibrio alginolyticus* (DRTS-47, DRTS-50 y DRTS-78), a *Vibrio harveyi* (DRTS-49), a *Vibrio diabolicus* (DRTS-75), y a *Vibrio furnissi* (DRTS-40). Adicionalmente, se detectó que la cepa DRTS-46, correspondió a *Shewanella algae*, aunque el medio HiCrome Vibrio está diseñado para favorecer el crecimiento de bacterias del género *Vibrio*, el posterior aislamiento y purificación en agar TSA puede permitir el desarrollo de otros géneros bacterianos.

Por otro lado, las cepas aisladas en el medio de cultivo MRS fueron identificadas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, especies que pertenecen a la familia *Lactobacillaceae* y se consideran parte del grupo de bacterias ácido lácticas. La identificación se sustentó tanto en análisis moleculares como en características fenotípicas, incluyendo morfología de bacilos y cocos Gram positivos, reacción negativa a la catalasa y ausencia de formación de esporas. Estas características coinciden con lo reportado por Ruelas et al. (2024), quienes utilizaron MRS para el aislamiento de bacterias probióticas en heces e intestinos de *Litopenaeus vannamei*, confirmando también la presencia de *Enterococcus faecium* mediante análisis de secuenciación. Además, se detectó una cepa identificada como *Staphylococcus epidermidis*. Aunque el medio MRS es selectivo para el crecimiento de bacterias ácido lácticas y en especial del género *Lactobacillus*, su composición no impide completamente el crecimiento de otras bacterias, como *S. epidermidis*, especialmente cuando se presentan ciertas condiciones ambientales o de incubación que favorecen su desarrollo. En el estudio realizado por Abre et al. (2022), se evaluó el crecimiento bacteriano en el medio MRS a partir de muestras de *adjuevan*, un pescado fermentado de la Costa de Marfil. Aunque el medio MRS está formulado para el aislamiento de bacterias ácido lácticas, el análisis molecular de los aislamientos reveló la presencia de bacterias no lácticas, incluyendo como *Staphylococcus*. Este hallazgo demuestra que el medio MRS no es completamente selectivo y puede permitir el crecimiento de otros grupos bacterianos.

La identificación molecular de las cepas bacterianas realizadas mediante secuenciamiento del gen 16S (rRNA) bacteriano, obtuvo altos porcentajes de identidad, que oscilaron entre 99,86% y 100% en las bases de datos de Silva y GenBank. Estos resultados indican una identificación precisa a nivel de especie, lo

cual respalda la confiabilidad del análisis molecular como herramienta clave en la caracterización de la microbiota en organismos acuáticos.

Tabla 6

Identificación molecular de cepas aisladas de langostino silvestre (Litopenaeus vannamei)

Cepa	Tejido	Medio de cultivo	Especie	Identidad (%)	
				GenBank	Silva
DRTS-40	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Vibrio furnissi</i>	100,00	99,93
DRTS-46	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Shewanella algae</i>	100,00	99,93
DRTS-47	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,86	99,93
DRTS-49	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Vibrio harveyi</i>	99,86	99,86
DRTS-50	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
DRTS-75	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Vibrio diabolicus</i>	99,86	99,73
DRTS-78	Hepatopáncreas	Hi Crome	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100,00	100,00
LCL-1	Intestino	MRS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00	99,85
LCL-3	Intestino	MRS	<i>Enterococcus faecalis</i>	100,00	99,85
LCL-4	Intestino	MRS	<i>Enterococcus faecalis</i>	100,00	99,92
LCL-15	Intestino	MRS	<i>Enterococcus faecalis</i>	100,00	99,85
LCL-18	Intestino	MRS	<i>Enterococcus faecium</i>	100,00	99,85
LCL-21	Intestino	MRS	<i>Enterococcus faecalis</i>	99,86	99,85
LCL-23	Intestino	MRS	<i>Enterococcus faecalis</i>	100,00	100,00

4.6. Resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas de langostinos silvestres.

En la tabla 7 se presentan la resistencia antibiótica de las seis cepas aisladas en el medio HiCrome Vibrio que fueron identificadas como *Vibrio* spp. En tanto que en la tabla 8 se observa la resistencia de 19 cepas con características fenotípicas compatibles con el género *Vibrio*. La mayor parte de cepas fueron resistentes de uno a dos antibióticos; sin embargo, DRTS-50 fue la única cepa bacteriana que resistió a tres antibióticos de los 10 antibióticos ensayados (ampicilina, oxitetraciclina y estreptomycin); por lo que esta cepa fue la única multiresistente y tuvo un índice MAR de 0,3. Con respecto al índice MAR, varió entre 0,1 y 0,3, siendo bastante similares al MAR reportado por Tinoco et al. (2023), quienes registraron en promedio 0,2 en cepas de *Vibrio* spp. aisladas en Tumbes.

Tabla 7

Resistencia antibiótica de Vibrio spp. aislados e identificados de langostinos silvestres

Cepa	Penici- -linas	Fosfo- natos	Feni- coles	Tetra- ciclinas		Amino- glucósidos		Quinolonas			Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que resiste	Índice MAR	Multiresistencia
	Ampicilinas (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10 µg)	Ácido nalidixico (30 µg)	Norfloxacina (10 µg)	Enrofloxacin (5 µg)				
DRTS-40	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	2	2	0,2	No
DRTS-47	R	I	S	I	S	I	S	S	I	I	1	1	0,1	No
DRTS-49	R	R	S	I	I	I	S	I	S	I	2	2	0,2	No
DRTS-50	R	I	S	R	S	R	S	S	I	I	3	3	0,3	Si
DRTS-75	R	S	S	S	I	I	S	S	S	I	1	1	0,1	No
DRTS-78	R	R	S	I	I	I	S	S	S	I	2	2	0,2	No

El análisis de sensibilidad reveló que la mayoría de estas cepas presentaron resistencia a la ampicilina; también mostraron resistencia completa o intermedia a la estreptomina. Este hallazgo es similar a lo reportado por Potosí (2024) y Campaña (2024) quienes también encontraron que muchas cepas aisladas de langostinos en Tumbes, fueron resistentes a la ampicilina, y en el caso de los langostinos silvestres, resistencia a la estreptomina; este último hallazgo se justifica porque residuos de este antibiótico pueden llegar al manglar como producto del consumo de pobladores de Puerto Pizarro, que emplean este antibiótico en el tratamiento de la tuberculosis, una enfermedad presente en dicho poblado (Campaña, 2024; Domínguez & Gonzales, 2017; Morán & Hidalgo, 2018).

Tabla 8

Resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas en medio de cultivo Hicrome Vibrio en langostinos silvestres

Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles	Tetraciclinas		Aminoglucósidos		Quinolonas			Número de antibióticos a los que es resistente	Número de familias antibióticas a las que resiste	Índice MAR	Multiresistencia
	Ampicilinas (10µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30µg)	Tetraciclina (30µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10µg)	Ácido nalidixico (30µg)	Norfloxacin (10µg)	Enrofloxacin (5 µg)				
DRTS-41	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-42	I	R	S	I	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-44	R	S	S	S	S	I	S	S	S	I	1	1	0,1	No
DRTS-45	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-48	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	2	2	0,2	No
DRTS-51	I	R	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-52	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-63	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-65	R	I	S	S	S	I	S	S	S	I	1	1	0,1	No
DRTS-66	R	S	S	I	S	I	S	S	S	I	1	1	0,1	No
DRTS-67	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-68	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-70	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-71	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	2	2	0,2	No
DRTS-72	R	S	S	S	S	I	S	S	S	I	1	1	0,1	No
DRTS-73	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-74	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-76	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No
DRTS-77	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	1	1	0,1	No

4.7. Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas bacterianas aislados de langostinos silvestres.

En la tabla 9 se aprecia que el 100% de las cepas fue resistente a la ampicilina (100%), en orden de resistencia, también 33,3% de las cepas fueron resistentes a la fosfomicina y oxitetraciclina (33,3%) y por último a la estreptomina (16,7%). Sin embargo, existieron cepas de *Vibrio* spp. con resistencia intermedia a antibióticos, como enrofloxacin (83,3%), estreptomina (66,7%) y tetraciclina (50%). Finalmente, el 100% de las cepas fueron sensibles al cloranfenicol y norfloxacin. En la figura 2 se muestra el número de familias antibióticas a las que las cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes. La cepa DRTS-50 (*Vibrio alginolyticus*) fue la que resistió a mayor número de familias: penicilinas, tetraciclinas y aminoglucósidos siendo por tanto multiresistente; por otro lado, las cepas DRTS-49 (*Vibrio harveyi*),

DRTS-78 (*Vibrio alginolyticus*) y DRTS-40 (*Vibrio furnissi*) resistieron solo a dos familias. Finalmente, las cepas DRTS-47 y DRTS-75 resistieron a una sola familia (penicilinas).

Tabla 9

Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas de Vibrio spp. aislados de langostinos silvestres

Antibiótico	Resistente		Intermedia		Sensible	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	6	100,0	0	0,0	0	0,0
Fosfomicina	2	33,3	2	33,3	2	33,3
Cloranfenicol	0	0,0	0	0,0	6	100,0
Oxitetraciclina	2	33,3	3	50,0	1	16,7
Tetraciclina	0	0,0	3	50,0	3	50,0
Estreptomina	1	16,7	5	83,3	0	00,0
Gentamicina	0	0,0	0	00,0	6	100,0
Ácido nalidíxico	0	0,0	1	16,7	5	83,3
Norfloxacin	0	0,0	2	33,3	4	66,6
Enrofloxacin	0	0,0	5	83,3	1	16,7

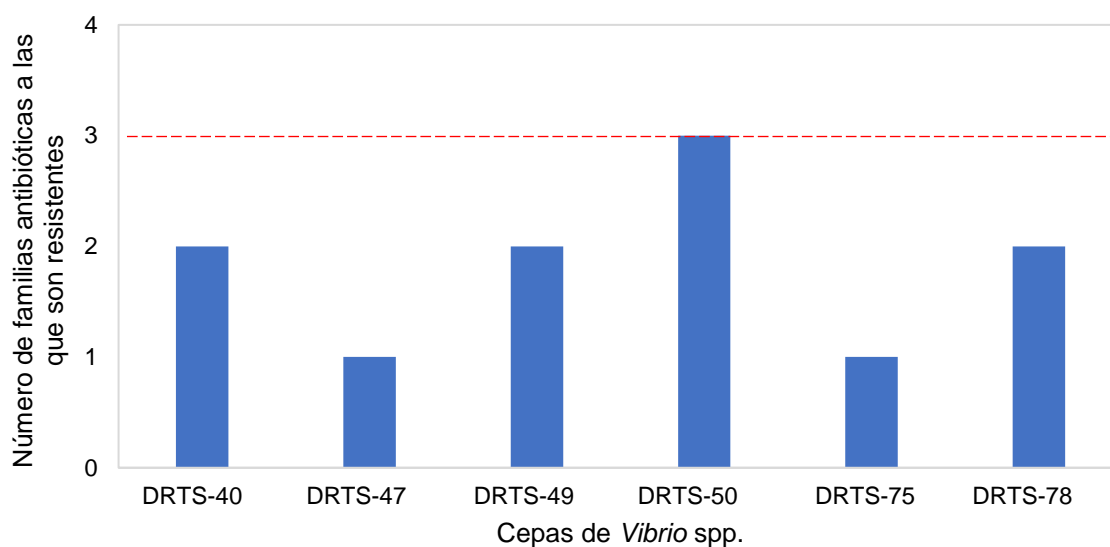
Como se ha observado, el 100% de cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes a la ampicilina, lo cual era previsible, ya que estas fueron aisladas de langostinos silvestres recolectados en canales de marea de Puerto Pizarro que reciben efluentes generados por la población de ese lugar (Morán & Hidalgo, 2018), que puede incluir residuos antibióticos usados en clínica humana. De manera similar, Calizaya et al. (2023) y Grande (2020) también reportaron niveles elevados de resistencia a la ampicilina en cepas de *Vibrio* spp. aislados en Tumbes.

Por otro lado, el 100% de cepas de *Vibrio* spp. fueron sensibles al cloranfenicol y a la gentamicina. Esta sensibilidad podría explicarse por la prohibición actual de utilizar ciertos antibióticos en la acuicultura de *Litopenaeus vannamei* (Carvalho et al., 2016), así mismo por las directrices del *Codex Alimentarius Commission* (2018), que establece límites permisibles de oxitetraciclina en langostinos para consumo humano. En este sentido, la Unión Europea ha fijado límites máximos de residuos (LMR) más estrictos para productos cárnicos, correspondientes a 100 µg/kg para oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina, según el informe EMEA/MRL/023/95.

Otra razón relevante es que, debido al declive de precios del langostino, muchas empresas acuícolas de Puerto Pizarro han abandonado esta actividad, lo que ha reducido la exposición del ecosistema del manglar a los efluentes ocasionados por empresas de cultivo de langostinos y por ende, a la entrada de bacterias resistentes a los antibióticos utilizados en dicha actividad (Sociedad Nacional de Acuicultura [SNA], 2024).

Figura 2

Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas de *Vibrio* spp. aislados de langostinos silvestres



Se observó que la cepa DRTS-50 (*Vibrio alginolyticus*) resistió a tres de las seis familias de antibióticos ensayados (penicilinas, tetraciclinas y aminoglucósidos). Este comportamiento es similar a lo reportado para especies de *Vibrio*; por ejemplo, Campaña (2024) aisló la cepa Lang 55 en langostinos silvestres, la cual resistió a tres familias (penicilinas, fosfonatos y quinolonas). Así mismo, Rosado (2018) se identificó cepas de *Vibrio alginolyticus* en *Litopenaeus vannamei* de langostineras de la región Tumbes, que fueron resistentes a la ampicilina (penicilinas), tetraciclina (tetraciclinas) y cloranfenicol (fenicoles).

Por otro lado, en la tabla 10 se observa que el 100% de las cepas de *Vibrio* spp. fueron sensibles al cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, ácido nalidíxico y norfloxacina, mientras que el 84,2% mostró sensibilidad a la oxitetraciclina. Estos resultados son consistentes con lo reportado por De Cock et al. (2023), quienes

encontraron que el nivel de residuos de oxitetraciclina y florfenicol en la porción comestible en cangrejos del manglar del Guayas fue baja, a pesar de que en esa zona operan numerosas empresas langostineras que emplean dichos antibióticos. Una posible explicación para estos niveles de sensibilidad es la reducción progresiva en el uso de antibióticos en los cultivos de langostinos en regiones como Tumbes, lo que habría contribuido a disminuir la presión selectiva sobre las bacterias y, en consecuencia, la prevalencia de cepas resistentes. Este hallazgo se explica por lo reportado por García-Pérez et al. (2021), quienes indican que el uso continuado de antibióticos en sistemas de cultivo favorece la selección de bacterias resistentes, en consecuencia si se disminuye el uso de antibióticos, las bacterias vuelven a ser sensibles.

Tabla 10

Porcentaje de resistencia antibiótica de cepas bacterianas aisladas en medio de cultivo Hicrome Vibrio en langostinos silvestres

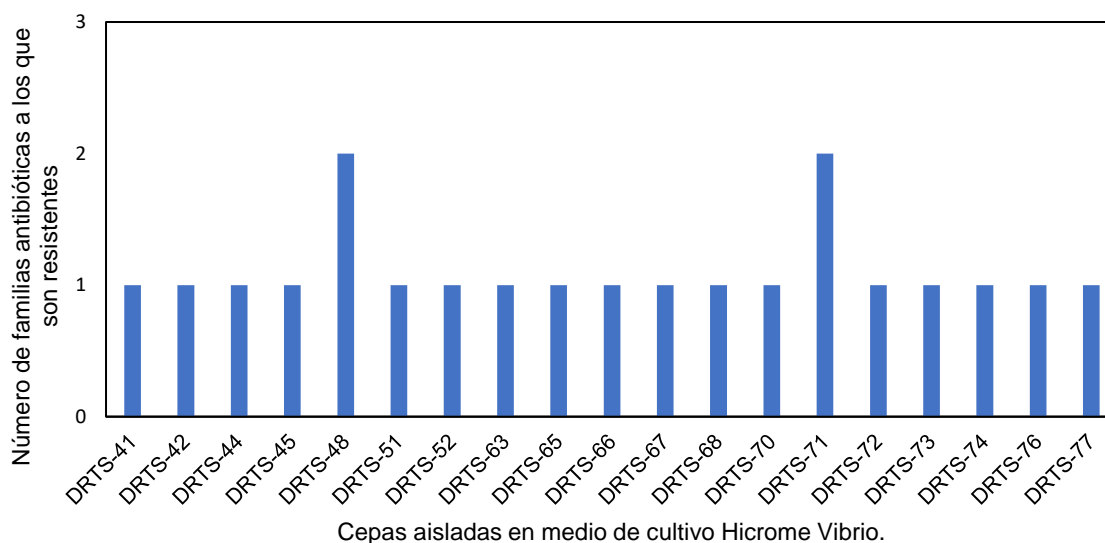
Antibiótico	Resistente		Intermedia		Sensible	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	14	73,7	2	10,5	3	15,8
Fosfomicina	5	26,3	1	5,3	13	68,4
Cloranfenicol	0	0,0	0	0,0	19	100,0
Oxitetraciclina	0	0,0	3	15,8	16	84,2
Tetraciclina	0	0,0	0	0,0	19	100,0
Estreptomina	2	10,5	16	84,2	1	5,3
Gentamicina	0	0,0	0	0,0	19	100,0
Ácido nalidíxico	0	0,0	0	0,0	19	100,0
Norfloxacin	0	0,0	0	0,0	19	100,0
Enrofloxacin	0	0,0	4	21,1	15	78,9

En la tabla 10 también se observa que las cepas presentaron mayor resistencia frente a la ampicilina, con un 73,7% de cepas resistentes. De manera similar, Calizaya et al. (2023) reportaron niveles elevados de resistencia a la ampicilina en estudios realizados con bacterias aisladas de organismos acuáticos, lo cual indica una tendencia común en ambientes donde existe una exposición recurrente o prolongada a este tipo de antibióticos. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de monitorear constantemente la sensibilidad antimicrobiana en especies cultivadas, ya que el uso inadecuado o excesivo de determinados antibióticos puede generar presión selectiva y favorecer la proliferación de cepas resistentes.

Finalmente, en la figura 3 se observa que las 19 cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes de una a dos familias de antibióticos; por lo tanto, ninguna de ellas se consideró multirresistentes.

Figura 3

Número de familias antibióticas a las que fueron resistentes las cepas aisladas en medio Hi crome *Vibrio* en langostinos silvestres



4.8. Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos vegetales frente a cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos silvestres.

En las tablas 11 y 12 se presentan los enfrentamientos *in vitro* de los extractos de neem y orégano frente a *Vibrio* spp.

Los resultados observados, en la tabla 11, indican que el extracto de neem inhibió a todas las cepas de *Vibrio* pero solo cuando se utilizó el extracto puro (100%), la cepa DRST-50 (*Vibrio alginolyticus*) fue la que presentó mayor halo de inhibición con un diámetro de 16,3±0,6 mm.

Tabla 11

Enfrentamiento in vitro de extractos vegetales diluidos en alcohol contra cepas de Vibrio spp.

Código	Disco antibiótico	Control positivo*	Extracto de neem al 100%	Dilución** 10 ⁻¹
DRTS-46	Enrofloxacina	30,0±5,0	14,7±0,6	8,3±0,6
DRTS-50	Cloranfenicol	30,0±0,0	16,3±0,6	10,7±0,6
DRTS-75	Cloranfenicol	28,7±2,3	11,7±0,6	0,0±0,0
DRTS-78	Ácido nalidíxico	22,0±3,5	14,3±0,6	0,0±0,0
DRTS-40	Fosfomicina	36,7±2,9	13,0±0,0	0,0±0,0
DRTS-47	Cloranfenicol	34,0±3,5	14,7±0,6	13,7±1,2
25	Cloranfenicol	30,0±0,0	10,7±1,2	0,0±0,0
DRTS-49	Cloranfenicol	34,0±1,7	15,3±0,6	10,0±0,0

* El control negativo consistente en solución salina no produjo halos de inhibición.

** Las diluciones 10⁻² y 10⁻³ no produjeron inhibición en las cepas de *Vibrio spp.*

Por otro lado, solo la dilución 10⁻¹ del extracto de neem tuvo cierta efectividad, inhibiendo a cuatro de las seis cepas de *Vibrio spp.* con halos de inhibición de 8,3±0,6 mm a 13,7±1,2 mm. Las diluciones 1:100 y 1:1000 del extracto de neem no tuvieron la capacidad de inhibir a *Vibrio spp.*, del mismo modo Banerjee et al. (2012) mencionaron que al utilizar extracto concentrado de neem (jugo de neem) se tuvo mayor inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* aislados en *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, cuando utilizaron el extracto acuoso de hoja de neem, que estuvo más diluido, no se pudo inhibir a *Vibrio spp.*

Tabla 12

Diámetro de los halos de inhibición producidos in vitro por el extracto de orégano diluido en alcohol contra Vibrio spp.

Código	Disco antibiótico	Control positivo	Extracto de orégano al 100%	Diluciones		
				10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
DRTS-46	Enrofloxacina	35,0±0,0	10,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
DRTS-50	Cloranfenicol	30,7±1,2	11,0±1,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
DRTS-75	Cloranfenicol	32,0±0,0	14,7±1,2	13,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0
DRTS-78	Ácido nalidíxico	30,0±0,0	12,0±0,0	10,3±0,6	10,0±0,0	9,0±0,0
DRTS-40	Fosfomicina	42,7±0,6	15,3±0,6	13,7±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0
DRTS-47	Cloranfenicol	31,3±1,2	10,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
25	Cloranfenicol	28,0±0,0	13,3±0,6	11,3±2,3	9,0±1,7	0,0±0,0
DRTS-49	Cloranfenicol	33,0±1,7	8,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

* El control negativo consistente en solución salina no produjo halos de inhibición. En los enfrentamientos empleando extracto de orégano se pudo apreciar que la mayoría de las cepas de *Vibrio* spp. fueron inhibidas al utilizar el extracto puro (100%) generando halos con diámetros entre $8,0\pm 0,0$ mm y $15,3\pm 0,6$ mm. Conforme se diluye el extracto, se pierde su poder inhibidor, pero no tanto como el caso del extracto de neem. El extracto pudo inhibir incluso a una cepa de *Vibrio alginolyticus* (DRTS-78) a una dilución tan baja como 1:1000 generando un halo con diámetro de $9,0\pm 0,0$ mm. Este mayor poder del extracto de orégano ha sido confirmado por Aguirre et al. (2021) quienes mencionaron que el extracto de orégano procesados en soxhlet y concentrado con rotaevaporador, al ser utilizado sin diluir logró la inhibición de cuatro cepas de *Vibrio* spp. entre las que se hallaban multirresistentes y resistentes a antibióticos. Estos mismos autores reportaron que el extracto de orégano produjo halos con diámetros entre 8,4 mm y 14,0 mm. Por otro lado, Morales-Covarrubias et al. (2016) probaron infusiones de hoja de orégano en *Vibrio* spp. logrando su inhibición, mostrando una tendencia similar en la que las concentraciones más altas del extracto produjeron también mayores halos de inhibición.

En la tabla 13 se puede apreciar que la mayoría de cepas ácido lácticas tuvieron la capacidad de inhibir a las cepas de *Vibrio* spp., con halos hasta de 20,3 mm (cepa ácido láctica LCL-5 contra cepa de *Vibrio* spp. DRTS-78); sin embargo, la cepa ácido láctica LCL-8 no logró inhibir a tres cepas de *Vibrio* (DRTS-78, DRTS-49 y DRTS-50), así mismo la cepa ácido láctica LCL-17 no pudo inhibir el crecimiento de la cepa de *Vibrio* DRTS-49.

Tabla 13

Diámetros de los halos de inhibición (mm) producidos por bacterias ácido lácticas en cepas de Vibrio spp. in vitro

Cepa de <i>Vibrio</i> spp.	Disco de antibiótico	Control positivo*	Cepas de bacterias ácido lácticas										
			LCL-1	LCL-4	LCL-5	LCL-6	LCL-8	LCL-13	LCL-15	LCL-17	LCL-18	LCL-21	LCL-23
DRTS-40	Fosformicina	38,0	15,3	17,3	15,7	10,3	6,7	11,0	16,0	11,0	15,3	17,3	16,7
DRTS-46	Enrofloxacina	36,3	15,7	16,0	16,0	10,7	0,0	0,0	13,3	7,3	9,7	10,3	13,7
DRTS-47	Cloranfenicol	29,7	13,3	15,7	16,3	9,3	6,7	8,3	15,3	9,0	16,3	14,7	14,3
DRTS-49	Cloranfenicol	30,3	16,7	16,7	16,0	6,0	0,0	8,3	17,0	0,0	15,7	16,7	14,3
DRTS-50	Cloranfenicol	29,7	15,3	17,3	16,7	8,7	0,0	7,7	16,3	7,0	18,7	15,3	13,7
DRTS-75	Ácido nalidíxico	26,7	10,3	16,3	13,7	10,0	0,0	10,3	13,7	9,7	18,0	15,0	14,0
DRTS-78	Ácido nalidíxico	27,0	13,7	18,7	20,3	6,7	0,0	0,0	18,7	8,3	16,7	16,3	14,0
25	Cloranfenicol	29,7	15,0	17,0	17,3	7,0	0,0	6,7	15,3	9,3	16,7	16,0	15,3

* El control negativo consistente en solución salina no produjo halos de inhibición.

Como se ha observado en estos ensayos *in vitro* las cepas de bacterias ácido lácticas tienen un gran potencial en la inhibición de *Vibrio* spp.; de igual manera en varias investigaciones se han reportados resultados exitosos de este grupo de bacterias contra *Vibrio* spp. como es el caso de las investigaciones de Delgado-Díaz et al. (2022), Balcázar & Rojas-Luna (2007) y Torres (2025) en las cuales las cepas de BAL fueron efectivas en inhibir a *Vibrio* spp., produciendo halos de inhibición similares a los de esta investigación.

4.9. Carga de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de langostinos infectados experimentalmente y tratados con extractos de neem y orégano.

En las tablas 14 y 15 se observa que al inicio del experimento (día 1), todos los tratamientos en los que se empleó neem y orégano mostraron una carga elevada de *Vibrio* spp. El tratamiento con neem en concentración de 5 g/kg de alimento registró una carga más alta ($1,12 \times 10^8$ UFC/g), superando a los demás tratamientos evaluados. Conforme avanzó el experimento y se administraron los extractos a través del alimento, se observó una disminución progresiva de la carga bacteriana. Particularmente, el grupo tratado con neem en concentración de 10 g/kg presentó una reducción significativa de *Vibrio* spp. en la fase intermedia (día 9). En la fase final (día 18), los tratamientos con neem en dosis de 2,5 g/kg y 5 g/kg, así como con orégano en dosis de 5 g/kg y 10 g/kg, mostraron una inhibición completa de la carga bacteriana, con conteos de 0 UFC/g.

Tabla 14

Carga de Vibrio spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos tratados con extracto de neem durante el ensayo in vivo

Día	Testigo (Oxitetraciclina)	Neem (g/kg de alimento)		
		2,5	5,0	10,0
1	$9,48 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^8$	$2,10 \times 10^7 \pm 3,38 \times 10^7$	$1,12 \times 10^8 \pm 4,31 \times 10^7$	$2,20 \times 10^7 \pm 3,72 \times 10^7$
3	$1,55 \times 10^8 \pm 1,30 \times 10^8$	$2,01 \times 10^8 \pm 9,01 \times 10^7$	$1,89 \times 10^8 \pm 5,23 \times 10^7$	$2,38 \times 10^8 \pm 7,10 \times 10^7$
9	$2,42 \times 10^7 \pm 4,19 \times 10^7$	$2,92 \times 10^7 \pm 4,84 \times 10^7$	$3,67 \times 10^7 \pm 4,73 \times 10^7$	$8,33 \times 10^5 \pm 5,77 \times 10^5$
18	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$3,33 \times 10^5 \pm 2,89 \times 10^5$

Tabla 15

Carga de Vibrio spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos tratados con extracto de orégano durante el ensayo in vivo

Día	Testigo (Oxitetraciclina)	Orégano (g/kg de alimento)		
		2,5	5,0	10,0
1	$9,48 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^8$	$5,17 \times 10^7 \pm 4,75 \times 10^7$	$5,48 \times 10^7 \pm 6,32 \times 10^7$	$7,18 \times 10^7 \pm 1,90 \times 10^7$
3	$1,55 \times 10^8 \pm 1,30 \times 10^8$	$2,39 \times 10^8 \pm 1,41 \times 10^8$	$2,28 \times 10^8 \pm 9,43 \times 10^7$	$2,56 \times 10^8 \pm 7,20 \times 10^7$
9	$2,42 \times 10^7 \pm 4,19 \times 10^7$	$5,93 \times 10^7 \pm 5,01 \times 10^7$	$9,35 \times 10^7 \pm 9,04 \times 10^7$	$5,97 \times 10^7 \pm 9,99 \times 10^7$
18	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$2,83 \times 10^6 \pm 4,91 \times 10^6$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0 \pm 0,00 \times 10^0$

En las tablas 14 y 15 se observa que la infección fue exitosa puesto que la carga de *Vibrio* spp. se incrementó entre el día 1 (momento en que se inició el experimento) y el día 3 (dos días después de haber realizado la infección experimental). También se observa una reducción de la carga de *Vibrio* spp. a partir del momento en que se comenzó a aplicar el alimento con los extractos vegetales (día 3 en adelante). En el tratamiento en el que se empleó oxitetraciclina, la carga de *Vibrio* spp. empezó con $9,48 \times 10^7$ UFC/g y disminuyó hasta 0 UFC/g en el día 18 (al final del experimento), lo que demostró que las cepas eran sensibles a este antibiótico. En cuanto a los tratamientos con extracto de neem también mostraron una disminución gradual de la carga bacteriana, siendo al principio la dosis de 10 g/kg la más efectiva, pero al final del experimento en el día 18, fue el único tratamiento que no logró eliminar por completo a *Vibrio* spp.

En cambio, las dosis de 2,5 y 5,0 g/kg lograron igualar el efecto de la oxitetraciclina al final del experimento, habiendo conseguido eliminar todos los vibrios del hepatopáncreas. Investigaciones como la de Prashant & Shubham (2025) demostraron que los extractos de neem poseen compuestos antibacterianos como nimbidina y azadiractina, que interfieren con la integridad de la pared celular bacteriana, lo que explicaría su eficacia contra *Vibrio* spp., asimismo, al utilizar cantidades elevadas de vegetales en la elaboración de alimento balanceado, proporcionan baja atractibilidad y palatabilidad por los langostinos (Nunes et al., 2006).

De manera similar, el tratamiento con orégano presentó una reducción progresiva de la carga bacteriana, con mayor efectividad a concentraciones más altas, alcanzando $0,00 \times 10^0$ UFC/g al día 18. Estudios previos han respaldado el uso de extractos vegetales como alternativas naturales a los antibióticos en acuicultura, como es el caso de Hernández-Rodríguez et al. (2021) y Gracia-Valenzuela et al. (2014), quienes reportaron que el orégano, gracias a sus compuestos fenólicos como el carvacrol y timol, tiene una acción antibacteriana potente contra bacterias patógenas en organismos acuáticos (Rashidian et al., 2021).

4.10. Supervivencia de langostinos infectados con cepas de *Vibrio* spp. y tratados con extractos vegetales neem y orégano.

En las figuras 4 y 5 se observa que la supervivencia de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. fue del 100% en todos los tratamientos, incluso al final del experimento. Las únicas muertes fueron ocasionadas por el sacrificio de langostinos para determinar sus cargas de *Vibrio* en el hepatopáncreas. La supervivencia alta de los langostinos (100%) se ha observado también en investigaciones como la de Fierro et al. (2019), quienes observaron altas supervivencias entre 96,7% y 100% en ensayos experimentales en *Litopenaeus vannamei* utilizando extractos vegetales como alternativas terapéuticas.

Una posible razón para este resultado es que de acuerdo a la metodología empleada para esta investigación, el único criterio utilizado para seleccionar las cepas de *Vibrio* fue que estas fueran resistentes o multirresistentes a los antibióticos, como así ocurrió en las cepas seleccionadas, además se tuvo en cuenta que las cepas empleadas (25, DRST-50, DRTS-49 y DRTS-78) correspondieran a especies reconocidas como patógenas tales como *Vibrio*

parahaemolyticus, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio harveyi* según indican Chang et al. (2023).

Sin embargo, es probable que estas cepas no hayan sido muy virulentas lo que permitió la supervivencia al 100% en todos los tratamientos, aspecto que también ha sido reportado por Aguilar-Rendón et al. (2020).

Figura 4

Supervivencia de langostinos aplicando extracto de neem en el ensayo in vivo sin considerar los sacrificios del experimento

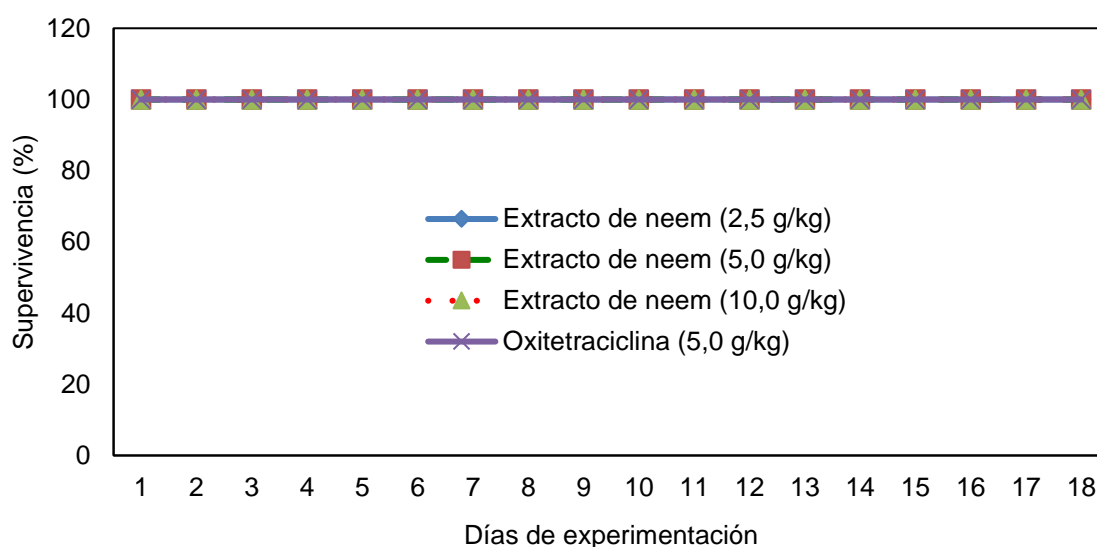
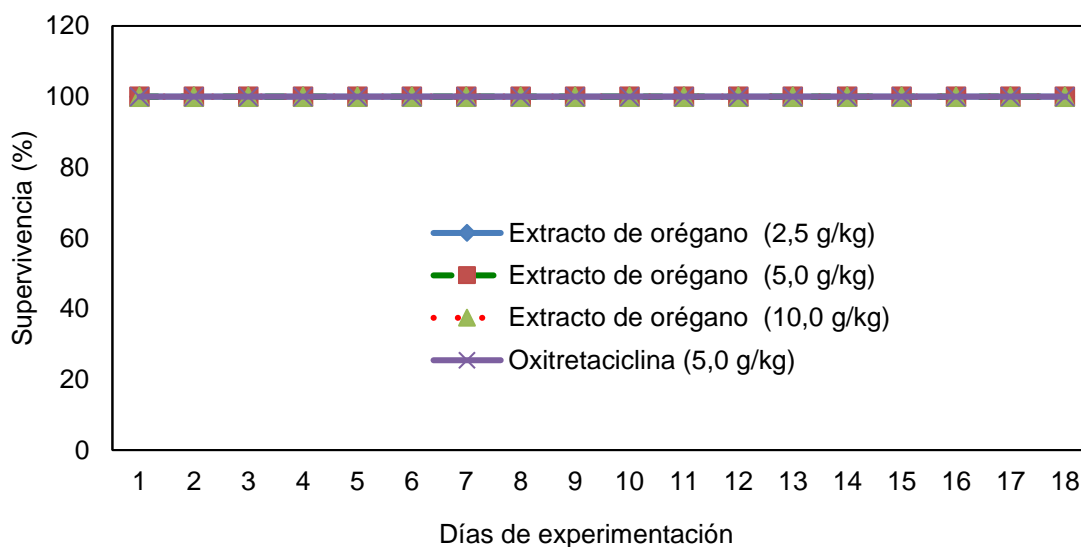


Figura 5

Supervivencia de langostinos aplicando extracto de orégano en el ensayo in vivo sin considerar los sacrificios del experimento



La supervivencia de los langostinos en el experimento en el que se empleó extracto de orégano en el alimento, tuvo igual resultado que el observado para el extracto de neem, la supervivencia fue del 100% en todos los tratamientos al final del experimento. Nuevamente, la mortalidad observada se debió al sacrificio de langostinos realizado durante el experimento para determinar la carga de *Vibrio* spp. en sus hepatopáncreas. Supervivencias elevadas y cercanas incluso al 100% se han observado en otras investigaciones como las de Fierro et al. (2019) quienes realizaron ensayos experimentales con *Penaeus vannamei*.

De igual manera, es posible argumentar que las cepas de *Vibrio* spp. empleadas en el ensayo hayan sido poco virulentas, sin embargo las mismas fueron seleccionadas de acuerdo a la metodología propuesta para esta tesis, que consistió en seleccionar las cepas de *Vibrio* que fueran resistentes o multirresistentes a los antibióticos como así ocurrió en las cepas seleccionadas, además se tuvo en consideración que las cepas seleccionadas correspondieran a especies reconocidas como patógenas para el langostino como son *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio harveyi*, lo que cumplieron las cepas seleccionadas: 25, DRST-50, DRTS-49 y DRTS-78, La supervivencia observada del 100% es similar a la reportada por Aguilar-Rendón et al. (2020) quienes mencionan que si las cepas no son muy virulentas se podrían tener supervivencias del 100%.

4.11. Conteos de *Vibrio* spp. en langostinos infectados y tratados con cepas de BAL.

En la tabla 16 se observa la carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de langostinos infectados y tratados con cepas de BAL. Al iniciar el ensayo *in vivo*, los langostinos presentaron baja carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas. Sin embargo, después de la infección se presencié un ligero incremento de la carga. Finalmente, al terminar el experimento en el día 18 se observó una disminución de *Vibrio* spp. debido al tratamiento con cepas de BAL. Estas cepas ácido lácticas presentaron poder inhibidor contra *Vibrio* spp., similar al que tuvo la oxitetraciclina.

Tabla 16

Carga de Vibrio spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos tratados con bacterias ácido lácticas durante el ensayo in vivo

Día	Testigo (Oxitetraciclina)	Cepas de BAL		
		LCL-4	LCL-23	LCL-18
1	2,60x10 ¹ ±4,42x10 ¹	1,16x10 ² ±1,39x10 ²	6,50x10 ¹ ±9,97x10 ¹	2,23x10 ² ±2,52x10 ¹
4	1,12x10 ³ ±4,77x10 ²	5,07x10 ² ±1,14x10 ²	8,43x10 ² ±8,03x10 ¹	1,10x10 ³ ±2,37x10 ²
18	0,00x10 ⁰ ±0,00x10 ⁰	3,03x10 ¹ ±5,17x10 ¹	3,33x10 ¹ ±5,77x10 ¹	6,67x10 ¹ ±1,15x10 ⁰

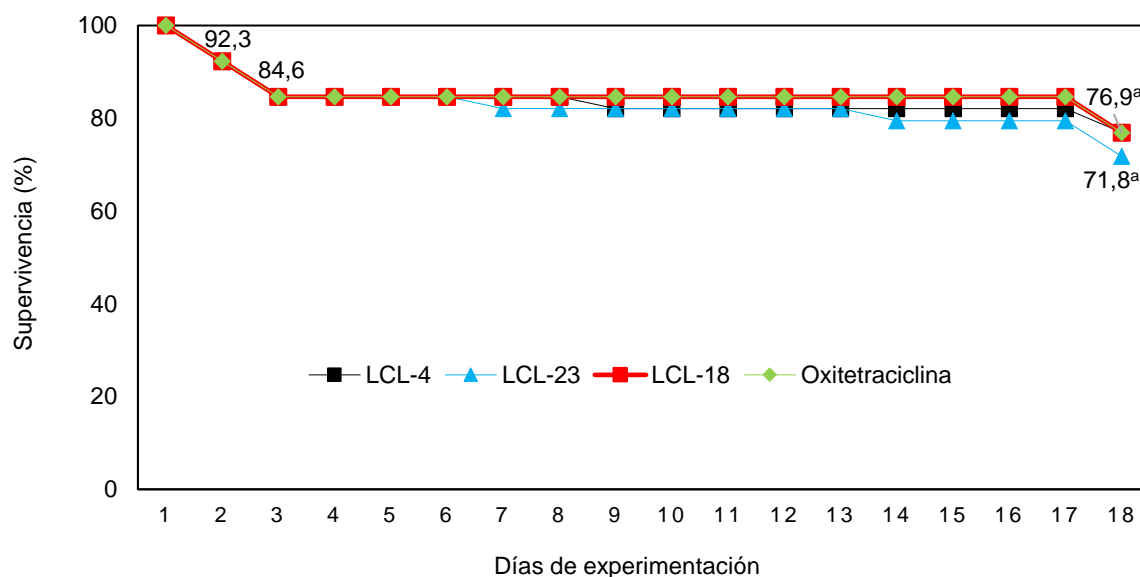
Diversos estudios como los de Kabiraj et al. (2020) demostraron que las cepas de BAL tienen efecto antagónico contra *Vibrio spp.*, lo que conduce a la reducción significativa de la carga de *Vibrio spp.* en langostinos. Esto explicaría el efecto inhibidor de *Vibrio spp.* observado en esta investigación.

4.12. Supervivencia de langostinos infectados con cepas de *Vibrio spp.* y tratados con cepas de BAL.

En la figura 6, se muestra la supervivencia durante el periodo de 18 días, considerando los sacrificios de los langostinos periódicamente para determinar la carga bacteriana de *Vibrio spp.*, todos los tratamientos iniciaron con una supervivencia del 100%, en el tercer día del ensayo *in vivo* se registró el 84,6% de supervivencia para todos los tratamientos experimentales; esto se debió a los sacrificios. Al finalizar el experimento, los tratamientos LCL-4, LCL-18 y oxitetraciclina mantuvieron una tasa de supervivencia aparentemente más alta (76,9%) que la de la cepa LCL-23 (71,8%), sin embargo, al ser analizada estadísticamente se evidenció que no existió diferencia significativa entre todos los tratamientos ($p>0,05$).

Figura 6

Supervivencia de los langostinos considerando el sacrificio intencional de langostinos.



Como se ha observado, la supervivencia de los langostinos con las cepas de *Vibrio* spp. no hubo diferencia entre los que recibieron el tratamiento con oxitetraciclina, comparado con los que recibieron cepas de BAL. Esto evidencia la eficacia de tales cepas para controlar enfermedades producidas por vibrios. Por ejemplo Kabiraj et al. (2020) demostraron que la BAL *Lactobacillus* spp. tuvo efectos antagónicos demostrados contra *Vibrio* spp., lo que redujo significativamente el conteo de bacterias tanto en branquias y los intestinos de los langostinos. Por otro lado, Mustafa et al. (2019) y Sahandi et al. (2019), sugieren que los probióticos, en este caso las cepas de BAL, pueden ser una alternativa sostenible a los usos de antibióticos, ya que reducen la concentración de *Vibrio* spp. y mejoran la tasa de supervivencia de los langostinos.

V. CONCLUSIONES

- 1) Las seis cepas de *Vibrio* spp. seleccionadas para los ensayos fueron resistentes a al menos un antibiótico, y una de ellas resistió a tres antibióticos considerándose multirresistente. El 100% fueron resistentes a la ampicilina y sensibles al cloranfenicol. El 16,7% fueron sensibles a la oxitetraciclina.
- 2) En el ensayo *in vitro* de extractos vegetales, se evidenció los mejores resultados con el extracto de orégano, que inhibió a todas las cepas de *Vibrio* spp. e incluso fue capaz de inhibir a una de ellas en una dilución 10^{-3} . El extracto de neem inhibió a todas las cepas pero solo cuando fue aplicado sin diluir.
- 3) Casi todas las cepas de BAL pudieron inhibir a las seis cepas de *Vibrio* spp. en el ensayo *in vitro*. Las cepas LCL-4, LCL-18 y LCL-23 se encontraron entre las que mayores diámetros de halos de inhibición produjeron en *Vibrio* y se emplearon por ello en el ensayo *in vivo*.
- 4) En el ensayo *in vivo* utilizando el extracto de neem se observó que con casi todas las dosis aplicadas en el alimento (2,5, 5 y 10 g/kg) se redujo la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas hasta 0 UFC/g al final del experimento, con la excepción de la dosis de 10 g/kg de neem. Las supervivencias de los langostinos durante el experimento fueron del 100%.
- 5) En el ensayo *in vivo* utilizando el extracto de orégano se observó que en casi todas las dosis aplicadas en el alimento (2,5, 5 y 10 g/kg) se redujo la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas hasta 0 UFC/g al final del experimento, con la excepción de la dosis de 2,5 g/kg de orégano. Las supervivencias de los langostinos durante el experimento fueron del 100%.
- 6) En el ensayo *in vivo* utilizando cepas de BAL se observó que todas las cepas aplicadas en el alimento redujeron la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas al final del experimento. Las supervivencias de los langostinos durante el experimento fueron del 100%.
- 7) Los extractos de neem, orégano y las cepas de BAL mostraron, poder inhibitorio contra las cepas de *Vibrio* spp. *in vitro* como *in vivo*, igualando en poder inhibitorio a la oxitetraciclina.

VI. RECOMENDACIONES

- 1) Evaluar la virulencia de las cepas de *Vibrio* spp. utilizadas en el ensayo in vivo a fin de determinar si las supervivencias elevadas observadas (100%) se debieron a que las cepas fueron no nocivas.
- 2) Realizar nuevos ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando cepas de *Vibrio* spp. confirmadas como virulentas (evaluando sus genes de patogenicidad o realizando bioensayo de virulencia) para el langostino, a fin de demostrar si las cepas de BAL son capaces de inhibir a cepas de *Vibrio* spp. confirmadas como patógenas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abre, M. G., Kedjebo, D. K. B., Attchelouwa, C. K., Ehouman, G. O., Kouakou-Kouame, C. A., & N'guessan, F. K. (2022). Molecular identification of non-lactic acid bacteria isolated on MRS medium and associated to the production of biogenic amines in adjuevan, a fermented fish of Côte d'Ivoire. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 15(1), 626-634. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.15.1.0666>
- Aguilar-Rendón, K., Lozano-Olvera, R., Yáñez-Rivera, B., & Soto-Rodríguez, S. (2020). Bacteriological and histopathological analysis of *Penaeus vannamei* experimentally infected with *Vibrio parahaemolyticus*-AHPND strains. *Diseases of Aquatic Organisms*, 140, 167-177. <https://doi.org/10.3354/dao03503>
- 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), Article 4. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Al Akeel, R., Mateen, A., Janardhan, K., & Gupta, V. C. (2015). Analysis of antibacterial and anti oxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.08.006>

- Aranguren, L. F., Mai, H. N., Noble, B., & Dhar, A. K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in Latin America. *Journal of Invertebrate Pathology*, *174*, 107424. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>
- Arnaud, M., Krause, S., Norby, R. J., Dang, T. H., Acil, N., Kettridge, N., Gauci, V., & Ullah, S. (2023). Global mangrove root production, its controls and roles in the blue carbon budget of mangroves. *Global Change Biology*, *29*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1111/gcb.16701>
- Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, *55*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9000-0>
- Banerjee, S., Mei Kim, L., Shariff, M., Khatoon, H., & Md. Yusoff, F. (2013). Antibacterial Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Leaves on *Vibrio* spp. Isolated from Cultured Shrimp. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3923/ajava.2013.355.361>
- Banerjee, S., Ooi, M. C., Shariff, M., & Khatoon, H. (2012). Antibiotic Resistant *Salmonella* and *Vibrio* Associated with Farmed *Litopenaeus vannamei*. *The Scientific World Journal*, *2012*, 1-6. <https://doi.org/10.1100/2012/130136>
- Bondad-Reantaso, M. G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Le Groumellec, M., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall'Occo, A., Urbani, R., & Caputo, A. (2023). Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *15*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/raq.12786>

- 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>
- Campaña, W. P. (2024). *Residuos de tetraciclinas y genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias aisladas de *Ucides occidentalis* y *Litopenaeus vannamei* en Tumbes, 2022-2023* [Tesis para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con mención en Gestión Ambiental, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/65448/TESIS%20-%20CAMPAÑA%20MAZA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Campoverde, M. I. (2015). *Evaluación del efecto de dos plantas medicinales, sobre la presencia de *Vibrio* sp. En agua de piscina camaronera* [Tesis de Acuicultor, Universidad Técnica de Machala, Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3040/1/CD00019_TRABAJODETITULACION.pdf
- Canal, B., Cruz, S., Valle-Riestra, V., Ramos, J. C., & Agurto, T. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias del género VIBRIO en muestras de AULACOMYA ATRA “choro” procedentes del terminal pesquero de Villa María del Triunfo, Lima, Perú. *Biotempo*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v14i1.833>
- Carvalho, M. C. N., Jayme, M. M., Arenazio, G. S., Araújo, F. V., Leite, S. G. F., & Del Aguila, E. M. (2016). Microbiological Quality Assessment by PCR and Its Antibiotic Susceptibility in Mangrove Crabs (*Ucides cordatus*) from

- Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/7825031>
- Cesasin. (2003). *Técnicas de Bacteriología, Técnicas de Bacteriología, Análisis en Fresco, Calidad Análisis en Fresco, Calidad de Agua y Buenas Prácticas de Agua y Buenas Prácticas de Manejo y Bioseguridad de Manejo y Bioseguridad en Granjas Camaroneras*. Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa, A.C. http://academia.edu/28519092/Manual_Capacitacion
- 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>
- Chino De La Cruz, C. M., Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Rodríguez-Alegría, M. E., Ochoa-Leyva, A., & López Munguía, A. (2023). Complete genome sequence and characterization of a novel *Enterococcus faecium* with probiotic potential isolated from the gut of *Litopenaeus vannamei*. *Microbial Genomics*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000938>
- Chow, L. K. M., Ghaly, T. M., & Gillings, M. R. (2021). A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030>
- Codex Alimentarius Commission. (2018). *Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CX/MRL 2-2018. FAO-WHO*. <https://www.fao.org/fao-whocodexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao>

.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMR
L2e.pdf

De Cock, A., Forio, M. A. E., Croubels, S., Dominguez-Granda, L., Jacxsens, L., Lachat, C., Roa-López, H., Ruales, J., Scheyvaerts, V., Solis Hidalgo, M. C., Spanoghe, P., Tack, F. M. G., & Goethals, P. L. M. (2023). Health risk-benefit assessment of the commercial red mangrove crab: Implications for a cultural delicacy. *Science of The Total Environment*, 862, 160737. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160737>

Delgado-Díaz, L. M., Paz-Quevedo, N. E., Molina-Velásquez, N. E., & Navarrete-Soriano, A. (2022). Incorporación de bacterias ácido lácticas nativas como probióticos en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) en la camaronera Las Ánimas, El Salvador. *Revista Minerva*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.5377/revminerva.v3i1.12473>

Deng, H., He, J., Feng, D., Zhao, Y., Sun, W., Yu, H., & Ge, C. (2021). Microplastics pollution in mangrove ecosystems: A critical review of current knowledge and future directions. *Science of The Total Environment*, 753, 142041. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142041>

Domínguez, E., & Gonzales, L. R. (2017). *Conocimiento sobre tuberculosis pulmonar y actitud hacia el tratamiento de los pacientes que asisten al centro de salud Gerardo Gonzales Villegas—Tumbes, 2016* [Tesis de Licenciada en Enfermería, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/48/TESIS%20-20DOMIN%20GONZALES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fierro Coronado, J., Luna Gonzalez, A., Caceres Martinez, C., Ruiz Verdugo, C., Escamilla Montes, R., Diarte Plata, G., Flores Miranda, M., Alvarez Ruiz, P.,

- & Peraza Gomez, V. (2019). Effect of medicinal plants on the survival of white shrimp (*Penaeus vannamei*) challenged with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(2), 377-381. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-20>
- Flegel, T. W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/jwas.12589>
- 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>
- Ghosh, V., Sugumar, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2016). Neem (*Azadirachta indica*) Oils. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 593-599). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00067-5>
- Gracia-Valenzuela, M. H., Vergara-Jiménez, M. J., Baez-Flores, M. E., & Cabrera-Chavez, F. (2014). Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), Article 4. <https://doi.org/10.2298/ABS1404367G>
- 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?sequence=3&isAllowed=y

- Guo, H., Xue, S., Nasir, M., Gu, J., & Lv, J. (2021). Impacts of cadmium addition on the alteration of microbial community and transport of antibiotic resistance genes in oxytetracycline contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.015>
- Hernández-Rodríguez, A., Pérez, A. V., & Méndez, M. A. (2021). *Effect of oregano (Origanum vulgare) extract on pathogenic bacteria in shrimp farming*. 19, 100567. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100567>
- Herrera-Calderon, O., Ejaz, K., Wajid, M., Shehzad, M., Tinco-Jayo, J. A., Enciso-Roca, E., Franco-Quino, C., Yuli-Posadas, R. A., & Chumpitaz-Cerrate, V. (2019). Azadirachta indica: Antibacterial Activity of Neem Against Different Strains of Bacteria and their Active Constituents as Preventive in Various Diseases. *Pharmacognosy Journal*, 11(6s), Article 6s. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.244>
- Hossain, A., Habibullah-Al-Mamun, Md., Nagano, I., Masunaga, S., Kitazawa, D., & Matsuda, H. (2022). Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: Risks, current concern, and future thinking. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(8), Article 8. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17825-4>
- Huynh, T.-G., Hu, S.-Y., Chiu, C.-S., Truong, Q.-P., & Liu, C.-H. (2019). Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. *Aquaculture Research*, 50(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/are.13951>
- Jang, H. M., Kim, Y. B., Choi, S., Lee, Y., Shin, S. G., Unno, T., & Kim, Y. M. (2018). Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal

- aquaculture, South Korea. *Environmental Pollution*, 233, 1049-1057.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.006>
- Kabiraj, M., Das, P. K., Sultana, S., & Banu, G. R. (2020). Antagonistic effect of *Lactobacillus* spp. On experimentally *Vibrio* spp. Infected *Penaeus monodon*. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 6(2), 311-315.
<https://doi.org/10.3329/ajmbr.v6i2.48077>
- Kannappan, S., Sivakumar, K., & Sethi, S. (2018). Protective effect of mangrove (*Rhizophora apiculata*) leaves extract in shrimp (*Penaeus monodon*) larvae against bio-luminescent disease-causing *Vibrio harveyi* bacteria. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11675>
- Kari, Z. A., Wee, W., Hamid, N. K. A., Mat, K., Rusli, N. D., Khalid, H. N. M., Sukri, S. A. M., Harun, H. C., Dawood, M. A. O., Hakim, A. H., Khoo, M. I., Abd El-Razek, I. M., Goh, K. W., & Wei, L. S. (2022). Recent Advances of Phytobiotic Utilization in Carp Farming: A Review. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 1-10.
<https://doi.org/10.1155/2022/7626675>
- Khelissa, S., Chihib, N.-E., & Gharsallaoui, A. (2021). Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and its main uses as a food preservative. *Archives of Microbiology*, 203(2), Article 2. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>
- Liu, X., Zhang, G., Liu, Y., Lu, S., Qin, P., Guo, X., Bi, B., Wang, L., Xi, B., Wu, F., Wang, W., & Zhang, T. (2019). Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. *Environmental Pollution*, 246, 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.005>

- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maiti, S. K., & Chowdhury, A. (2013). Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. *Journal of Environmental Protection*, 04(12), Article 12. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.412163>
- Manage, P. M. (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 23(1), Article 1. <https://doi.org/10.4038/sljas.v23i1.7543>
- Martinez, R. (2022). Presión antrópica y su relación con la susceptibilidad del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes, 2000 – 2020. *Cátedra Villarreal Posgrado*, 1(2), Article 2. <https://doi.org/10.24039/rcvp2022121642>
- Mendoza, G., & Ordinola-Zapata, A. (2022). El extracto de *Mentha piperita* incrementa la supervivencia del camarón *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(3), Article 3. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i3.21178>
- Mog, M., Ngasotter, S., Tesia, S., Waikhom, D., Panda, S. P., Sharma, S., & Varshney, S. (2020). Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(3), Article 3.

- Mohammadi, M., & Kim, I. H. (2018). Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1350120>
- Morales-Covarrubias, M., García-Aguilar, N., Bolan-Mejía, M., & Puello-Cruz, A. (2016). Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122(1), Article 1. <https://doi.org/10.3354/dao03060>
- 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>
- Morán, B., & Hidalgo, A. (2018). Environmental impacts in the Puerto Pizarro Bay. *Manglar*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.17268/manglar.2016.015>
- Moreira, D., & Mendez, Y. (2024). *Caracterización de bacterias nativas con potencial probiótico en el cultivo de camarón (Litopenaeus vannamei) en Guayas, Ecuador*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 82 pp. <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/200ec291-3668-4788-b375-ec60a7204901/content>
- Mustafa, M. F., Bunga, M., & Achmad, M. (2019). Use of Probiotics to Fight Bacterial Populations of *Vibrio* sp. On Vaname Shrimp Cultivation (*Litopenaeus vannamei*). *Torani Journal of Fisheries and Marine Science*, 69-76. <https://doi.org/10.35911/torani.v2i2.7056>

- Nunes, A. J. P., Sá, M. V. C., Andriola-Neto, F. F., & Lemos, D. (2006). Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 260(1-4), 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.027>
- Ordinola, E. (2022). Pesquería de invertebrados marinos y de manglar, Tumbes, Perú, 2018. *Informe del Instituto del Mar del Perú*, 49(1), Article 1. <https://repositorio.imarpe.gob.pe/items/be96e122-220e-4c43-893f-46368df746f7>
- Ordinola-Zapata, A., Siccha, Z., Castillo-Carrillo, P., & Luque, C. (2019). Identification by DNA barcode of invading fish in the mangrove of Tumbes (Peru). *Manglar*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.17268/manglar.2019.013>
- Ordinola-Zapata, A., Vieyra-Peña, E. G., Ramírez-Segura, B. E., & Saavedra Olivos, K. Y. (2020). Diversidad genética y estructura poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en Tumbes, Perú. *Revista Veterinaria*, 31(1), 33-37. <https://doi.org/10.30972/vet.3114615>
- Pepi, M., & Focardi, S. (2021). Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115723>
- Pereira, C. S., Possas, C. D. A., Viana, C. M., & Rodrigues, D. D. P. (2007). *Vibrio* spp. Isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), 387-390. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000200030>

- Pérez-Escobar, O. A., Lucas, E., Jaramillo, C., Monro, A., Morris, S. K., Bogarín, D., Greer, D., Dodsworth, S., Aguilar-Cano, J., Sanchez Meseguer, A., & Antonelli, A. (2019). The Origin and Diversification of the Hyperdiverse Flora in the Chocó Biogeographic Region. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01328>
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, *6*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Potosí, K. A. (2024). *Efecto de Bacillus spp. Aislados de Litopenaeus vannamei en la inhibición in vitro e in vivo de Vibrio spp.* [Tesis de Ingeniero Pesquero, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/65088>
- Prashant, K., & Shubham, K. (2025). Antimicrobial Properties of Neem (Azadirachta Indica): A Comprehensive Review of Phytochemicals and Mechanisms of Action. *2*(4), 9. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.15295814>
- Prieto, A., Ocampo, A. A. de, Fernández, A., & Pérez, M. B. (2005). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, *8*(1), Article 1.
- Quelemes, P. V., Perfeito, M. L. G., Guimarães, M. A., Dos Santos, R. C., Lima, D. F., Nascimento, C., Silva, M. P. N., Soares, M. J. D. S., Ropke, C. D., Eaton, P., De Moraes, J., & Leite, J. R. S. A. (2015). Effect of neem (Azadirachta indica A. Juss) leaf extract on resistant Staphylococcus aureus biofilm formation and Schistosoma mansoni worms. *Journal of Ethnopharmacology*, *175*, 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.026>

- Quevedo, K. G. (2020). *Aislamiento y caracterización de Lactobacillus sp con potencial probiótico in vitro frente a patógenos de trucha arcoíris*. [Tesis de Maestro en Sanidad Acuícola, Universidad Cayetano Heredia]. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/7752/Aislamiento_QuevedoOlaya_Karol.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Quispe, W., Mantilla M., B., Ccama S., A., Ortega A., Y., & Sandoval C., N. (2020). Aislamiento de bacterias nativas de *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), Article 4. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19024>
- Rashidian, G., Boldaji, J. T., Rainis, S., Prokić, M. D., & Faggio, C. (2021). Oregano (*Origanum vulgare*) Extract Enhances Zebrafish (*Danio rerio*) Growth Performance, Serum and Mucus Innate Immune Responses and Resistance against *Aeromonas hydrophila* Challenge. *Animals*, 11(2), 299. <https://doi.org/10.3390/ani11020299>
- Rosado, A. A. (2018). *Resistencia Antimicrobiana de bacterias del género Vibrio en langostino blanco (Litopenaeus vannamei) en centros de cultivo de la región Tumbes* [Tesis de Médico Veterinario, Universidad Ricardo Palma]. <https://hdl.handle.net/20.500.14138/1686>
- Ruan, S., Luo, J., Zhang, T., Nordhaus, I., Diao, X., & Zhao, H. (2020). Spatial and seasonal variations of chloramphenicol resistance genes and their co-occurring analysis with bacteria in a typical mangrove area of Hainan island, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106541. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106541>
- Ruelas, G. M. C., Bayardo, S. G., Domínguez-Lagunes, S., Pérez, C. E. F., Pérez, S. A. D., Hernández-Díaz, L. de J., & Jiménez-Edeza, M. (2024).

- Enterococcus faecium aisladas del contenido intestinal de Penaeus vannamei: Propiedades de seguridad, tecnológicas y probióticas. *QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas*, 2, Article 2.
- Rull, V. (2023). Rise and fall of Caribbean mangroves. *Science of The Total Environment*, 885, 163851. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163851>
- Sahandi, J., Sorgeloos, P., Xiao, H., Wang, X., Qi, Z., Zheng, Y., & Tang, X. (2019). The Use of Selected Bacteria and Yeasts to Control Vibrio spp. In Live Food. *Antibiotics*, 8(3), 95. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030095>
- Sánchez, I., Martín, L., García, Y., Abad, Z., Rodríguez, R. F., Ramírez, Y., Zamora Sánchez, J., Basulto, R., Moreira, A., & Arenal, A. (2013). Efecto de Lactobacillus sp. Aislado de col fermentada, sobre el peso y los marcadores inmunológicos del camarón blanco Litopenaeus vannamei. *Revista de Salud Animal*, 35(2), Article 2.
- Santiago, M. L., Espinosa, A., & Bermúdez, M. del C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), Article 3. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57912963005.pdf>
- Segaran, T. C., Azra, M. N., Lananan, F., Burlakovs, J., Vincevica-Gaile, Z., Rudovica, V., Grinfelde, I., Rahim, N. H. A., & Satyanarayana, B. (2023). Mapping the Link between Climate Change and Mangrove Forest: A Global Overview of the Literature. *Forests*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/f14020421>
- Seminario-Córdova, R. A., Barreto, I. B., & Tuesta, Z. E. E. (2022). Coastal wetlands of the north of Peru: Preservation progress. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 44, e62571. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v44i1.62571>

- Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., & Wang, B. (2016). Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 452, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.014>
- Sociedad Nacional de Acuicultura. (2024). *Una crisis sin precedentes en el sector acuícola de langostinos afecta el dinamismo económico, en especial en la región Tumbes*. Oannes. <https://www.oannes.org.pe/noticias/pesca-y-acuicultura/peru-una-crisis-sin-precedentes-en-el-sector-acuicola-de-langostinos-afecta-el-dinamismo-economico-en-especial-en-la-region-tumbes/>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Aguilar-Rendón, K. G., & González-Gómez, J. P. (2024). Identification of new *Vibrio campbellii* strains harboring the pVA1 plasmid isolated from *Penaeus vannamei* postlarvae affected by outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Aquaculture*, 579, 740221. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740221>
- Tank, P. R., Vadher, K. H., & Patel, M. P. (2018). Isolation of probiotic bacteria from gastrointestinal tract of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and antibacterial activity of probiotic bacteria against *Vibrio* spp. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), Article 4.
- Tinoco, V. Y., Peralta-Ortiz, T., & Ordinola-Zapata, 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>

- Torres, I. V. (2025). *Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de Vibrio spp. Aislados del tracto digestivo de Litopenaeus vannamei, en laboratorio* [Tesis de Ingeniero Pesquero Acuícola, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/65679/TESIS%20-%20TORRES%20CANALES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), Article 18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- 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), Article 1. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Williams, S. L., Jensen, R. V., Kuhn, D. D., & Stevens, A. M. (2017). Analyzing the metabolic capabilities of a *Vibrio parahaemolyticus* strain that causes Early Mortality Syndrome in shrimp. *Aquaculture*, 476, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.030>
- World Bank. (2014). *Reducing disease risk in aquaculture*. World Bank. <http://documents.worldbank.org/curated/en/110681468054563438/pdf/882570REPLACEM00NAME0Reantaso0Melba.pdf>
- Xu, L., Zhang, H., Xiong, P., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, 753, 141975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141975>

- Yang, Y., Song, W., Lin, H., Wang, W., Du, L., & Xing, W. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environment International*, 116, 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.011>
- Yeung, M., & Thorsen, T. (2016). Development of a More Sensitive and Specific Chromogenic Agar Medium for the Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and Other *Vibrio* Species. *Journal of Visualized Experiments*, 117, 54493. <https://doi.org/10.3791/54493>
- Yuan, J., Ni, M., Liu, M., Zheng, Y., & Gu, Z. (2019). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a typical estuary aquaculture region of Hangzhou Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 376-384. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.037>
- Zheng, D., Yin, G., Liu, M., Chen, C., Jiang, Y., Hou, L., & Zheng, Y. (2021). A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Science of The Total Environment*, 777, 146009. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146009>

ANEXOS

Anexo 1. Formulario de registro de datos de langostinos silvestres.

FORMULARIO 1

RECOLECCIÓN DE DATOS DE LANGOSTINOS

Nº Registro:

Nombre del responsable: _____

Lugar de recolección: _____

Fecha: ___/___/___ Hora: _____

ESPECIE:

<i>Litopenaeus vannamei</i>	<input type="checkbox"/>	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	<input type="checkbox"/>
<i>Litopenaeus occidentalis</i>	<input type="checkbox"/>	<i>Farfantepenaeus californiensis</i>	<input type="checkbox"/>
<i>Farfantepenaeus brevirrostris</i>	<input type="checkbox"/>	No se puede determinar	<input type="checkbox"/>

SEXO: Macho Hembra Indeterminado

MEDIDAS:

LT (cm): _____ Peso (g): _____

OBSERVACIONES EXTERNAS:

Color del animal: _____

Expansión de cromatóforos: Si () No ()

Deformidades en rostro, abdomen o apéndices: Si () No ()

Indique: _____

Flexión del músculo abdominal (calambre): Si () No ()

Color de las branquias: blancas () marrón () negras () Amarillas ()

Otro () Indique: _____

Color de los apéndices (periópodos, pleópodos y urópodos) : normal () rojo () Negro ()

Otro () Indique: _____

Color de las antenas: normal () rojo ()

Otro () Indique: _____

Transparencia de los músculos del abdomen y del cefalotórax:

Transparente () Blanquecino () Otro () Indique:

Repleción Intestinal (porcentaje del Intestino que se encuentra lleno): _____

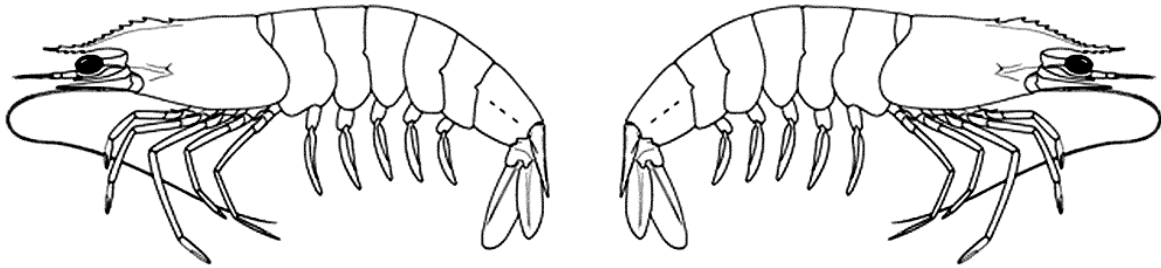
Textura del exoesqueleto: duro () blando ()

Manchas, lesiones, melanosis, astillas clavadas:

Indique: _____

UBICACIÓN DE LESIONES/MELANIZACIÓN

En la figura, señalar las zonas de manchas (M), lesiones (L), melanosis (Me), astillas clavadas (A).



OBSERVACIONES ADICIONALES:

Anexo 2. Recolección de langostinos silvestres y obtención de tejidos.

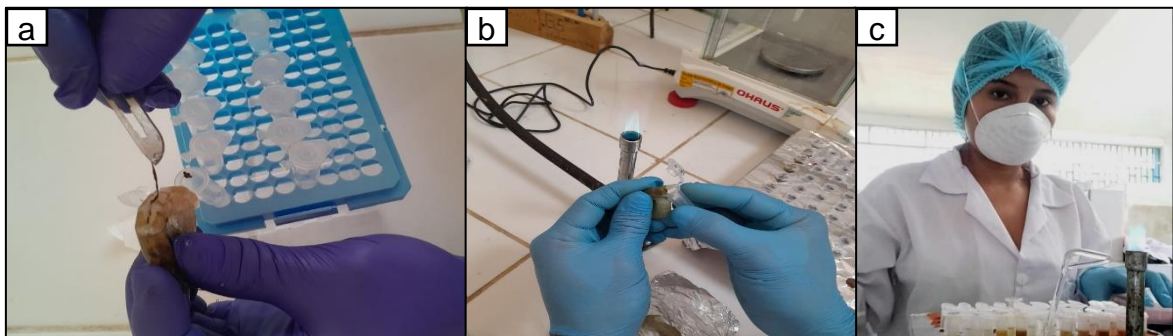
Figura 7

Biometría en ejemplares de Litopenaeus vannamei a) ejemplares de langostino para la toma de medidas b) medición de la longitud c) pesado del ejemplar



Figura 8

Toma de tejidos de langostinos silvestres a) extracción de intestino en muestras de langostinos b) extracción de muestra de hepatopáncreas en langostino silvestre c) diluciones de las muestras extraídas para la siembra



Anexo 3. Microbiología de trabajo de investigación

Figura 9

Siembra de cepas en medio HiCrome Vibrio y MRS. a) Siembra de muestras de intestino y hepatopáncreas, b) colonias crecidas en medio HiCrome Vibrio y c) colonias crecidas en medio MRS

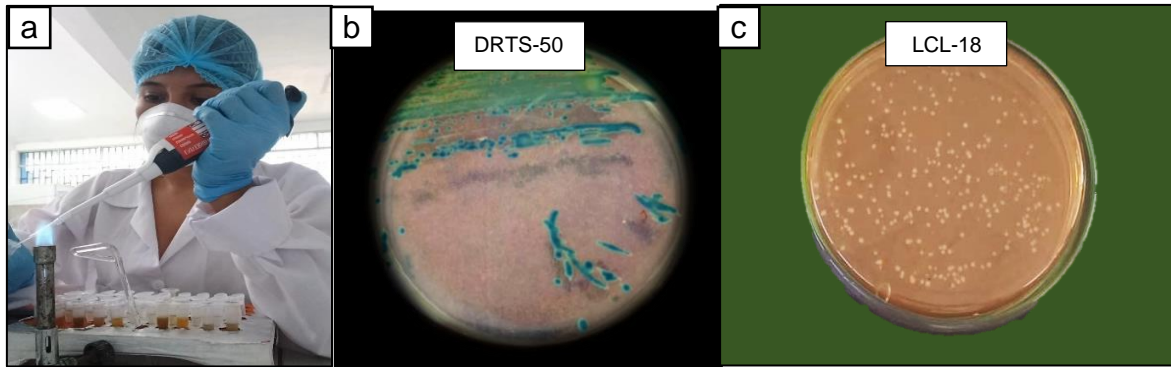


Figura 10

Procedimiento de tinción de Gram. a) Colonias purificadas en medio TSA, b) observación de las formas en el microscopio y c) fotografía de BAL (cocos Gram positivos)

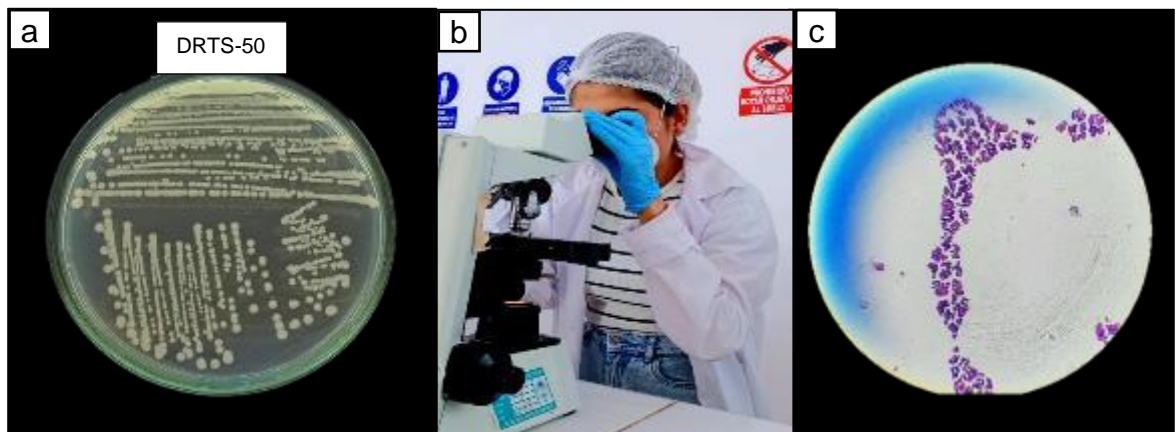


Figura 11

Pruebas bioquímicas aplicadas en Vibrio spp. a) Prueba de catalasa y b) Prueba de oxidasa

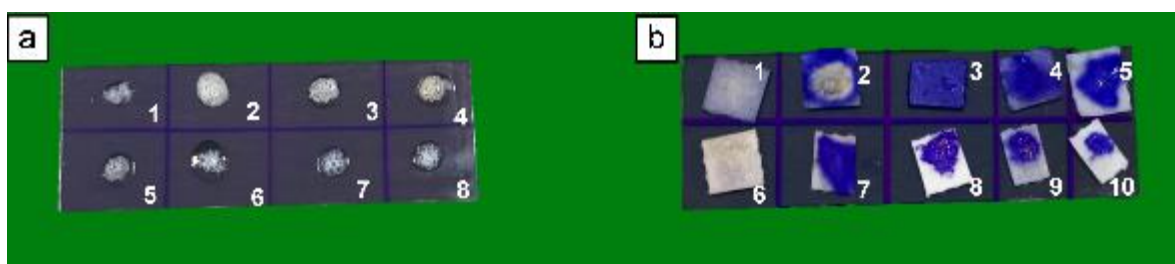


Figura 12

Realización de antibiogramas de cepas bacterianas. a) Siembra de cepas en medio Mueller Hinton y b) Colocación de discos de antibióticos

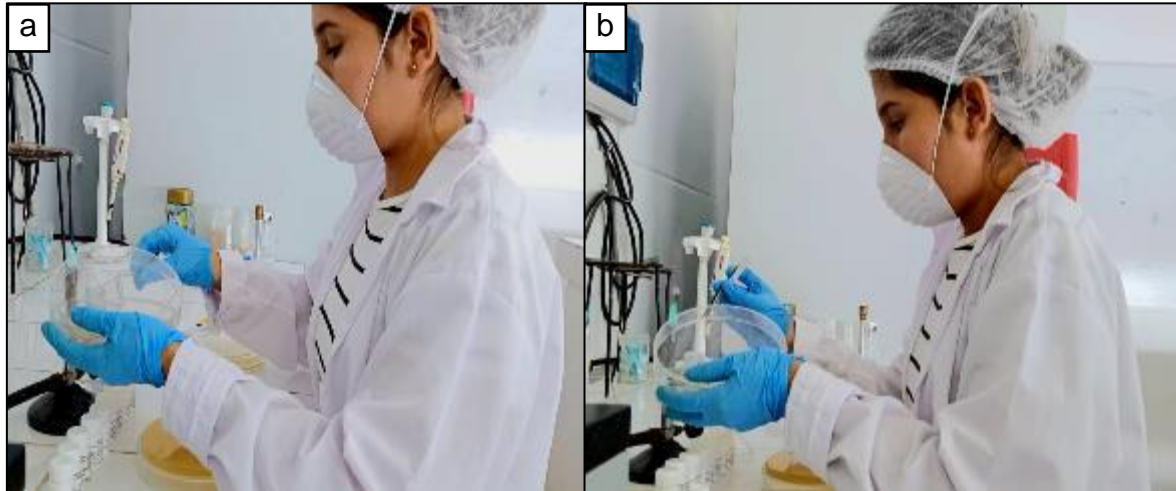


Figura 13

Antibiograma realizado en las cepas DRTS-50 y DRTS-44 de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos silvestres

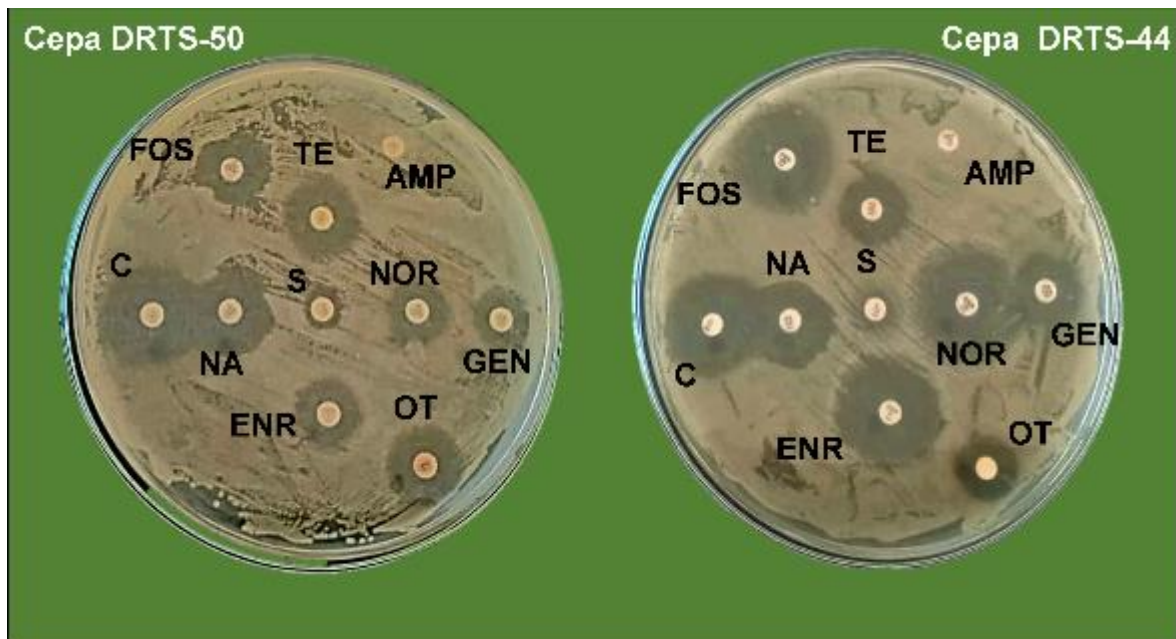
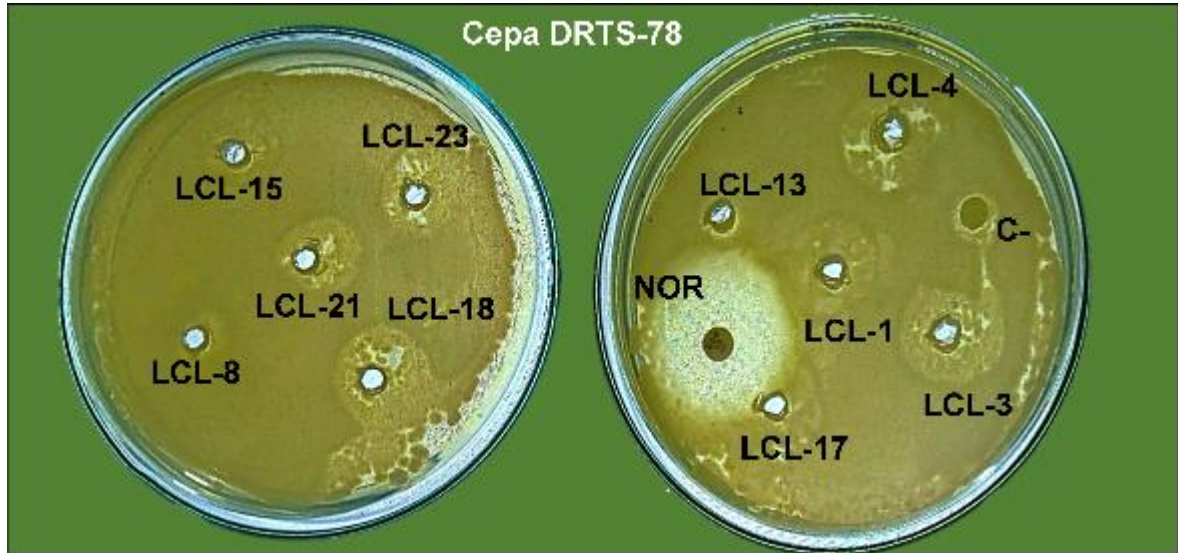


Figura 14

Ensayo in vitro de inhibición utilizando cepas de BAL etiquetadas como LCL contra la cepa DRTS de Vibrio spp. NOR: antibiótico de elección (norfloxacina). C-: control negativo (solución salina)



Anexo 4. Procedimiento para la identificación molecular de las cepas.

Figura 15

Extracción de ADN usando el protocolo de PBS



Figura 16

Preparación de las muestras para la PCR. a) Materiales para preparar el mix de PCR b) Adición del ADN a los tubos conteniendo el mix

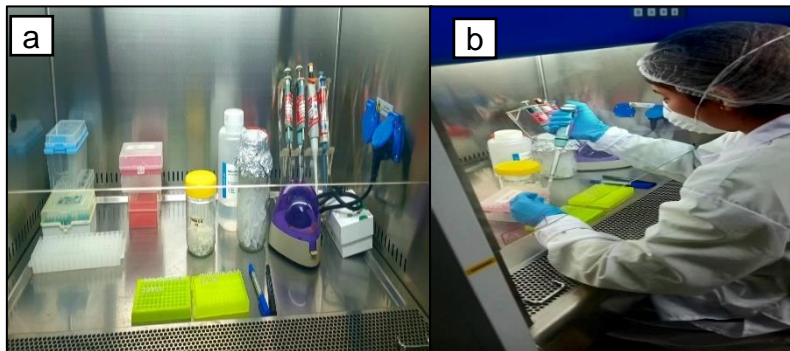


Figura 17

PCR y electroforesis. a) Programación del termociclador b) Adición de los amplicones al gel para la electroforesis y C) Observación de los amplicones en el transiluminador

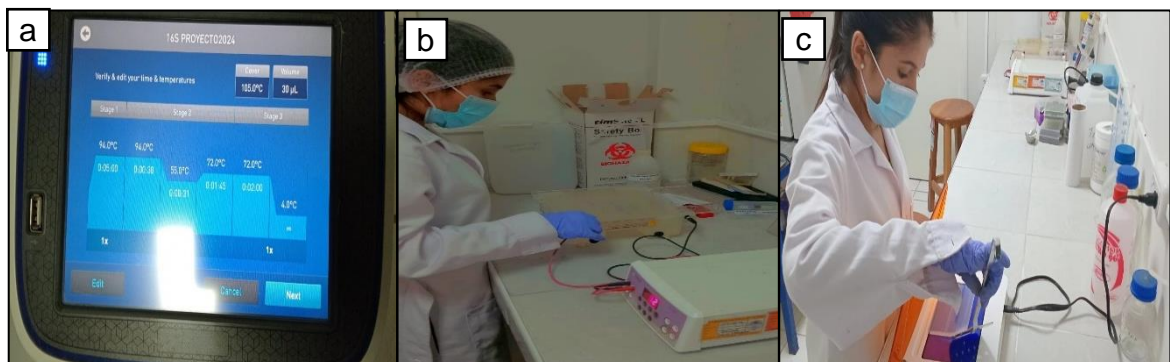


Figura 18

Ensayo in vivo. a) Pesado del alimento balanceado y b) Adición de las cepas de BAL al alimento balanceado

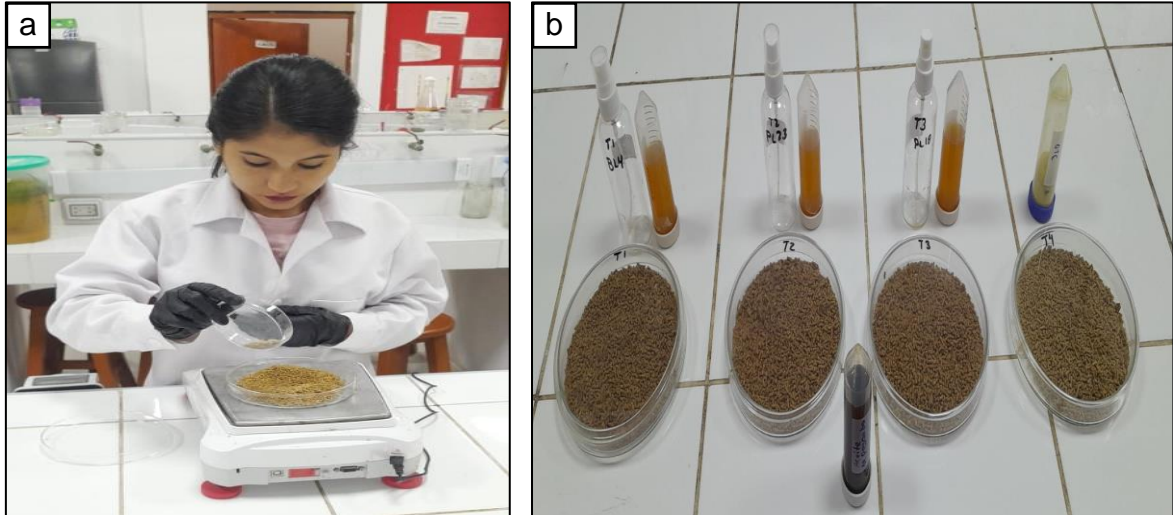
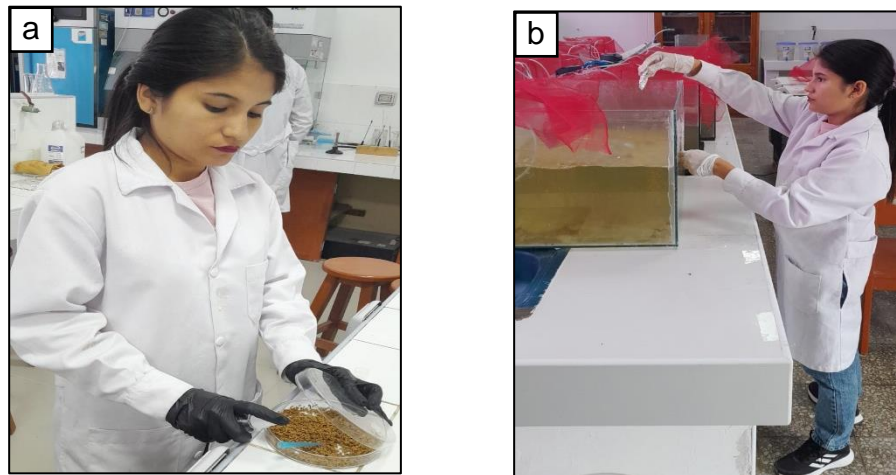


Figura 19

Tratamiento a los langostinos infectados. a) Adición de las cepas de BAL al alimento balanceado y b) Aplicación del alimento balanceado con las cepas de BAL a los langostinos infectados



Anexo 6. Diámetros de halos de inhibición producidos por antibióticos en cepas de *Vibrio* spp.

Tabla 17

Diámetro de halos de inhibición (mm) en cepas de Vibrio spp. aisladas de langostinos silvestres.

Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles	Tetraciclinas		Aminoglucósidos		Quinolonas		
	Ampicilinas (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10 µg)	Ácido nalidíxico (30 µg)	Norfloxacin (10 µg)	Enrofloxacin (5 µg)
DRTS-40	0,0±0,0	26,3±1,5	26,3±0,6	12,0±1,0	19,3±0,6	15,0±1,0	17,0±1,0	22,0±1,0	26,3±3,2	23,±1,5
DRTS-41	10,0±0,0	29,7±0,6	29,3±0,6	25,0±0,0	25,0±0,0	15,0±0,0	19,0±0,0	28,0±0,0	25,0±0,0	26,0±0,0
DRTS-42	14,7±4,0	0,0±0,0	30,0±0,0	16,3±0,6	19,7±0,6	14,3±1,2	26,3±1,2	25,0±0,0	24,0±3,5	25,0±0,0
DRTS-44	0,0±0,0	20,0±0,0	25,0±0,0	20,0±0,0	24,0±5,2	14,0±3,5	18,7±2,3	20,3±1,2	19,7±2,3	19,3±1,2
DRTS-45	23,3±0,6	0,0±0,0	29,3±0,6	22,0±0,0	30,0±0,0	16,0±0,0	25,0±0,0	30,0±0,0	30,7±0,6	35,3±0,6
DRTS-46	0,0±0,0	17,8±0,6	26,3±0,6	17,7±0,6	17,0±0,1	15,3±0,6	22,7±6,1	22,0±0,1	24,3±4,0	22,3±7,4
DRTS-47	0,0±0,0	17,3±1,0	25,7±1,2	15,1±0,0	20,0±1,0	16,0±1,0	20,0±2,0	21,3±0,6	15,0±1,0	16,0±1,0
DRTS-48	22,0±0,0	0,0±0,0	30,7±0,6	20,0±0,0	25,0±0,0	12,0±0,0	22,0±0,0	27,0±0,0	33,0±0,0	35,0±0,0
DRTS-49	0,0±0,0	13,5±0,6	21,3±1,5	17,3±0,6	15,3±0,6	15,0±1,0	20,0±0,0	15,0±1,0	20,0±0,0	16,7±0,6
DRTS-50	0,0±0,0	17,5±2,1	25,7±0,6	13,7±1,5	20,3±0,6	10,7±0,6	16,7±0,6	24,3±1,2	16,3±0,6	17,0±1,0
DRTS-51	15,7±0,6	0,0±0,0	29,3±0,6	20,0±0,0	18,7±1,2	16,0±1,7	27,3±4,6	20,3±1,2	25,7±0,6	25,7±2,9
DRTS-52	27,7±0,6	0,0±0,0	33,0±0,0	20,0±0,0	25,0±0,0	15,0±0,0	25,0±0,0	29,3±0,6	35,3±0,6	36,0±0,0
DRTS-63	0,0±0,0	26,7±0,6	30,0±0,0	25,0±0,0	24,0±0,0	15,0±0,0	24,0±0,0	30,0±0,0	35,0±0,0	27,0±0,0
DRTS-65	0,0±0,0	18,7±1,2	28,3±2,9	20,3±0,6	19,7±1,2	13,3±2,9	22,0±5,2	21,0±0,0	21,0±1,7	19,0±0,0
DRTS-66	0,0±0,0	21,3±1,2	23,3±2,3	18,0±1,2	19,3±0,6	15,0±0,0	18,3±2,9	19,0±1,7	26,0±1,7	20,0±0,0
DRTS-67	0,0±0,0	29,7±0,6	30,0±0,0	25,0±0,0	25,3±0,6	17,0±0,0	23,0±0,0	25,0±0,0	27,0±0,0	23,0±0,0
DRTS-68	0,0±0,0	20,3±0,6	27,3±1,2	18,7±1,2	20,0±0,0	14,0±3,5	17,3±4,0	22,7±0,6	26,7±5,8	20,7±2,3
DRTS-70	0,0±0,0	23,0±0,0	30,0±0,0	25,0±0,0	27,7±0,6	15,0±0,0	17,0±0,0	30,0±0,0	25,0±0,0	22,0±0,0
DRTS-71	0,0±0,0	24,0±0,0	28,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	12,0±0,0	18,0±0,0	22,0±0,0	30,0±0,0	23,0±0,0
DRTS-72	0,0±0,0	20,0±1,0	26,7±0,6	21,7±1,5	21,0±1,7	15,0±5,2	21,7±5,8	22,0±0,0	19,7±0,6	19,3±1,2
DRTS-73	0,0±0,0	20,0±0,0	26,0±0,0	18,0±1,7	19,3±1,2	15,7±4,0	18,7±2,3	22,0±1,7	26,7±5,8	21,3±1,2
DRTS-74	10,0±0,0	30,3±0,6	30,0±0,0	27,0±0,0	25,0±0,0	15,7±0,6	20,0±0,0	26,3±0,6	29,7±0,6	27,0±0,0
DRTS-75	0,0±0,0	24,2±1,0	23,3±1,5	21,0±1,0	16,3±0,6	16,0±1,0	23,0±1,7	20,3±0,6	23,3±1,5	16,7±0,6
DRTS-76	0,0±0,0	25,0±0,0	30,0±0,0	23,3±0,6	29,3±0,6	14,0±0,0	20,0±0,0	30,0±0,0	27,0±0,0	25,0±0,0
DRTS-77	10,0±0,0	29,3±0,6	30,0±0,0	27,0±0,0	26,0±0,0	13,0±0,0	17,0±0,0	28,0±0,0	30,0±0,0	27,0±0,0
DRTS-78	0,0±0,0	12,3±0,6	22,7±1,2	15,7±0,6	17,7±0,6	16,0±1,0	19,3±0,6	20,7±0,6	23,7±2,5	20,0±0,0