UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

Supervivencia y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratado con cepas de *Bacillus* spp.

TESIS

Para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuícola

Autor: Br. Agapo Ayala Rodríguez

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

Supervivencia y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratado con cepas de *Bacillus* spp.

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra
PRESIDENTE

Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña
SECRETARIA

Dra. Tessy Peralta Ortiz
VOCAL

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

Supervivencia y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratado con cepas de *Bacillus* spp.

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

Br. Agapo Ayala Rodríguez

EJECUTOR

Dra. Tessy Peralta Ortiz

Dra. Tessy Peralta Ortiz
https://orcid.org/0000-0001-5907-7713
Docente Asesora

Dr. Alberto Ordinola Zapata

Dr. Alberto Ordinola Zapata
https://orcid.org/0000-0002-9644-0531
Docente Co-asesor

Tumbes, 2025

ACTA DE SUSTENTACIÓN

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

"Año de la Recuperación y Consolidación de la Economía Peruana"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Puerto Pizarro, el día veintidós del mes de octubre del dos mil veinticinco, siendo las dieciséis horas y treinta minutos, en el aula A-6 de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES, se reunieron el Jurado Calificador, designado con **Resolución N° 057-2024/UNTUMBES-FIPCM-D**. Debido a la ausencia del **Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON (Presidente),** por motivo de salud, y haciendo uso del artículo 73 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, el miembro accesitario asume la secretaria y el secretario asume la Presidencia, quedando el jurado como se indica: **Dr. OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA (Presidente), Dra. ENEDIA GRACIELA VIEYRA PEÑA (Secretaria) y Dra. TESSY PERALTA ORTIZ (Vocal – asesora,** CODIGO ORCID N° 0000-0001-5907-7713) **y al Dr. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA** (CODIGO ORCID N° 0000-0002-9644-0531) como Coasesor, luego de la presentación, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada **"Supervivencia y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio spp.* y tratado con cepas de *Bacillus spp.*"**, para optar el Título Profesional de **INGENIERO PESQUERO ACUICOLA**, presentado por el:

Br. AGAPO AYALA RODRIGUEZ

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado, según el artículo N° 75 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al Bachiller:

AGAPO AYALA RODRIGUEZ ..APROBADO.., con calificativo: ....BUENO.....

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

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

Siendo las ..17..... horas y ...10.....minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta de sustentación.

Tumbes, 22 de octubre 2025

Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA
CODIGO ORCID N° 0000-0002-9637-6250
DNI. N° 00201986
Presidente

Dra. ENEDIA G. VIEYRA PEÑA
CODIGO DE ORCID N° 0000-0001-6541-7075
DNI. N° 00217076
Secretaria

Dra. TESSY PERALTA ORTIZ
CODIGO ORCID N° 0000-0001-5907-7713
DNI. N° 00239540
Vocal y Asesora

c.c.:
- Jurado (03) - Asesora: Dra. TESSY PERALTA O. Coasesor Dr. ALBERTO ORDINOLA Z.
- Interesados - Archivo Decanato.

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

Agapo Ayala Rodríguez

Tesis de Agapo Ayala Rodriguez

Informe final de tesis de Agapo Ayala Rodríguez

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid:::3117:526650637

Fecha de entrega
11 nov 2025, 21:19 GMT-5

Fecha de descarga
11 nov 2025, 21:21 GMT-5

Nombre del archivo
Tesis de Agapo Ayala Rodriguez.docx

Tamaño del archivo
3.7 MB

58 páginas

11.448 palabras

65.413 caracteres

Dra. Tessy Peralta Ortiz
https://orcid.org/0000-0001-5967-7713
Docente Asesora

turnitin Página 1 de 62 - Portada Identificador de la entrega trn:oid:::3117:526650637

15% Similitud general

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

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

15% Fuentes de Internet
3% Publicaciones
8% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.° 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.

Dra. Tessy Peralta Ortiz
https://orcid.org/0000-0001-5907-7713
Docente Asesora

turnitin Página 2 de 62 - Descripción general de integridad Identificador de la entrega trn:oid:::3117:526650637

Fuentes principales

15% Fuentes de Internet
3% Publicaciones
8% 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		11%
2	Trabajos del estudiante	
Universidad Nacional de Tumbes on 2020-10-01		1%
3	Internet	
media.neliti.com		<1%
4	Internet	
boletin.invemar.org.co		<1%
5	Trabajos del estudiante	
Universidad Nacional de Tumbes on 2019-01-01		<1%
6	Internet	
link.springer.com		<1%
7	Trabajos del estudiante	
Universidad Autónoma de Chiapas on 2020-06-08		<1%
8	Trabajos del estudiante	
Universidad Nacional de Tumbes on 2018-10-16		<1%
9	Trabajos del estudiante	
unap on 2025-08-14		<1%
10	Internet	
renati.sunedu.gob.pe		<1%
11	Internet	
agriallis.com		<1%

Dra. Tessy Peralta Ortiz
http://orcid.org/0000-0001-5907-7713
Docente Asesora

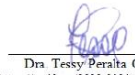
turnitin Página 3 de 62 - Descripción general de integridad Identificador de la entrega trn:oid:::3117:526650637

12 Internet
eprints.uanl.mx <1%

13 Trabajos del estudiante
ipn on 2025-01-09 <1%

14 Internet
repositorio.cientifica.edu.pe <1%

15 Internet
www.smf.org.mx <1%



Dra. Tessy Peralta Ortiz
https://orcid.org/0000-0001-5907-7713
Docente Asesora

turnitin Página 4 de 62 - Descripción general de integridad Identificador de la entrega trn:oid:::3117:526650637

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con profundo respeto y gratitud a Dios, por concederme la vida, la fortaleza y la claridad necesarias para transitar este proceso académico. Su guía constante me ha sostenido en los momentos de incertidumbre y me ha permitido alcanzar este importante logro en mi formación profesional.

A mi esposa, mi más sincero agradecimiento por su presencia constante, su respaldo incondicional y por brindarme siempre palabras de aliento, comprensión y amor a lo largo de estos años de estudio.

Asimismo, expreso mi reconocimiento a mi bella familia con generosidad y afecto, han sabido acompañarme en los momentos más difíciles, alentándome a seguir adelante con esperanza y determinación.

Agapo Ayala Rodríguez

AGRADECIMIENTO

A mi estimada asesora, Dra. Tessy Peralta Ortiz, le expreso mi más profundo agradecimiento por su constante acompañamiento y valioso apoyo a lo largo del desarrollo de esta investigación, así como durante toda mi formación profesional. Sus orientaciones, sugerencias y consejos han sido pilares fundamentales en la culminación de este importante logro. Gracias, apreciada profesora y guía

A mi estimado co-asesor, Dr. Alberto Ordinola Zapata, le manifiesto mi más sincero agradecimiento por su permanente acompañamiento y significativo respaldo durante el desarrollo de esta investigación, así como a lo largo de toda mi formación profesional. Sus orientaciones, recomendaciones y valiosos consejos han sido determinantes para la culminación de este importante objetivo. Gracias, apreciado profesor y amigo.

A los distinguidos miembros del jurado: Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra, Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña y Dra. Tessy Peralta Ortiz, mi más profundo reconocimiento por sus valiosas observaciones y aportes durante el proceso de esta investigación, los cuales enriquecen significativamente el trabajo y contribuyen al avance del conocimiento científico.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, quienes, desde los primeros ciclos académicos, supieron transmitir con dedicación no solo conocimientos técnicos, sino también el valor del esfuerzo, la perseverancia y la pasión por la profesión.

ÍNDICE

Pág.

Resumen xvi

Abstract xvii

I. INTRODUCCIÓN 18

II. REVISIÓN DE LITERATURA 20

2.1. Empleo de antibióticos en los cultivos acuícolas 20

2.2. *Vibrio* spp. 21

2.3. Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp. 21

2.4. Probióticos. 21

2.5. *Bacillus* spp. como probióticos. 22

2.6. Investigaciones relacionadas 23

III. MATERIALES Y MÉTODOS 27

3.1. Material y equipo 27

3.2. Métodos 29

3.2.1. Recolección de langostinos 29

3.2.2. Obtención de cepas de *Bacillus* spp. 29

3.2.3. Obtención de cepas de *Vibrio* spp. 29

3.2.4. Identificación molecular de cepas de *Bacillus* spp 30

3.2.5. Inhibición *in vivo* de *Bacillus* spp sobre *Vibrio* spp 32

3.2.6. Plan de procesamiento y análisis de datos 33

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34

4.1. Pesos y longitudes promedios de langostinos juveniles 34

4.2. Identificación de *Bacillus* spp 35

4.3. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* en el primer ensayo. 35

4.4. Supervivencia de langostinos infectados considerando los sacrificados en primer ensayo 37

4.5. Supervivencia de langostinos infectados sin considerar los sacrificados en primer ensayo. 39

4.6. Carga de *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de *Bacillus* spp. en primer ensayo 41

4.7. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* con respecto al segundo ensayo. 42
4.8. Supervivencia con respecto al segundo ensayo experimental 44
4.9. Carga de *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de *Bacillus* spp. en el segundo ensayo 46
V. CONCLUSIONES 48
VI. RECOMENDACIONES 49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....50
ANEXOS 58

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Pesos y longitudes iniciales (media ± desviación estándar) de langostinos juveniles correspondientes al primer ensayo experimental. 34
Tabla 2. Pesos y longitudes iniciales (media ± desviación estándar) de langostinos juveniles correspondientes al segundo ensayo experimental 35
Tabla 3. Carga de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* correspondiente al primer ensayo 59
Tabla 4. Carga de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* correspondiente al segundo ensayo.... 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Peso promedio de *Litopenaeus vannamei* infectados y tratados con *Bacillus* spp. experimentalmente en el primer ensayo. 36
Figura 2. Longitud promedio de *Litopenaeus vannamei* infectados y tratados con *Bacillus* spp. experimentalmente en el primer ensayo. 37
Figura 3. Supervivencia de *Litopenaeus vannamei* considerando los sacrificados. 38
Figura 4. Supervivencia de *Litopenaeus vannamei* sin considerar los sacrificados en primer ensayo. 40
Figura 5. Evolución de la carga promedio de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos en el primer ensayo. 41
Figura 6. Peso promedio de *Litopenaeus vannamei* infectados y tratados con *Bacillus* spp. correspondiente al segundo ensayo. 43
Figura 7. Longitud promedio de *Litopenaeus vannamei* infectados y tratados con *Bacillus* spp. correspondiente al segundo ensayo 44
Figura 8. Supervivencia de *Litopenaeus vannamei* sin considerar los sacrificios correspondientes al segundo ensayo 45
Figura 9. Supervivencia de *Litopenaeus vannamei* considerando los sacrificios correspondientes al segundo ensayo 46

Figura 10. Carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de langostinos en el segundo ensayo 47
Figura 11. Llegada de los langostinos al laboratorio 60
Figura 12. Disposición de los acuarios en el ensayo experimental 60
Figura 13. Extracción de hepatopáncreas de langostinos y siembra en medio TCBS 61
Figura 14. Colonias de *Vibrio* en TCBS 61
Figura 15. Características externas de los langostinos en el ensayo experimental 62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de langostinos en el primer y segundo ensayo. 59
Anexo 2. Fotografías de la ejecución de la tesis. 60

Supervivencia y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratado con cepas de *Bacillus* spp.

Br. Agapo Ayala Rodríguez[1]

Dra. Tessy Peralta Ortiz[2]

Dr. Alberto Ordinola Zapata[2]

RESUMEN

La investigación determinó la supervivencia y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio* spp. y tratado con cepas probióticas de *Bacillus* spp.. Se utilizaron cepas obtenidas del cepario de investigaciones almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar: *Bacillus* 60 IB y 54 IB, identificadas molecularmente en esta investigación como *B. safensis* y *B. licheniformis*, respectivamente, y cepas de *Vibrio parahaemolyticus* resistentes a antibióticos, pero sensibles a oxitetraciclina. El experimento se desarrolló en dos ensayos con 12 acuarios cada uno, aplicando cuatro tratamientos al alimento: T1 (*B. safensis*), T2 (*B. licheniformis*), T3 (oxitetraciclina) y T4 (control). Se infectaron los langostinos al inicio y se evaluaron supervivencia, peso y carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas. En ambos ensayos, las cepas de *Bacillus* favorecieron el crecimiento, alcanzando mayores pesos y longitudes. En el primer ensayo, *B. safensis* igualó la supervivencia obtenida con oxitetraciclina, mientras que *B. licheniformis* mostró menor eficacia. Respecto a la carga bacteriana, *B. licheniformis* logró reducir los niveles de *Vibrio* a valores similares al antibiótico. En el segundo ensayo, ambas cepas mantuvieron la supervivencia al 100%, al igual que los demás tratamientos, y mostraron efecto inhibitorio sobre *Vibrio*. Los resultados muestran que *B. safensis* y *B. licheniformis* son alternativas probióticas prometedoras para mejorar el crecimiento y la supervivencia del langostino frente a infecciones con Vibrio, con una eficacia comparable a la oxitetraciclina, representando una alternativa más ecológica y con menor impacto ambiental.

Palabras clave: *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., *Litopenaeus vannamei*, probiótico, crecimiento y supervivencia.

---

[1] Estudiante de la Escuela de Ingeniería Pesquera Acuícola de la Universidad Nacional de Tumbes
[2] Profesores Principales de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes
Tesis presentada para obtener el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuícola
Universidad Nacional de Tumbes
Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera Acuícola
Calle Los Ceibos S/N Puerto Pizarro, Tumbes, Perú
e-mail: agapo.ayro68@gmail.com
2025

Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* experimentally infected with *Vibrio* spp. and treated with *Bacillus* spp. strains.

Br. Agapo Ayala Rodríguez[1]

Dra. Tessy Peralta Ortiz[2]

Dr. Alberto Ordinola Zapata[2]

ABSTRACT

The study evaluated the survival and growth of *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio* spp. and treated with probiotic strains of *Bacillus* spp. The bacterial strains used *Bacillus* 60 IB and 54 IB were obtained from the research strain collection stored at the Laboratorio de Biología Molecular of the Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, and were molecularly identified as *B. safensis* and *B. licheniformis*, respectively. Additionally, *Vibrio parahaemolyticus* strains resistant to one or two antibiotics but sensitive to oxytetracycline were used. The experiment was conducted in two trials, each with 12 aquaria, applying four feed treatments: T1 (*B. safensis*), T2 (*B. licheniformis*), T3 (oxytetracycline), and T4 (control). Shrimp were infected at the start survival, weight and *Vibrio* load in the hepatopancreas were periodically assessed. In both trials, *Bacillus* strains promoted growth, achieving higher weights and lengths. In the first trial, *B. safensis* matched the survival rate of oxytetracycline, while *B. licheniformis* was less effective. Regarding bacterial load, *B. licheniformis* reduced *Vibrio* levels to values similar to the antibiotic. In the second trial, all treatments including both *Bacillus* strains achieved 100% survival and showed inhibitory effects against *Vibrio*. These findings suggest that *B. safensis* and *B. licheniformis* are promising probiotic alternatives for enhancing shrimp growth and survival under *Vibrio* infection, with comparable efficacy to oxytetracycline and offering a more ecological, lower-impact solution for sustainable aquaculture.

Keywords: *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., *Litopenaeus vannamei*, probiotic, growth and survival.

---

[1] Student Escuela de Ingeniería Pesquera Acuícola at the Universidad Nacional de Tumbes
Principal Professors of the Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences at the National University of Tumbes
Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the professional title of Aquaculture Fisheries Engineer
Universidad Nacional de Tumbes
Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera Acuícola
Los Ceibos Street S/N, Puerto Pizarro, Tumbes, Peru
e-mail: agapo.ayro68@gmail.com
2025

I. INTRODUCCIÓN

Un problema fundamental en los cultivos acuícolas son las enfermedades infectocontagiosas producidas en los organismos en cultivo por diversos microorganismos tales como bacterias, hongos y virus, estas enfermedades son tan nocivas que habitualmente producen fuertes pérdidas en la producción y por ende económicas, uno de los microorganismos que origina las enfermedades más graves en langostinos son las bacterias del género *Vibrio* spp. (Flegel et al., 2008; Krishnani et al., 2015). A fin de combatir las enfermedades originadas por microorganismos en los organismos cultivados se emplean antibióticos, los cuales tienen como desventajas que son poluentes y adicionalmente conducen a seleccionar cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Muchas de las enfermedades que se han tratado con antibióticos en los langostinos son producidas por cepas de *Vibrio* spp. esto ha conducido a que muchas cepas de las mismas hayan desarrollado resistencia a antibióticos; como se han reportado en estudio de Watts et al. (2017), Stalin & Srinivasan (2016) y Krishnani et al. (2015).

Sin embargo, existen alternativas a dichos antibióticos, una de las cuales son las bacterias probióticas, es decir microorganismos que al ser consumidos por el huésped es capaz de modificar la microbiota en el tracto intestinal del mismo y producir efectos positivos para el huésped como son un aumento en la tasa de conversión alimenticia, proporcionarle una mayor resistencia a enfermedades al combatir a los microorganismos patógenos y probablemente por incentivar al sistema inmune (Villamil & Martínez-Silva, 2009).

Ha existido un uso incorrecto y excesivo de los antibióticos, pues se han usado de manera indiscriminada, a veces como un profiláctico y otras veces para tratar enfermedades que lógicamente no pueden ser tratadas con ellos como son las enfermedades producidas por virus (Letchumanan et al., 2015; Luis-Villaseñor et al., 2015).

Las cepas resistentes a antibióticos de *Vibrio* spp. representan un serio problema, pues por un lado, hace que el tratamiento antibiótico empleado en los cultivos tenga poco éxito, así como, puede significar un riesgo para la salud del consumidor, pues existe la probabilidad de que dichas cepas resistentes puedan transferir sus genes de resistencia a cepas bacterianas que realmente son patógenas a los seres humanos, conduciendo a enfermedades que no pueden ser tratadas con terapia antibiótica en la clínica humana (Jeyasanta et al., 2017; Millanao et al., 2011; Shakerian et al., 2018).

Por los motivos antes señalados, existe una búsqueda de soluciones alternas al uso de antibióticos en la acuicultura y en particular, en la camaronicultura, habiéndose ensayado probióticos, prebióticos, simbióticos, y otros suplementos dietéticos. Los probióticos por su condición de microorganismos unicelulares y al ser ingeridos por el huésped, les mejora la salud, por tanto, son una alternativa prometedora en el cultivo de langostinos, las más utilizadas pertenecen a *Bacillus* spp. que ha demostrado inhibir eficazmente la acción de *Vibrio* spp., además, por la producción de enzimas ayudan a descomponer los alimentos y transformarlos en moléculas más fáciles de digerir en el intestino (Obando & Suárez, 2015; Rodríguez, 2017).

Esta tesis tuvo el siguiente objetivo:

Determinar el crecimiento y supervivencia de *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratado con cepas de *Bacillus* spp.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Empleo de antibióticos en los cultivos acuícolas

La utilización inadecuada de antibióticos en la acuicultura ha dado lugar a la selección de bacterias resistentes a los mismos, así como de los genes que les confieren resistencia; estos genes se ha observado que pueden ser transferidos entre bacterias, incluyendo a aquellas que son patógenas e incluso a otros microorganismos en el entorno acuático (González et al., 2021). Esta problemática también repercute en el cultivo de langostinos, que ha experimentado pérdidas anuales cercanas a los mil millones de dólares en 2001, según la información registrada en Flegel et al. (2008).

Las bacterias son responsables en mayor grado de las enfermedades infecciosas que se producen en langostinos, muchas de esas bacterias son comensales del langostino, siendo parte de la microbiota de estos organismos, sin embargo, pueden transformarse en patógenas cuando el langostino se halla debilitado. Entre los géneros bacterianos que producen mayor cantidad de enfermedades se tienen a *Vibrio, Pseudomonas y Aeromonas*, que predominan en el intestino de los langostinos (Zheng et al., 2016). Dentro de este contexto, las bacterias del género *Vibrio*, han presentado desafíos significativos en el cultivo de langostinos (Flegel, 2012), pues se hallan entre las poblaciones bacterianas más frecuentes en el sistema digestivo e incluso en la hemolinfa del langostino (Lomelí, 2011).

La terapia convencional para las enfermedades causadas por *Vibrio* en los langostinos suele implicar el uso de antibióticos, los cuales pueden ser naturales, semisintéticos o sintéticos (Acosta, 2014; Santiago et al., 2009). Estos antibióticos pueden actuar como bacteriostáticos: inhibiendo el crecimiento de los patógenos o como bactericidas; matándolos directamente (Martínez, 2018). Según Otero (2018), en los cultivos de *L. vannamei*, se emplean diversos antibióticos para controlar la proliferación de *Vibrio* spp., entre los cuales destacan la enrofloxacina, oxitetraciclina, y florfenicol.

2.2. *Vibrio* spp.

Las bacterias *Vibrio* spp. se encuentran habitando ecosistemas marinos y del manglar, y también forman parte de la microbiota normal del langostino, pero puede convertirse en patógenas oportunistas que originan elevadas mortalidades que pueden llegar hasta el 100% cuando el langostino está debilitado (Morales-Covarrubias, 2008; Lomelí, 2011; Lin et al., 2018).

Las especies del género *Vibrio* constituyen los principales patógenos bacterianos en las granjas camaroneras a nivel mundial, este género incluye más de 110 especies (Lin et al., 2018), mientras que sólo algunas originan fuertes infecciones en el langostino, entre las que se cuentan a *V. alginolyticus, V. anguillarum, V. harveyi, V. parahaemolyticus* y *V. splendidus* (Nimrat et al., 2008; Rebouças et al., 2011; Serrano, 2014).

Vibrio spp. se caracterizan por ser bacterias Gram negativas aeróbicas o anaeróbicas facultativas, con forma de bastón recto o curvo de pequeño tamaño (1,4 a 2,6 µm de largo por 0,5 a 0,8 µm de ancho); una característica práctica para identificar a las bacterias de dicho género es observar si crece en agar marino y en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Albuquerque et al., 2015).

2.3. Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp.

A lo largo de milenios, los microorganismos han desarrollado genes de resistencia como una estrategia adaptativa y selectiva frente a los antibióticos. Esta respuesta se ha visto impulsada por el uso actual tanto de antibióticos (naturales o sintéticos), lo que ha contribuido al desarrollo de resistencia bacteriana a estos medicamentos (Santos, 2017).

2.4. Probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades adecuadas, ejercen efectos positivos en la salud del huésped (González-Martínez et al., 2003). Javadi & Khatibi (2017) los describen como cultivos de microorganismos simples o múltiples que, al ser consumidos por el huésped, proporcionan beneficios al mejorar la composición de su microbiota natural. En la acuicultura, los probióticos se utilizan como complementos en la alimentación o se

añaden directamente al agua de cultivo, con el propósito de mejorar la salud de los organismos cultivados o la calidad del agua, respectivamente.

Los probióticos también pueden ayudar a la salud de los organismos acuáticos al equilibrar la microbiota intestinal, desplazar las bacterias patógenas, competir por nutrientes, y generar sustancias como antibióticos, peróxido de hidrógeno, lisozimas, bacteriocinas y proteasas. Además, algunas cepas probióticas pueden modular el pH intestinal al producir ácidos orgánicos (Quispe, 2017).

2.5. *Bacillus* spp. como probióticos

El género *Bacillus*, perteneciente a la familia Bacillaceae, se destaca por su alta actividad bioquímica y versatilidad. Son bacilos que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, son Gram positivos, capaces de formar endosporas con formas ovaladas o cilíndricas que les confieren resistencia a condiciones ambientales adversas. Además, son móviles gracias a la presencia de flagelos laterales, y positivos para la enzima catalasa, aunque la hemólisis que presentan puede variar. Su crecimiento óptimo se produce a un pH entre 5,5 y 8,5 (Layton et al., 2011).

En la acuicultura, los probióticos comúnmente utilizados pertenecen a diversas especies bacterianas, incluyendo las ácido lácticas del género *Lactobacillus*, así como *Carnobacterium, Bacillus, Pseudomonas* y *Vibrio*. Las bacterias del género *Bacillus*, en particular, son reconocidas por su capacidad de formar esporas frente a condiciones ambientales adversas, y la mayoría de sus cepas son no patógenas. Se utilizan en la producción de metabolitos como antibióticos y enzimas, así también son capaces de inhibir cepas patógenas, así como actuar mediante exclusión competitiva al desplazar a las cepas patógenas de los lugares de adhesión, por último también pueden modular el sistema inmunitario, estimulando fenoloxidasas y superoxidasa (Pérez-Sánchez et al., 2014).

Varias especies de *Bacillus* han sido probadas como probióticos, incluyendo *Bacillus cereus, Bacillus claussii, Bacillus coagulans Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* (Pérez-Sánchez et al., 2014). *Bacillus subtilis*, en particular, se destaca por su actividad bactericida y fungicida, además de su baja toxicidad para los vertebrados, lo que lo convierte en una cepa frecuentemente incluida en probióticos utilizados en la acuicultura (Obando & Suárez, 2015).

2.6. Investigaciones relacionadas

Muchos trabajos de investigación están dirigidos a evaluar el poder inhibidor de *Vibrio* spp. que poseen ciertas cepas de *Bacillus* sp. cuando se aplican en sistemas de cultivos de langostinos y peces, algunos se muestran a continuación:

Liu et al. (2010), determinaron el potencial probiótico de una cepa de *Bacillus subtilis*, denominada E20, en larvas de *Litopenaeus vannamei*. Se examinaron aspectos como la supervivencia, desarrollo, resistencia al estrés y estado inmunitario. Se llevaron a cabo pruebas utilizando tres concentraciones diferentes de *Bacillus subtilis*, que fueron aplicados en intervalos de tres días durante un período de 14 días. Los hallazgos revelaron mejoras significativas en el desarrollo larvario con la concentración 10^9 UFC/ml de *Bacillus subtilis*. Además, se observó una reducción notable en el crecimiento bacteriano, incluyendo a *Vibrio*, luego de la aplicación de *Bacillus subtilis* en el agua. Las larvas demostraron una notable resistencia al estrés, sin experimentar mortalidad durante cambios extremos de temperatura y salinidad. Los resultados sugieren que la cepa de *Bacillus subtilis* aplicada a la concentración indicada podría tener un efecto probiótico beneficioso en *L. vannamei*.

Nimrat et al. (2008), evaluaron el impacto que dos tipos de probióticos basados en *Bacillus* spp. (que fueron designados como A y B) obtenidas del intestino del camarón tigre *Penaeus monodon* tuvieron en larvas y poslarvas de *L vannamei*. Estos probióticos se suministraron de tres formas distintas: 1) producto congelado y seco, 2) en microcápsulas y 3) bioencapsulado en artemias. Se evaluó el efecto de estas formas de suministro en el conteo de *Vibrio* spp., la calidad del agua y el crecimiento de larvas y poslarvas de *L. vannamei*. Los resultados indicaron que, en el caso de las larvas, tanto las cepas empleadas como las formas en que se administraron no influyeron de manera estadísticamente significativa en las variables evaluadas. Sin embargo, en poslarvas, si se observaron diferencias significativas. Se observó que todos los tratamientos en que se emplearon *Bacillus* spp. mostraron una superioridad en la supervivencia y el crecimiento y en comparación con el control; en tanto que, se observó que la aplicación de *Bacillus* spp. en microcápsulas resultó ser la más efectiva.

Zokaeifar et al. (2012), llevaron a cabo una investigación para evaluar el poder inhibitorio de dos cepas de *Bacillus subtilis* (que denominaron G1 y L10) en *Litopenaeus vannamei* infectados con enfermedades resistentes a antibióticos. Realizaron un experimento que duró ocho semanas, en el cual los langostinos recibieron dos tratamientos: BM5 consistente en alimento balanceado enriquecido con un *mix* G1: 50% y L10: 50%, a concentraciones de 10^5 UFC/g y BM8, consistente en el mismo tipo de alimento con ambas cepas de Bacillus (mezcla 50:50) en concentración 10^8 UFC/g (BM8). En el grupo de control se alimentó exclusivamente con alimento balanceado, al cual no se le aplicó las cepas mencionadas. Los resultados revelaron mejoras significativas en términos de la supervivencia y el crecimiento cuando se aplicaron las cepas probióticas. Aunque, no se observaron diferencias en la conversión alimenticia entre estos tratamientos y el grupo de control. Posteriormente, los langostinos fueron desafiados con *Vibrio harveyi*, registrándose una mortalidad notablemente inferior con los tratamientos que recibieron *B. subtilis* (BM5 con 20,0% y BM8 con 33,3%) en comparación con el grupo control (63,3%). Estos hallazgos sugieren que las cepas evaluadas tienen la capacidad de incrementar el crecimiento, así como la resistencia a enfermedades en langostinos.

Jayaseelan et al. (2013), estudiaron la capacidad vibriostática de ciertas cepas de *B. licheniformis* que se obtuvieron de probióticos que se hallan en el mercado. Estas cepas fueron identificadas utilizando el kit bioquímico API 50 CHB y fueron desafiadas contra 162 de *Vibrio* con características patógenas (que incluyeron entre otros a *V. anguillarum, V. harveyi, V. vulnificus* y *Photobacterium damselae* anteriormente llamado *V. damselae*) que fueron recolectadas de laboratorios de producción de larvas, así como, de cultivos de engorde de camarón tigre (*Penaeus monodon*). Se evaluó la capacidad para inhibir a *Vibrio* spp. utilizando la técnica de pozo de agar. Para esto se sembró por esparcimiento, las cepas de *Vibrio* spp. a una concentración de 10^3 UFC/ml sobre placas de agar; en tanto que, en el caso de las cepas de *Bacillus licheniformis* éstas fueron centrifugadas por 15 min a 9600 xg, para obtener el extracto; luego se estandarizó a pH 7 y se filtró a 0,22 µm (esto para producir el extracto libre de bacterias). Finalmente, se colocaron 100 µl de los sobrenadantes en los pozos de agar. Se observó que el sobrenadante de Dabh1 exhibió máxima capacidad inhibitoria sobre *Vibrio*

(diámetro de los halos de inhibición de 6 a 12 mm). Estos hallazgos sugieren que la cepa ensayada podría ser utilizada como un probiótico en el cultivo del camarón tigre.

Harpeni et al. (2018), llevaron a cabo un estudio para investigar el impacto de una cepa de *Bacillus* sp. que denominaron D2.2, donde utilizaron 360 langostinos (en estadio PL15, con un peso promedio de 0,02 ± 0,002 g), que se dividieron en diferentes grupos de tratamiento para combatir la infección de *Vibrio harveyi* en *L. vannamei*. Después de un período de cultivo de 32 días, se evaluaron parámetros como la supervivencia, el incremento de peso diario y la ganancia de peso, observándose los mejores resultados en el tratamiento D (con 6% de Bacillus sp. y 4% de extracto de camote utilizado como prebiótico).

Gobi et al. (2016), determinaron la actividad probiótica de *Bacillus licheniformis* en el crecimiento, así como, en la inmunidad y respuesta antioxidante del bagre *Pangasius hypophthalmus* infectado con *V. parahaemolyticus*. En este experimento, se formaron tres grupos de peces, el primero estuvo constituido por bagres que fueron infectados con 1 ml de la cepa patógena a dos concentraciones diferentes (10^5 y 10^7 UFC/ml). El segundo grupo, constituido por bagres que recibieron el mismo volumen y concentraciones de la cepa probiótica que las de *V. parahaemolyticus*. En el tercer grupo, los bagres fueron primero expuestos a *Vibrio parahaemolyticus* y luego recibieron *B. licheniformis* en las mismas concentraciones. Se observó que cuando se administraron *V. parahaemolyticus* se redujeron el crecimiento, así como la actividad inmune y antioxidante. Sin embargo, estos parámetros aumentaron cuando se administraron *B. licheniformis*, con o sin la exposición de los peces a *V. parahaemolyticus*. Se concluyó que el crecimiento, así como la actividad inmune y respuesta antioxidante de *P. hypopthalmus* mejoran cuando se les administra *B. Licheniformis,* sea que se hayan expuesto o no a *V. parahaemolyticus*.

Quispe (2017), aisló *Lactobacillus* y *Bacillus* del intestino de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) y ensayó su propiedad inhibitoria contra la bacteria patógena de la trucha, *Yersinia ruckeri*. El experimento inició colectando 48 alevines y juveniles de trucha de una piscifactoría, los que fueron sacrificados con sobredosis de

eugenol y se les extrajo el intestino, del cual se raspó su mucosidad y se sembró en agar MRS, incubándolo por 24 a 48 h a 30 °C. : Tres cepas fueron identificadas como pertenecientes al género *Lactobacillus* y una al género *Bacillus*; estas se ensayaron para inhibir a *Y. ruckeri in vitro*, encontrando que todas las cepas inhibieron a la cepa patógena (halos de inhibición de 15 a 19 mm de diámetro). Los autores concluyeron que del intestino de la trucha se pueden obtener bacterias probióticas para tratar a la bacteria patógena *Y. ruckeri*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material y equipo

Material biológico

- 400 langostinos juveniles *Litopenaeus* v*annamei* de cultivo.

Materiales y equipos de laboratorio

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

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

Reactivos

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

Material de limpieza

- 5 rollos de papel toalla
- 500 g de detergente
- 2 L de hipoclorito de sodio al 5% (lejía)

3.2. Métodos

3.2.1. Recolección de langostinos.

Se obtuvieron 400 langostinos de cultivo (200 de 1 g y 200 de 4 g) de la Langostinera Baical S.R.L. ubicada en el sector El Bendito en la región Tumbes (Perú). Los langostinos se mostraron aparentemente sanos y se transportaron en fundas plásticas hasta el Laboratorio de Acuicultura II de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (figura 11 del anexo).

3.2.2. Obtención de cepas de *Bacillus* spp.

Las cepas de *Bacillus* spp. fueron obtenidas del cepario que se encuentra en el Laboratorio de Biología Molecular de la FIPCM y que corresponden a aislamientos realizados por anteriores tesistas y en proyectos de docentes de la FIPCM, a partir de langostinos silvestres recolectados del manglar, así como de langostinos de cultivo obtenidos en empresas langostineras de Tumbes. Se obtuvieron dos cepas para el ensayo *in vivo* que correspondieron a *Bacillus safensis* (60 IB) y *Bacillus licheniformis* (54 IB).

La primera cepa fue aislada de langostinos de cultivo de Zarumilla, al crecer en medio TSA se mostraron como colonias cremas, circulares con 1 mm de diámetro. La segunda cepa fue aislada del mismo lugar y tuvo características similares con la excepción de ser colonias de forma irregular y diámetro de 4 mm.

Las cepas obtenidas fueron reactivadas en medio líquido (caldo tripticasa soya – TSB) y luego se procedió a realizar una masificación para obtener cultivos con una densidad de al menos 1,0 x 10^6 UFC/ml.

3.2.3. Obtención de cepas de *Vibrio* spp.

Las cepas de *Vibrio* spp. se tomaron del cepario que se encuentra en el Laboratorio de Biología Molecular de la FIPCM y que corresponden a aislamientos realizados por anteriores tesistas y de proyectos de investigación, a partir de langostinos silvestres recolectados del manglar, así como de langostinos de cultivo obtenidos en empresas de

Tumbes. Se obtuvieron dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Lang 60 y 20) para cada ensayo *in vivo*.

La cepa Lang 60 se aisló del hepatopáncreas de langostinos silvestres de Puerto Pizarro, al crecer en TCBS se mostraron como colonias verdes, circulares de diámetro 1,4 mm. Sus células vegetativas fueron cocobacilos gram negativos que fueron negativos a la catalasa y positivos a la oxidasa. La cepa fue resistente a dos de 12 antibióticos ensayados, pero fue sensible a la oxitetraciclina.

La cepa 20 se aisló del intestino de langostinos silvestres de El Bendito, al crecer en TCBS se mostraron como colonias amarillas, circulares de 2 mm de diámetro y sus células vegetativas fueron cocobacilos gram negativos y positivos a la catalasa y oxidasa. La cepa fue resistente a uno de 12 antibióticos ensayados, pero fue sensible a la oxitetraciclina.

Las cepas obtenidas fueron reactivadas en medio líquido TSB y luego se procedió a realizar una masificación para obtener cultivos con una densidad de al menos 1,5 x 10^8 UFC/ml.

3.2.4. Identificación molecular de cepas de *Bacillus* spp.

Se cultivaron las cepas de *Bacillus* en medio TSB por 24 h a 37 ºC. La extracción del ADN se hizo con la técnica de ebullición utilizando buffer fosfatado salino (PBS). Los tubos en los que crecieron las cepas fueron centrifugados a 10 000 rpm por 2 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* bacteriano en 500 µl de PBS 1X agitándolo en un vórtex hasta disolver el *pellet*. Se centrifugó a 10 000 rpm por 2 min y se eliminó sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µl de tris-EDTA (TE 1X). Los tubos se llevaron al termoblock a 100 ºC por 10 min, luego de manera inmediata se transfirió a un contenedor con hielo para que alcance una temperatura de alrededor de 0 ºC y se mantuvo allí por 5 min, para producir el choque térmico. Luego, se centrifugó a 10 000 rpm por 2 min y se recuperó 100 µl de sobrenadante. Dicho sobrenadante fue tratado con 1 µl de ARNasa (0,1 mg/ml) y se incubó en termoblock a 37 ºC por 1 h. La pureza del ADN extraído se midió en un equipo nanodrop y se estandarizó a 300 ng/µl.

Con el ADN extraído se realizó una amplificación del fragmento 16S ARNr empleando los *primers* 27F y 1492R. El *mix* empleado consistió en 18,8 µl de agua ultra pura, 2,5 µl de buffer de amplificación 10X, 0,5 µl de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,5 µl de cada uno de los *primers*, 0,1 µl de taq polimerasa y 2 µl de ADN molde para un volumen final de 25 µl en cada reacción. El termociclador fue programado para realizar la PCR con una desnaturalización inicial a 94 ºC por 5 min, seguidos de 30 ciclos de amplificación, consistentes en desnaturalización a 94 ºC por 30 s, hibridación de 55 ºC por 31 s, extensión de 72 ºC por 1 min y 45 s. A continuación, una extensión final de 72 ºC por 2 min.

Los amplicones obtenidos se colocaron en un gel de agarosa al 1,5%, con bromuro de etidio (proporción de 4 µl de bromuro de etidio por cada 80 ml de TAE 1X). Los amplicones se mezclaron con *buffer* de carga en proporción (1:1), depositándose 2 µl del amplicón. La migración se hizo a 90 V por 35 min en un equipo de electroforesis horizontal y los amplicones se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los amplicones obtenidos se colocaron en tubos de 200 µl, se empacaron en una caja isotérmica de tecnopor con *gelpack* y se enviaron a la empresa BTS en la ciudad de Lima, para su envío al extranjero para el secuenciamiento correspondiente.

Una vez recepcionadas las secuencias de ADN correspondientes a los amplicones, se procedió a analizar la calidad de su secuencia empleando el software FastQC versión 0.12.1, los extremos de la secuencia que tuvieron baja calidad se recortaron con el software Chromas versión 2.6.6. Las secuencias se ensamblaron en Mega versión 11, con la secuencia de consenso se realizaron búsquedas en las bases de datos de GenBank y Silva. Se declaró la identidad de la cepa bacteriana, cuando el porcentaje de identificación en cualquiera de las dos bases de datos fue igual o superior a 99%.

3.2.5. Inhibición *in vivo* de *Bacillus* spp. sobre *Vibrio* spp.

Se realizaron dos ensayos sucesivos utilizando juveniles de *L. vannamei.* En el primer ensayo se tomaron 168 de los 200 langostinos de 4 g colocándose 14 individuos por acuario en 12 acuarios. En el segundo ensayo se tomó también 168 langostinos de los 200 que tuvieron peso promedio de 1 g colocando la misma cantidad de individuos por acuario que el primer ensayo (figura 12 del anexo).

Los langostinos fueron infectados con cepas de *Vibrio* spp. y se les administró alimento balanceado impregnado con cepas de *Bacillus safensis* (60 IB) y *Bacillus licheniformis* (54 IB) cada ensayo duró aproximadamente 20 días y se evaluó el efecto de las dos cepas de *Bacillus* spp. en la supervivencia de los langostinos infectados con un *mix* de dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Lang 60 y 20).

Se utilizó la técnica de Esguerra (2012), donde se realizó la adición de las cepas de *Bacillus* spp. al alimento balanceado como se indica a continuación:

Las cepas se cultivaron en TSA por 24 horas, el cultivo crecido fue diluido para obtener una concentración 1 x 10^6 UFC/ml, se aplicó el medio de cultivo con las bacterias al alimento balanceado tratando de empapar uniformemente el mismo, luego se secó lejos de la luz solar y se selló con aceite de pescado para hacer que las bacterias no se desprendan del alimento, el alimento preparado de esta manera se mantuvo en refrigeración hasta por 4 días.

Para cada ensayo se emplearon las dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que se cultivaron en medio líquido en TSB, luego se estandarizó su concentración a 1,5 x 10^8 UFC/ml. Con estas dos cepas se realizó un *mix* que se añadió a un balde con agua del acuario para lograr una concentración final de la mezcla de 1,0 x 10^6 UFC/ml, para lo cual se agregó 16 l de agua en un balde de 20 l y a este se adicionó 53 ml de cada cepa estandarizada. Los langostinos fueron transferidos en grupos, de los acuarios hasta el balde, donde permanecieron por 10 minutos para su infección.

Al día siguiente de la infección se inició el tratamiento con el alimento suplementado con *Bacillus* spp.

Al inicio del experimento se sacrificaron dos ejemplares de cada acuario para determinar la carga inicial de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas. Al día siguiente se sacrificó un langostino de cada acuario para medir su carga de *Vibrio* spp. (figura 13 del anexo) mediante aislamiento de sus colonias en TCBS (figura 14 del anexo) y de esta manera determinar si se logró la infección. Luego, cada cinco días se sacrificó un langostino por cada acuario, para monitorear su carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas.

A diario se registró la supervivencia, el consumo de alimento balanceado y los parámetros del agua de cultivo. Cada cinco días se registró el crecimiento en peso de los langostinos.

Al finalizar cada ensayo se registró la supervivencia final, y la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas

3.2.6. Plan de procesamiento y análisis de datos

Para el ensayo *in vivo* se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos:

T1: Alimento suplementado con cepas de *Bacillus safensis* (60 IB)

T2: Alimento suplementado con cepas de *Bacillus licheniformis* (54 IB)

T3: Alimento suplementado con oxitetraciclina (5 g/kg)

T4: Alimento sin ningún tipo de medicación

El diseño experimental incluyó tres repeticiones por tratamiento, cada una representada por un acuario de 60 litros que contuvo 12 langostinos. En varios días del experimento se evaluó la supervivencia de los langostinos, así como la concentración de *Vibrio* spp. en su hepatopáncreas. Para el análisis estadístico de los datos, se aplicaron el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, ambos con un nivel de significancia del 5%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pesos y longitudes promedios de langostinos juveniles.

En la tabla 1 se muestra los pesos y longitudes promedios iniciales de los langostinos juveniles obtenidos donados por la empresa langostinera Baical S.R.L. para el primer ensayo experimental. Los pesos y longitudes fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$), y variaron entre 4,18 g y 4,72 g, con una longitud entre 7,94 cm y 8,35 cm.

Tabla 1

Pesos y longitudes iniciales (media ± desviación estándar) de langostinos juveniles correspondientes al primer ensayo experimental

Tratamiento	Cepas y controles ensayados	Peso (g)	Longitud (cm)
1	*Bacillus safensis* (60 IB)	4,72±1,01[a]	8,35±0,70[a]
2	*Bacillus licheniformis* (54 IB)	4,61±0,99[a]	8,22±0,68[a]
3	Control (oxitetraciclina)	4,46±0,83[a]	8,23±0,57[a]
4	Control (sin medicación)	4,18±1,18[a]	7,94±0,82[a]
	Promedio	4,49±1,00[a]	8,19±0,69[a]

Las letras que acompañan a peso y longitud indican en caso de ser iguales que no existió diferencia estadística significativa.

Los valores iniciales de peso y longitud como no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) garantizaron la homogeneidad de los grupos antes de la aplicación de los tratamientos como recomienda Martínez-Porchas et al. (2009).

Los pesos y longitudes promedios iniciales de los langostinos juveniles en el segundo ensayo experimental también resultaron estadísticamente similares ($p > 0,05$), y variaron entre 0,92 g y 1,07 g, con una longitud entre 4,74 cm y 4,89 cm (tabla 2). Garantizándose de esta manera la homogeneidad inicial entre los grupos antes de aplicar los tratamientos.

Tabla 2

Pesos y longitudes iniciales (media ± desviación estándar) de langostinos juveniles correspondientes al segundo ensayo experimental

Tratamientos	Cepas y controles ensayados	Peso (g)	Longitud (cm)
1	*Bacillus safensis* (60 IB)	1,02±0,16ª	4,81±0,35ª
2	*Bacillus licheniformis* (54 IB)	0,92±0,03ª	4,74±0,12ª
3	Control (oxitetraciclina)	0,98±0,04ª	4,89±0,14ª
4	Control (sin medicación)	1,07±0,25ª	4,76±0,15ª
	Promedio	1,00±0,06ª	4,80±0,07ª

Las letras que acompañan a peso y longitud indican en caso de ser iguales que no existió diferencia estadística significativa.

4.2. Identificación de *Bacillus* spp.

Ambas cepas de *Bacillus* fueron identificadas con alta precisión, porque sus porcentajes de identidad fueron del 100% al compararlas con las bases de datos GenBank y Silva.

Las cepas fueron confirmadas como pertenecientes al género *Bacillus*, y correspondieron a las especies: *Bacillus licheniformis*, en el caso de la cepa 60 IB y *Bacillus safensis*, en el caso de la cepa 54 IB. Esta identificación confirmó la concordancia entre las características moleculares y las observaciones fenotípicas previas, ya que dichas cepas presentaron morfología típica del género, como forma bacilar, reacción Gram positiva, actividad catalasa positiva y presencia de endosporas, que son características reportadas por Potosí (2024).

4.3. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* en el primer ensayo.

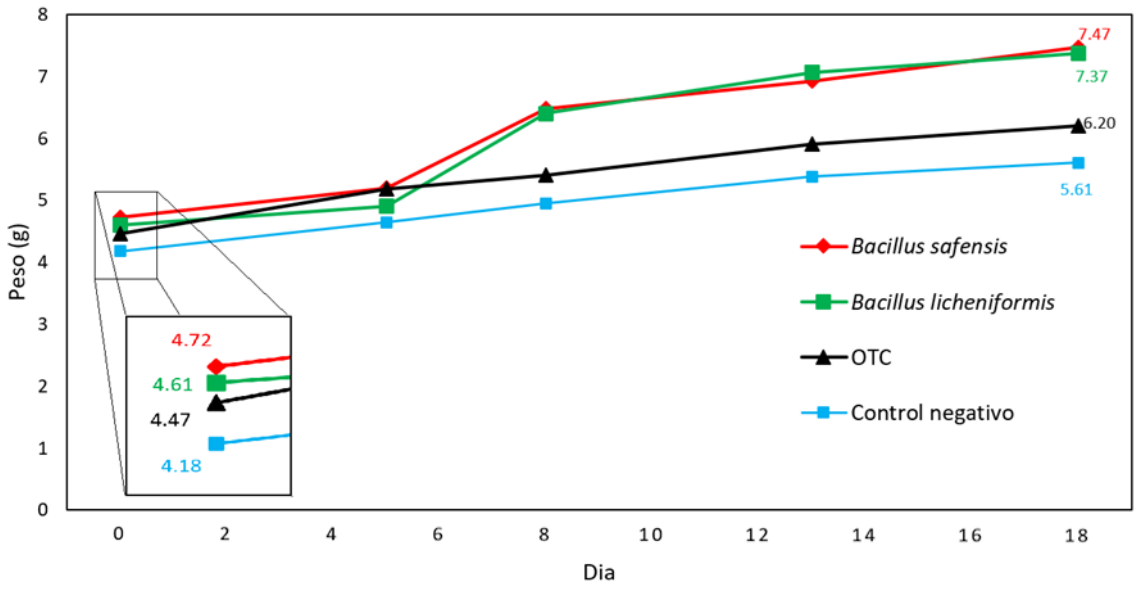
En la figura 1, se muestra el peso promedio de *Litopenaeus vannamei* en el primer ensayo; desde el inicio del experimento (día 0), los tratamientos con ambas cepas de *Bacillus* lograron que los langostinos incrementaran su peso, con una tasa de crecimiento superior a la de los tratamientos en que se aplicó oxitetraciclina y al control, en el que no se aplicó ninguna medicación. A los 5 días, el tratamiento con *B. safensis* mostró un incremento notorio en peso (4,72 g), seguido de *B. licheniformis* (4,61 g), mientras que el tratamiento con OTC y el control mostraron valores inferiores (4,47 g y 4,18 g, respectivamente).

Esta tendencia se mantuvo a lo largo del experimento, alcanzando al día 18 los valores máximos de peso promedio: 7,47 g para *B. safensis* y 7,37 g para *B. licheniformis*, en contraste con 6,20 g para OTC y 5,61 g para el control.

Puesto que el uso de probióticos, como las cepas de *Bacillus*, puede mejorar significativamente las tasas de crecimiento de los camarones en comparación con los antibióticos tradicionales, esto se puede deber a que las cepas probióticas ayudan a digerir mejor el alimento puesto que producen enzimas como proteasas, lipasas, amilasas que ayudan a mejorar la absorción de los nutrientes en los alimentos con lo cual se lograría un mayor crecimiento (Madhulika et al., 2025).

Figura 1

Peso promedio de Litopenaeus vannamei infectados y tratados con Bacillus spp. experimentalmente en el primer ensayo.



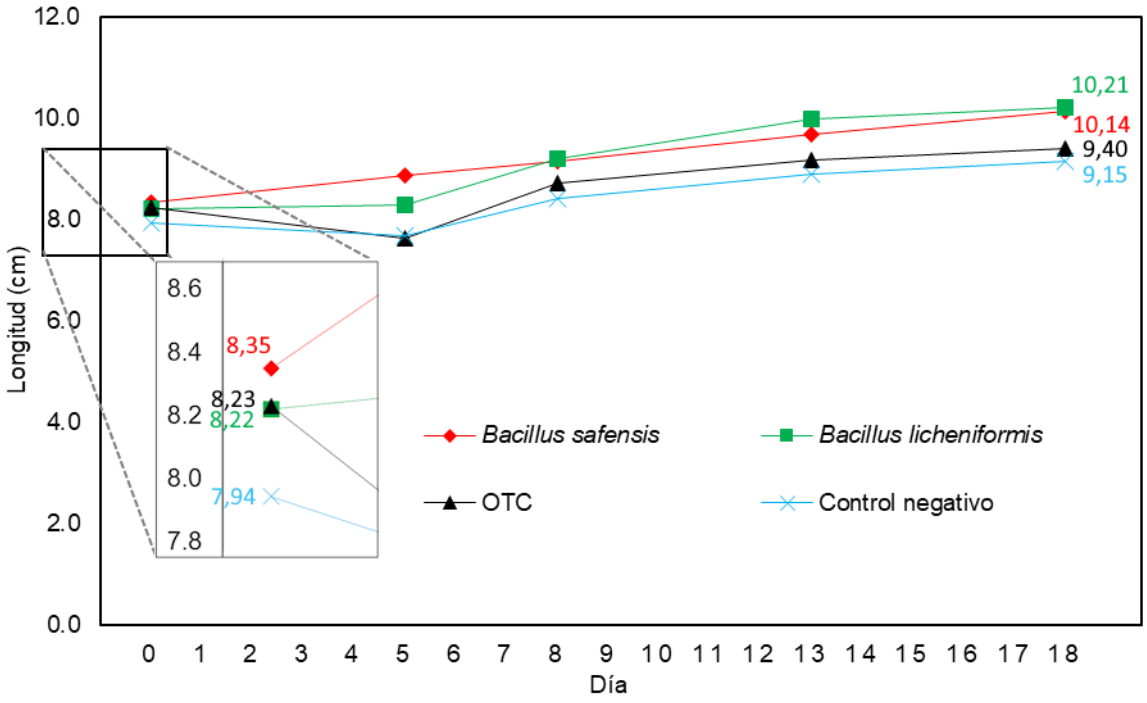
En la figura 2, se observa que en el día cero todos los langostinos de los tratamientos iniciaron con longitudes similares, entre 7,94 cm (control) y 8,35 cm (*B. safensis*). A lo largo del experimento, los tratamientos con probióticos (*B. safensis* y *B. licheniformis*) mostraron una ganancia de longitud ligeramente superior respecto a los tratamientos con OTC y control.

Al día 18, los langostinos tratados con *B. licheniformis* alcanzaron la mayor longitud promedio (10,21 cm), seguidos por *B. safensis* (10,14 cm). En comparación, los grupos tratados con OTC y el control presentaron longitudes menores, con 9,40 cm y 9,15 cm, respectivamente.

La mayor longitud de los langostinos logrados con los tratamientos en los que se aplicó *Bacillus*, se justifica porque estas bacterias probióticas son capaces de ayudar a digerir los alimentos pues según Madhulika et al. (2025), estas bacterias excretan enzimas que ayudan a hidrolizar proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en el alimento.

Figura 2

Longitud promedio de Litopenaeus vannamei infectados y tratados con Bacillus spp. experimentalmente en el primer ensayo.



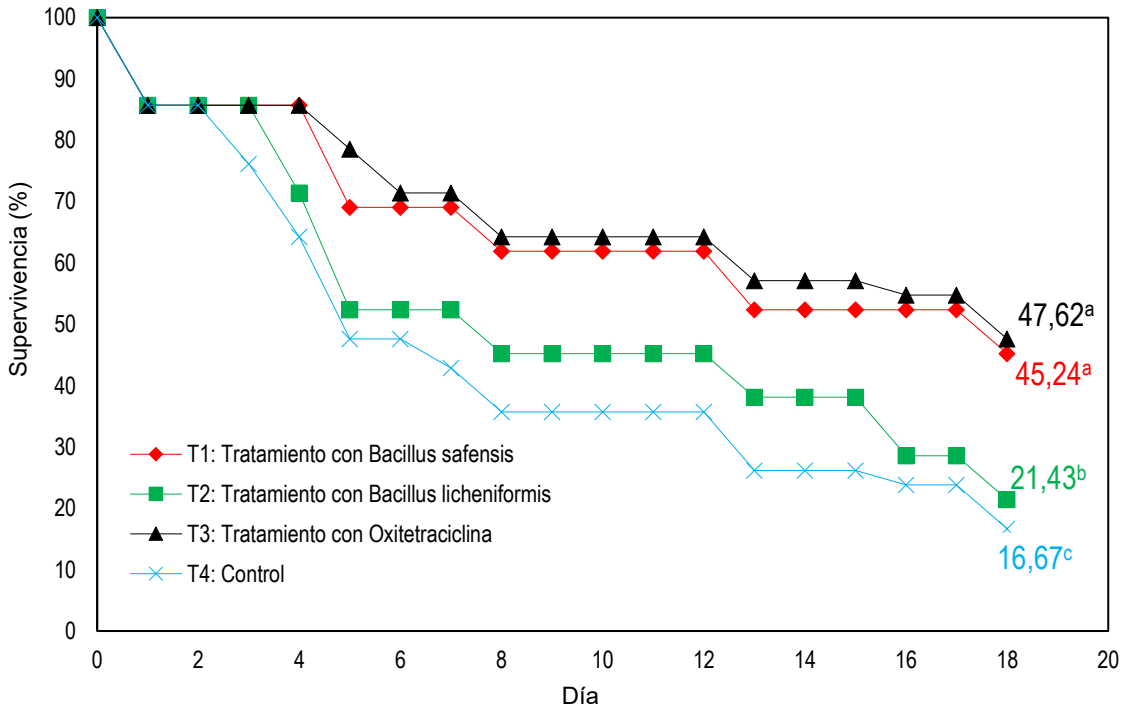
4.4. Supervivencia de langostinos infectados considerando los sacrificados en primer ensayo.

En cada acuario se realizó el sacrificio de seis langostinos: dos al inicio del experimento antes de realizar la infección para conocer la carga basal de *Vibrio* spp., uno posterior a la infección, en el día 5, para confirmar su efectividad. Uno en cada muestreo realizado durante el experimento, en los días 8 y 13, para evaluar la evolución bacteriana, y uno al final, en el día 18, para verificar la carga residual. Por lo tanto, la reducción inicial del porcentaje de supervivencia no debe interpretarse como mortalidad infecciosa, sino como una combinación de bajas programadas y pérdidas reales.

Hacia el día 18, los tratamientos con oxitetraciclina (T3) y *Bacillus safensis* (T1) mostraron las mayores tasas de supervivencia (47,62% y 45,24% respectivamente), seguidos por *Bacillus licheniformis* (T2) con 21,43%, y el grupo control (T4) con 16,67% (Figura 3).

Figura 3

Supervivencia de Litopenaeus vannamei considerando los sacrificados.



Los resultados demuestran que tanto el tratamiento con oxitetraciclina (T3) como con el probiótico *Bacillus safensis* (T1) resultaron en una mejora significativa de la supervivencia de langostinos infectados con *Vibrio* spp., en comparación con el control (T4) y el tratamiento con *Bacillus licheniformis* (T2). La eficacia observada en T1 es similar a la observada en estudios previos que evidenciaron el potencial inmunoestimulante de cepas de *Bacillus* para mejorar la resistencia del langostino frente a patógenos acuáticos (Hu et al., 2023; Kong et al., 2021).

El hecho de que la oxitetraciclina (T3) haya permitido tener a los langostinos una supervivencia similar a T1 indica que, a pesar de que se ha limitado su uso en acuicultura, está todavía tiene un efecto protector notable. Sin embargo, el uso prolongado o indiscriminado de este antibiótico está asociado al desarrollo de resistencia antimicrobiana y efectos adversos en la microbiota intestinal (Panda et

al., 2020; Rebouças et al., 2011), lo que ha impulsado la investigación para encontrar alternativas más sostenibles como los probióticos.

En contraste, el tratamiento con *Bacillus licheniformis* (T2) mostró una supervivencia significativamente menor a las de los tratamientos T1 (*B. safensis*) y T3 (oxitetraciclina), aunque superior al grupo control. Esta diferencia entre cepas del mismo género muestra que no todas ellas son igualmente eficaces en mantener la supervivencia de los langostinos, lo cual se debe a que cada una de ellas posee características específicas para la producción de bacteriocinas, capacidad de colonización e interacción con el sistema inmune del huésped (Niu & Wang, 2019; Cao et al., 2025).

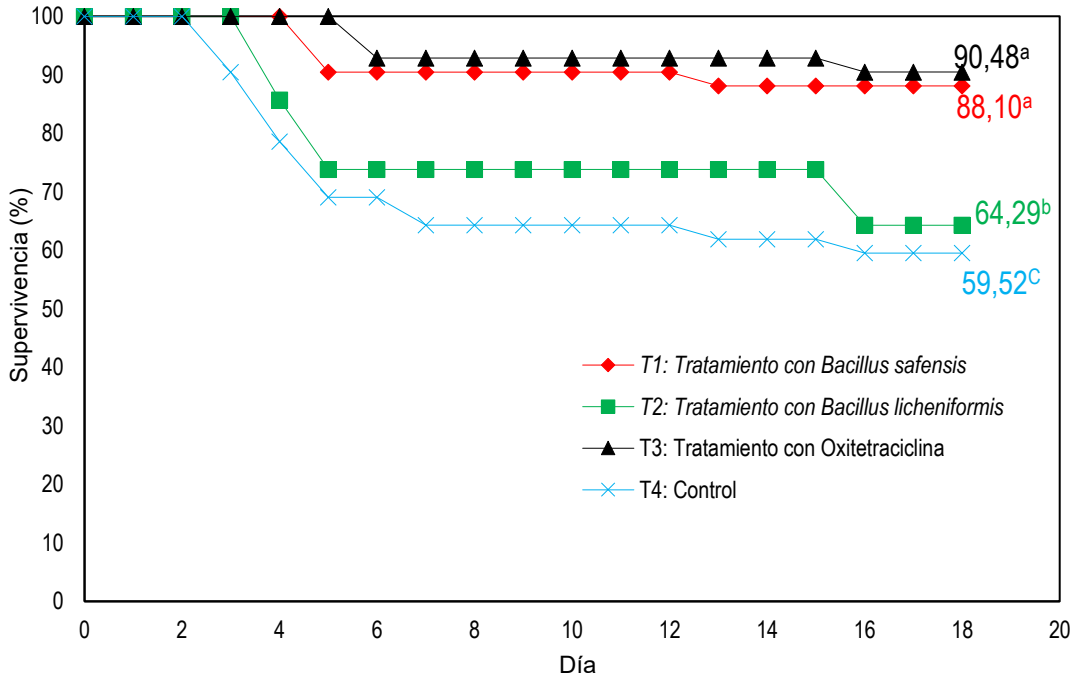
Finalmente, el bajo rendimiento del grupo control (T4) confirma que la infección por *Vibrio* spp. afecta severamente la supervivencia sin intervención terapéutica, lo cual justifica la búsqueda de soluciones preventivas y curativas en el manejo de cultivos de estos organismos.

4.5. Supervivencia de langostinos infectados sin considerar los sacrificados en primer ensayo.

En la figura 4 se muestra la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratados con cepas de *Bacillus*, con oxitetraciclina y sin medicación, sin considerar los ejemplares sacrificados.

Figura 4

Supervivencia de Litopenaeus vannamei sin considerar los sacrificados en primer ensayo.



Como era de esperarse, en la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* sin considerar los sacrificados, el tratamiento con oxitetraciclina fue el que obtuvo el porcentaje promedio más alto en supervivencia (90,48%) esto se debió a que es un antibiótico de alto espectro y que, en los ensayos de resistencia antibiótica, las cepas de *Vibrio* spp. fueron sensibles a este antibiótico lo cual justifica su poder para reducir la carga de *Vibrio* spp. Sin embargo, el tratamiento 1 (*Bacillus safensis*) fue similar al tratamiento con la oxitetraciclina, logrando una supervivencia promedio de 88,10%, esto quiere decir que esta cepa de *Bacillus* tuvo similar poder inhibidor que el de este antibiótico utilizado en el cultivo de langostino, el tratamiento 2 (*Bacillus licheniformis*) mostró una supervivencia promedio de 64,29% y el tratamiento 4 (sin aplicación de *Bacillus* ni oxitetraciclina) mostró una supervivencia promedio menor de 59, 52%, esto era de esperarse al no tener medicación en los 18 días de experimentación. Si bien la oxitetraciclina es eficaz, el uso de *Bacillus safensis* es una posible alternativa que podría reducir el uso de este antibiótico en los cultivos de langostino de la zona, siendo una posible alternativa entre las variadas que se están estudiando para reducir el uso de antibióticos en el cultivo de estos crustáceos, entre dichas

alternativas se hallan el uso de bacteriófagos y extractos vegetales (Marbun et al., 2019).

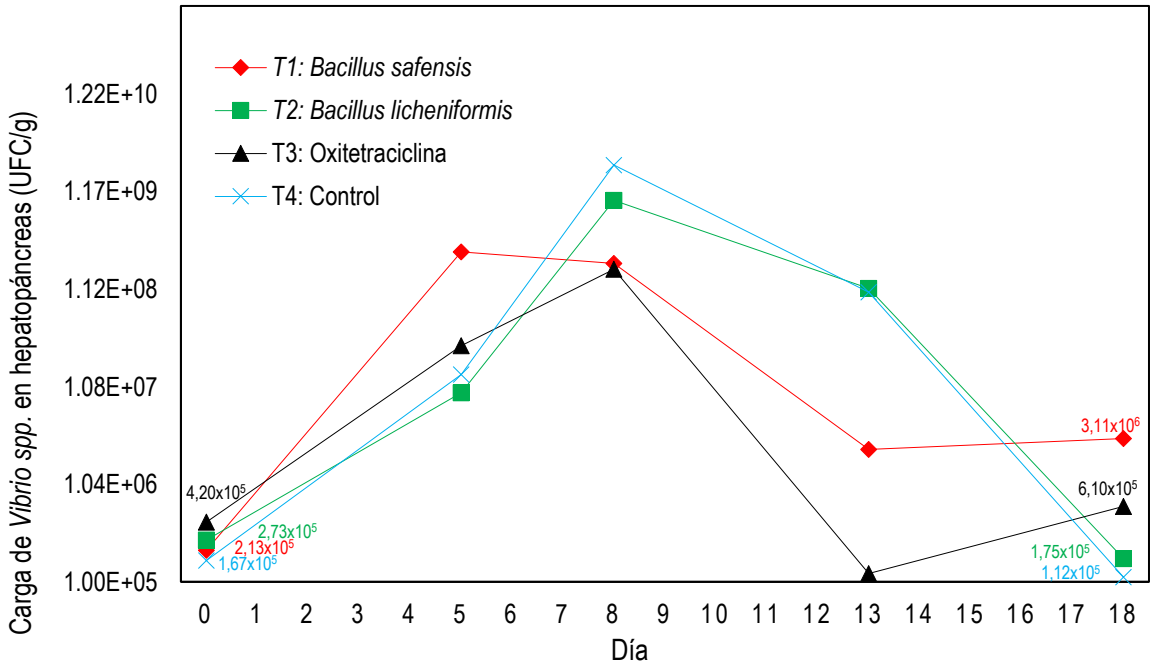
4.6. Carga de *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de *Bacillus* spp. en primer ensayo.

En la figura 5, se muestra la carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos infectados en el primer ensayo.

Se observó que, en el día cero del experimento (previo a la infección inducida), la presencia de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos fue baja, con un nivel aproximado entre 1,67 x 10^5 y 4,20 x 10^5 UFC/g . Sin embargo, después de la infección, la carga bacteriana aumentó considerablemente hasta alcanzar entre 9,32 x 10^6 y 2,74 x 10^8 UFC/g el día cinco y lograr los máximos de carga el día ocho post-infección con valores de 1,80 x 10^8 a 2,20 x10^9 UFC/g. A partir de ese día se notó una disminución progresiva de la concentración de *Vibrio* spp. Los datos detallados de las cargas de *Vibrio* se observan en la tabla 3 del anexo.

Figura 5

Evolución de la carga promedio de Vibrio spp. *en el hepatopáncreas de los langostinos en el primer ensayo.*



La cepa de *Bacillus licheniformis* tuvo la misma eficiencia que la oxitetraciclina para reducir la carga de *Vibrio* spp., estas cepas han demostrado que reducen significativamente la carga de *Vibrio* en los langostinos, lo que mejora su respuesta inmunológica y su salud en general (Li et al., 2007). La cepa de *Bacillus safensis* mostró menor capacidad para reducir la carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos. Las cepas de *B. licheniformis* han mostrado tener un fuerte efecto inhibidor contra patógenos bacterianos en cultivos en diferentes organismos acuáticos por ejemplo Vijayaram et al. (2024) ha hecho una revisión sobre cepas de *Bacillus* que actúan como probióticos en el cultivo de tilapias encontrando que *B. licheniformis* fue capaz de inhibir a *Aeromonas hydrophila* y *Streptococcus agalactiae*, por lo que no es de extrañar que tenga un poder inhibidor bastante fuerte contra *Vibrio*.

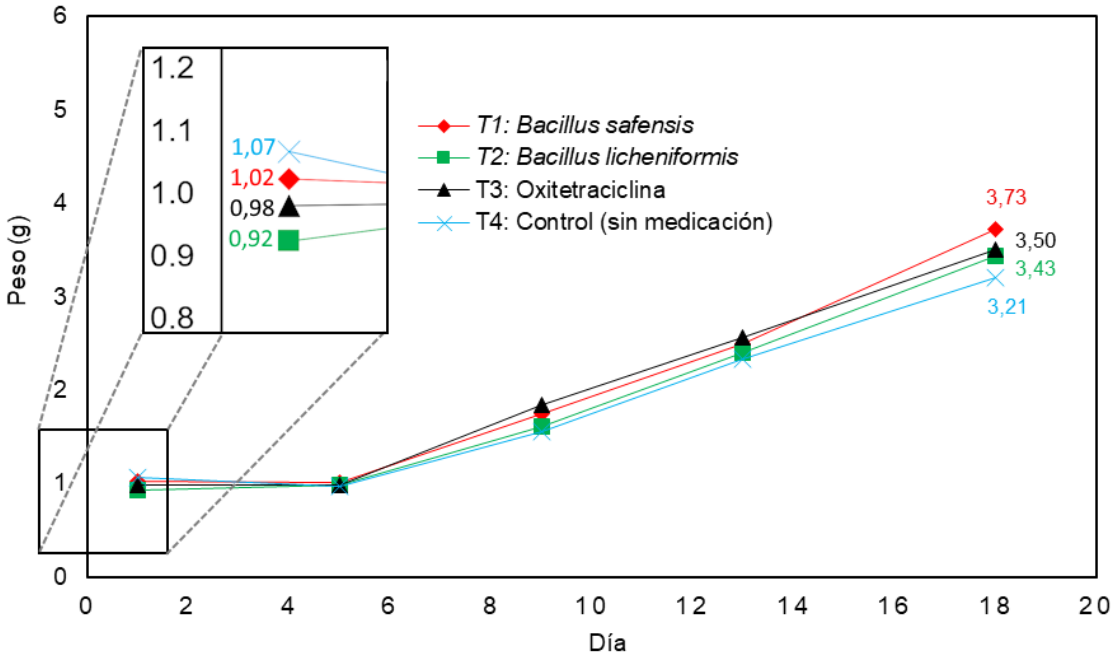
Se apreció de manera notable, que el control negativo en el cual la carga de *Vibrio* spp. se incrementó fuertemente durante el experimento, tuvo una reducción considerable al final del mismo; esto posiblemente, se deba a que en el agua extraída de los canales de marea cercanos al manglar existe una población de bacterias, algunas de las cuales pueden tener propiedades inhibidoras del crecimiento de *Vibrio* como lo han planteado Andriawan et al. (2024).

4.7. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei* con respecto al segundo ensayo.

En la figura 6, se observa una tendencia ascendente en el peso promedio en todos los tratamientos. Sin embargo, los tratamientos con *B. safensis* alcanzaron el mayor peso final con 3,73 g, seguido del tratamiento con oxitetraciclina con 3,50 g, el tratamiento *B. licheniformis* con 3,43 g y el grupo control con 3,21 g. Esto muestra que *B. safensis* ejerce un poder benéfico en el crecimiento de los langostinos.

Figura 6

Peso promedio de Litopenaeus vannamei infectados y tratados con Bacillus spp. correspondiente al segundo ensayo.

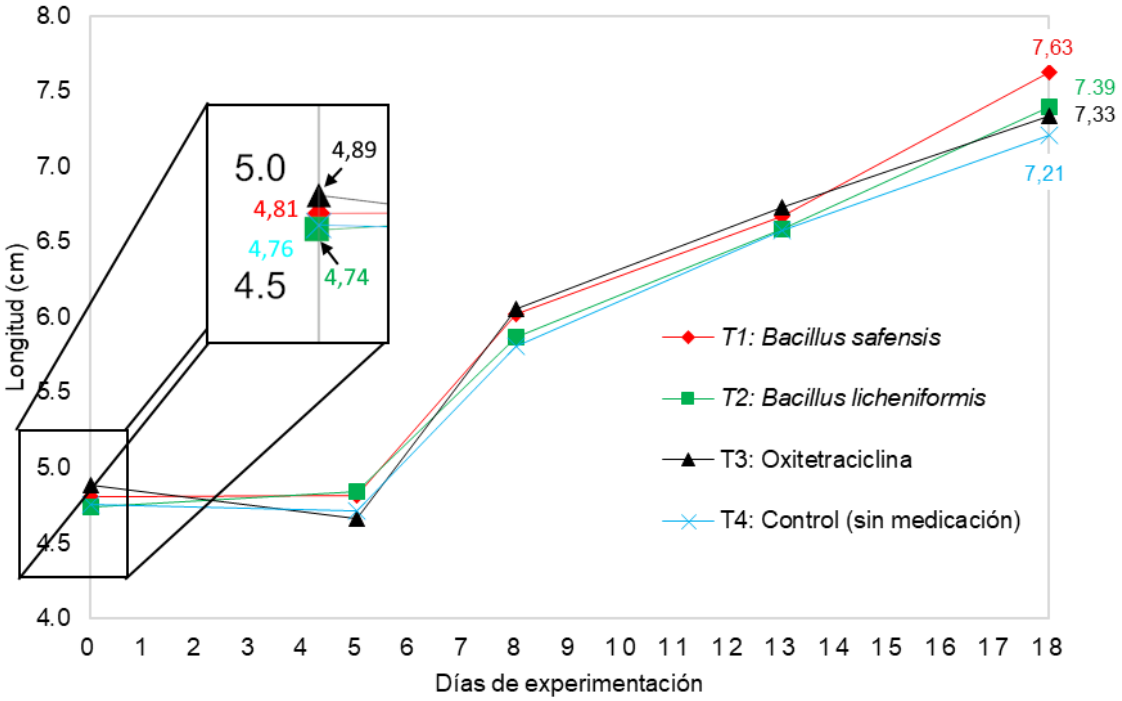


Esto se puede explicar porque *Bacillus safensis* es una especie bacteriana que produce múltiples enzimas tales como: Lipasas, proteasas, amilasas, quitinasas, celulasas, inulinasas, entre otras, muchas de las cuales están siendo utilizadas en la industria como lo han reportado Lateef et al. (2015). Por lo que la cepa *B. safensis* empleada en el experimento pudo haber hidrolizado el alimento, permitiéndole al langostino aprovecharlo mejor y de esta manera lograr un mejor peso.

Por otra parte, en la figura 7, se observa que la longitud de los langostinos infectados en el segundo ensayo fue mayor en el tratamiento con *B. safensis* (7,63 cm), seguido por *B. licheniformis* con 7,39 cm, y luego por los tratamientos con oxitetraciclina (7,33 cm) y control (7,21 cm).

Figura 7

Longitud promedio de Litopenaeus vannamei infectados y tratados con Bacillus spp. *correspondiente al segundo ensayo.*



La mayor longitud lograda por *Bacillus safensis* se justifica porque esta especie ha sido reportada como una importante productora de enzimas capaces de hidrolizar alimentos al sintetizar: Lipasas, proteasas, amilasas, quitinasas entre otras Lateef et al. (2015), por lo que, esta cepa bacteriana pudo favorecer la absorción de nutrientes de langostino proporcionándole un mayor crecimiento tanto en longitud como en peso.

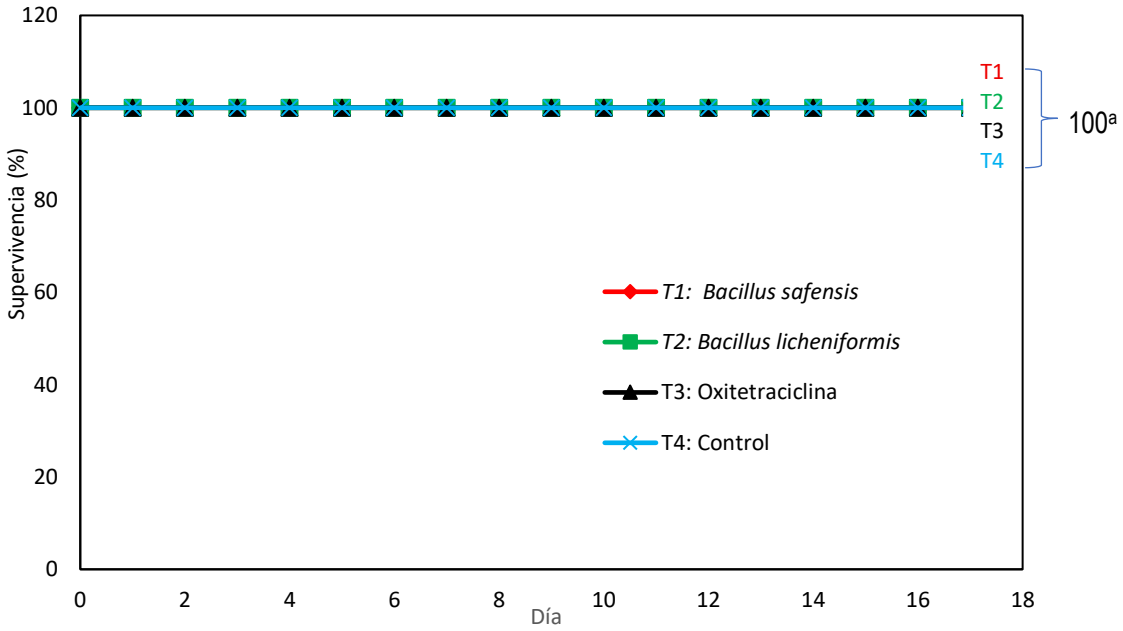
4.8. Supervivencia con respecto al segundo ensayo experimental.

En la figura 8, se observa que la supervivencia de los langostinos en todos los tratamientos se mantuvo en 100% no hubo mortalidad en ninguno. Si bien parecería difícil que langostinos infectados con Vibrio no registraran mortalidades, sin embargo, esto se ha observado en experimentos en laboratorio empleando productos alternativos a los antibióticos, como por ejemplo Gracia-Valenzuela et al. (2014) registró supervivencia del 100% en langostinos tratados con aceite esencial de orégano. De igual manera Tinoco et al. (2023) también registro supervivencia registradas 88 a 94%. Esto se explica porque los extractos

vegetales y los probióticos proporcionan beneficios a la salud de los langostinos al estimular su sistema inmune como lo propone Domínguez-Borbor et al. (2020).

Figura 8

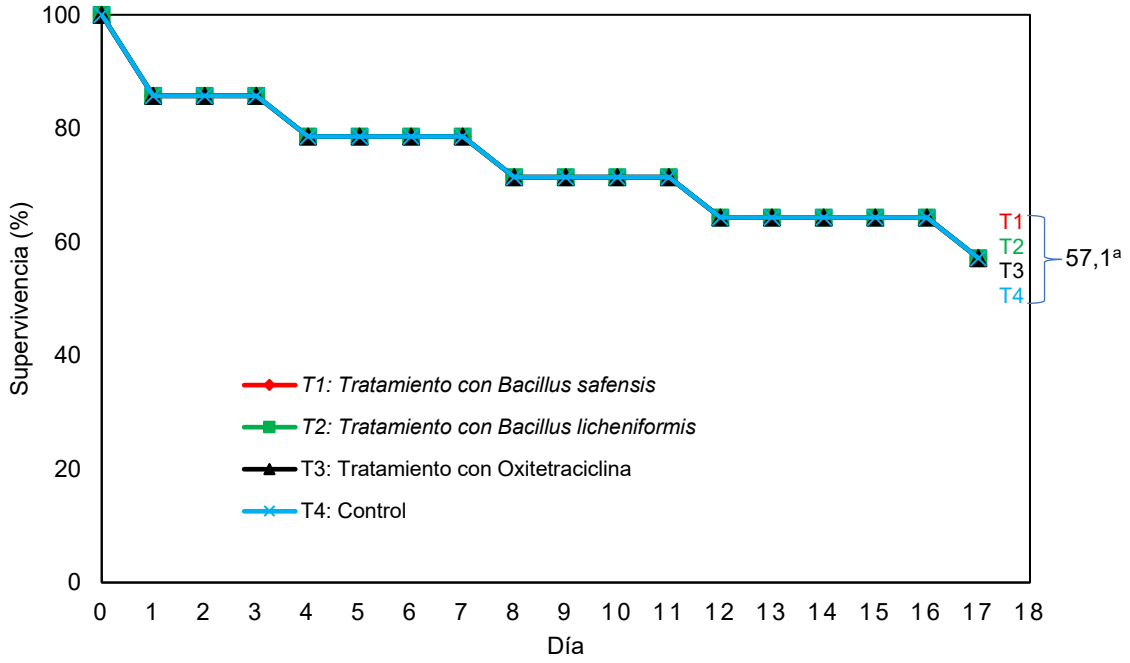
Supervivencia de Litopenaeus vannamei sin considerar los sacrificios correspondientes al segundo ensayo.



En la figura 9, se observa la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* en el segundo ensayo, considerando los sacrificios programados. Dado que en cada tratamiento se sacrificó de manera periódica la misma cantidad de ejemplares, la supervivencia en ellos es exactamente la misma, finalizando a los 17 días con 57,1%.

Figura 9

Supervivencia de Litopenaeus vannamei considerando los sacrificios correspondientes al segundo ensayo.



La supervivencia observada fue la misma para todos los tratamientos incluyendo el tratamiento control, esto se puede atribuir a que el agua empleada para el experimento no fue esterilizada y posiblemente contenía poblaciones de bacterias potencialmente probióticas que lograron reducir la carga de *Vibrio* en los langostinos infectados, como se observa en la figura 5. Con lo cual al reducir la carga se elimina la posibilidad de mortalidad por *Vibrio*; este argumento también ha sido propuesto por Andriawan et al. (2024), para justificar reducciones de bacterias por poblaciones naturales potencialmente probióticas.

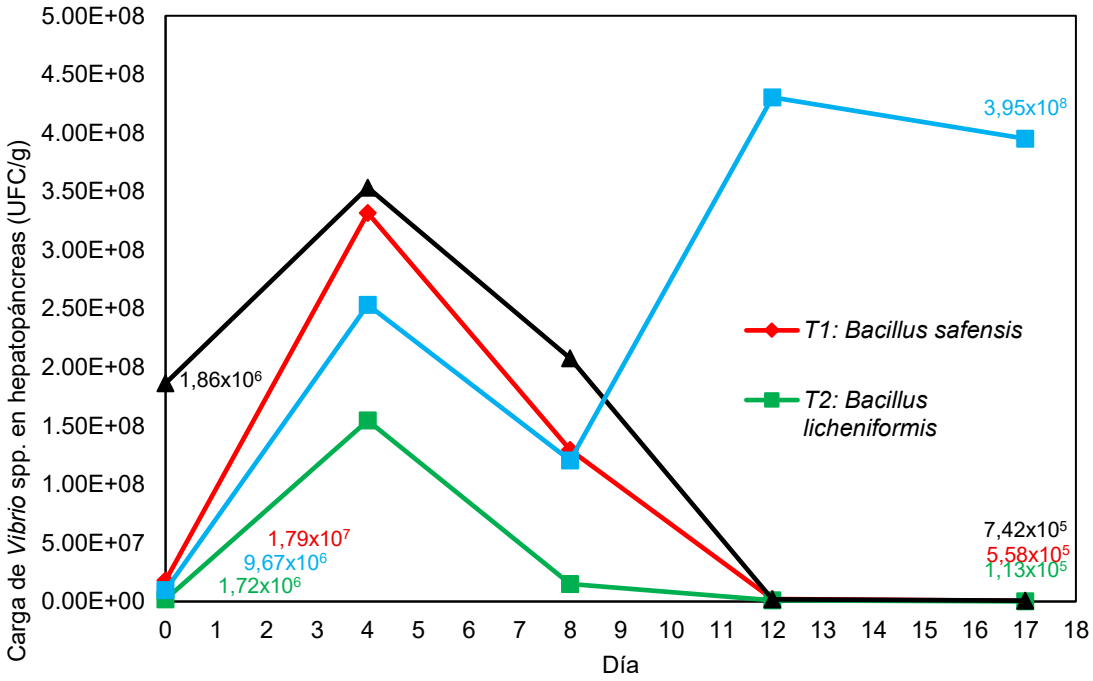
4.9. Carga de *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de *Bacillus* spp. en el segundo ensayo.

Como se observa, la carga de *Vibrio* al inicio del experimento fue bastante similar entre los langostinos asignados a los diferentes tratamientos, variando entre $1{,}72 \times 10^6$ y $1{,}79 \times 10^7$ UFC/g; con la excepción, de los langostinos asignados al tratamiento en el que se aplicaría la oxitetraciclina, que tuvieron una carga más alta con $1{,}86 \times 10^6$ UFC/g. La carga de *Vibrio* se incrementó hacia el día 4, indicando que la infección experimental realizada en el día 0 fue exitosa, de igual manera la apariencia de los langostinos mostró aparentes signos de infección con

cromatóforos extendidos que les dio una coloración rojiza (figura 15 A del anexo). Asimismo se observa que posteriormente la carga de *Vibrio* se redujo en todos los tratamientos que recibieron ya sea las cepas de *Bacillus* o la oxitetraciclina, llegando en el día 12 a valores menores a los iniciales, manteniéndose en los mismos hasta el final del experimento, momento en el que registraron valores entre 1,13 y 7,42 x10^5 UFC/g. Esto evidenció su poder inhibidor contra *Vibrio*. De igual manera, la apariencia de los langostinos mejoró mostrando una coloración corporal normal (figura 15 B del anexo). Por otra parte, el tratamiento control, en el que no se aplicó ninguna medicación, la carga se incrementó y culminó al final del experimento con un valor de 3,95x10^8 UFC/g, que fue alrededor de 500 a 1000 veces mayor a la de los otros tratamientos. Los datos detallados de las cargas de *Vibrio* en el hepatopáncreas se hallan en la tabla 4 del anexo.

Figura 10

Carga de Vibrio spp. en el hepatopáncreas de langostinos en el segundo ensayo



Ambas cepas de *Bacillus* mostraron similar poder supresor de *Vibrio,* en el hepatopáncreas, que la oxitetraciclina. Esto confirmó el poder probiótico de *B. safensis* y *B. licheniformis* contra *Vibrio*; efecto que ha sido confirmado previamente para otras cepas de las mismas especies de *Bacillus* por Li et al. (2007) y Vijayaram et al. (2024).

V. CONCLUSIONES

1. En el primer ensayo de infección, las cepas de *Bacillus* (*B. safensis* y *B. licheniformis*) lograron el mayor peso de los langostinos con 7,47 y 7,37 g respectivamente y la mayor longitud de los mismos con 10,14 y 10,21 cm respectivamente indicando un mayor crecimiento logrado con estas cepas probióticas.
2. En el primer ensayo de infección, la cepa de *Bacillus safensis* logro igualar la supervivencia lograda con la oxitetraciclina (45,24% frente a 47,62%). En tanto que la cepa de *B. licheniformis* logro menor supervivencia (21,43%) solo pudiendo superar al tratamiento control.
3. En el primer ensayo, la cepa de *B. licheniformis* fue capaz de reducir la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas de los langostinos a niveles similares a los logrados con los de la oxitetraciclina. Sin embargo, *B. safensis* tuvo menor desempeño.
4. En el segundo ensayo, la cepa de B*. safensis* permitió que el langostino alcance un mayor peso y longitud con 3,73 g y 7,63 cm respectivamente, mientras que, la cepa de *B. licheniformis* logró un peso y longitud ligeramente menor con 3,43 g y 7,39 cm respectivamente.
5. En el segundo ensayo, ambas cepas de *Bacillus* lograron mantener la supervivencia de langostinos al 100%, sin embargo, los otros dos tratamientos (oxitetraciclina y control), también mantuvieron la misma supervivencia.
6. La carga de *Vibrio,* en el hepatopáncreas de los langostinos, en el segundo ensayo se redujo en los tratamientos en que se aplicó *Bacillus* y la oxitetraciclina a niveles inferiores a los registrados antes de iniciar el experimento, evidenciando el poder probiótico de ambas cepas de *Bacillus.*

VI. RECOMENDACIONES

1. Combinar las cepas de *Bacillus safensis* y *Bacillus licheniformis* en un solo tratamiento, para poder mejorar su efecto puesto que se ha observado en esta investigación que *B. safensis* tiene excelentes propiedades para mejorar el crecimiento del langostino y *B. licheniformis* para reducir la carga de *Vibrio* en el hepatopáncreas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, L. S. (2014). *Determinar la resistencia antimicrobiana de las enterobacterias y el uso de antibióticos en pacientes de UCI de la Clínica D.A.M.E. 2014* [Tesis de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Superior Politécnica del Chimborazo]. http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/3890/1/56T00499%20UDCTFC.pdf

Albuquerque, R., Araújo, R. L., Souza, O. V., & Vieira, R. (2015). Antibiotic-resistant vibrios in farmed shrimp. BioMed Research International, 2015 (505914), 1-5. https://doi.org/10.1155/2015/505914

Andriawan, S., Wahyudi, Moh. I., Hasana, I., Trisdayanti, I., & Taqwa, B. A. (2024). Vibriosis control in vannamei shrimp: Intestinal and mangrove-derived bacteriophages. *BIO Web of Conferences*, 143 (02007),1-13. https://doi.org/10.1051/bioconf/202414302007

Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639

Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004

Flegel, T. W., Lightner, D. V., Lo, C. F., & Owens, L. (2008). Shrimp disease control: Past, present and future. In M. G. Bondad-Reantaso, C. V. Mohan, M. Crumlish, & R. P. Subasinghe (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture VI* (pp. 355-378). Asian Fisheries Society. http://www.fhs-afs.net/daa_vi_files/27.pdf

Gobi, N., Malaikozhundan, B., Sekar, V., Shanthi, S., Vaseeharan, B., Jayakumar, R., & Khudus, A. (2016). GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2 infection and the protective effects of the probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 on the growth, immune and antioxidant responses in *Pangasius hypophthalmus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 52, 230-238. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.006

González, R., Vidal, M. M., & Pimienta, I. (2021). Uso intensivo de antibióticos profilácticos en la acuicultura: Un problema creciente para la salud humana y animal. *Universidad y Sociedad*, 13(S2), 204-210.

González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4(2), 1-8. https://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2003/spn032g.pdf

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), 1367-1370. https://doi.org/10.2298/ABS1404367G

Harpeni, E., Santoso, L., Supono, S., Wardiyanto, W., Widodo, A., & Yolanda, L. (2018). Effects of dietary probiotic *Bacillus* sp. D2.2 and prebiotic sweet potato extract on growth performance and resistance to *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultura Indonesiana*, 18(2), 55-61. https://doi.org/10.21534/ai.v18i2.107

Javadi, A., & Khatibi, S. A. (2017). Effect of commercial probiotic (Protexin®) on growth, survival and microbial quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Nutrition & Food Science*, 47(2), 204-216. https://doi.org/10.1108/NFS-07-2016-0085

Jayaseelan, B., Vaseeharan, B., Maharajan, A., Shanthi, S., & Vinoj, G. (2013). Vibriostatic effects of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and its

molecular phylogeny resolved through RAPD markers. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1601-1609. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0623-z

Jeyasanta, K. I., Lilly, T., & Patterson, J. (2017). Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistants. *Asian Journal of Applied Science and Technology*, 1(8), 100-111. http://ajast.net/data/uploads/1122.pdf

Krishnani, K. K., Kathiravan, V., Shakil, N. A., Singh, M. K., Brahmane, M. P., Meena, K. K., Sarkar, B., Choudhary, K., Singh, M. K., & Kumar, J. (2015). Bactericidal activity of nanopolymers against shrimp pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(4), 1079-1086. https://doi.org/10.1007/s40011-015-0517-x

Lateef, A., Adelere, I. A., & Gueguim-Kana, E. B. (2015). The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia*, 70(4), 411-419. https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0062

Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Canstanza, L., & Sánchez, L. C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista Nova*, 9(16), 177-187. https://
doi.org/10.22490/24629448.501

Letchumanan, V., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* species. *Frontiers in Microbiology*, 6 (735):1-8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00735

Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., & Hong, H. (2007). Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnology Letters*, 29(4), 525-530. https://doi.org/10.1007/s10529-006-9291-4

Lin, H., Yu, M., Wang, X., & Zhang, X.-H. (2018). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of vibrios. *BMC Genomics*, 19(1), 135. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4531-2

Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., & Liu, C.-H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 837-844. https://doi.org/10.1016/j.
fsi.2010.01.012

Lomelí, C. O. (2011). *La fagoterapia como estrategia para reducir la mortalidad por vibriosis en larvas de camarón blanco Litopenaeus vannamei* [Tesis de Maestro en Recursos Marinos, Instituto Politécnico Nacional de México]. http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/15452

Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Gomez-Gil, B., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. I., Audelo-Naranjo, J. M., & Zamudio-Armenta, O. O. (2015). Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(4), 766-775. https://doi.org/10.3856/vol43-issue4-fulltext-15

Madhulika, Ngasotter, S., Meitei, M. M., Kara, T., Meinam, M., Sharma, S., Rathod, S. K., Singh, S. B., Singh, S. K., & Bhat, R. A. H. (2025). Multifaceted role of probiotics in enhancing health and growth of aquatic animals: Mechanisms, benefits, and applications in sustainable aquaculture—A review and bibliometric analysis. *Aquaculture Nutrition*, 2025(1), 5746972. https://doi.org/10.1155/anu/5746972

Marbun, J., Harpeni, E., & Wardiyanto, W. (2019). Penanganan penyakit white feces pada udang vaname *Litopenaeus vannamei* menggunakan aplikasi pakan yang dicampur ekstrak lengkuas merah Alpinia purpurata k. *Schum. Depik*, 8(2), 76-86. https://doi.org/10.13170/depik.8.2.13570

Martínez, C. (2018). *Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. https://docta.ucm.es/bitstreams/3916c8f1-50f2-4826-9871-4e7cb62c8636/download

Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress?. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(2), 158-178. https://panamjas.org/pdf_artigos/panamjas_4%282%29_158-178.pdf

Millanao B, A., Barrientos H, M., Gómez C, C., Tomova, A., Buschmann, A., Dölz, H., & Cabello, F. C. (2011). Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. *Revista Médica de Chile*, 139(1), 107-118. https://doi.org/10.4067/S0034-98872011000100015

Morales-Covarrubias, M. S. (2008). Enfermedades bacterianas. En V. Morales & J. Cuéllar-Anjel (Eds.), *Enfermedades bacterianas Guía técnica—Patología e inmunología de camarones penaeidos* (1ra ed., pp. 117-134). Programa CYTED Red II-D Vannamei. http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf

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

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

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

Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146. https://doi.org/10.1111/raq.12033

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

Quispe, W. R. (2017). *Aislamiento de Lactobacillus sp.de "trucha arco iris" Oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a Yersinia ruckeri en Puno* [Tesis de Licenciado en Biología, Universidad Nacional del Altiplano]. http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe_Gallegos_Wilson_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Rebouças, R., De Sousa, O., Sousa Lima, A., Vasconcelos, F., Barroso, P., & Silva, R. H. (2011). Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. *Environmental Research,* 111(1), 21-24. https://doi.org/10.1016/j.
envres.2010.09.012

Rodríguez, A. (2017). *Probióticos en la producción piscícola* [Tesis de Especialista en Biotecnología Agraria, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. http://repository.unad.edu.co:8080/bitstream/10596/13466/1/1075539267
.pdf

Santiago, M. L. S., Espinosa, A. E., & Bermúdez, M. del C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32. http://www.redalyc.org/pdf/579/57912963005.pdf

Santos, A. (2017). I*mportancia de los plásmidos ColE1 en la resistencia a antibióticos* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. http://eprints.ucm.es/44191/1/T39064.pdf

Serrano, L. V. (2014). *Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida* [Tesis de Ingeniero en Acuicultura, Escuela Politécnica del Litoral]. http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25086/1/Tesis%20Lizette%20Serrano.pdf

Shakerian, A., Barton, M. D., Akinbowale, O. L., & Khamesipour, F. (2018). Antimicrobial resistance profile and resistance genes of *Vibrio* species isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) raised in Iran. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68(1), 79. https://doi.org/10.12681/jhvms.15566

Stalin, N., & Srinivasan, P. (2016). Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Microbial Pathogenesis*, 97, 110-118. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.021

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), 9-26. https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2023.52.1.1156

Vijayaram, S., Chou, C.-C., Razafindralambo, H., Ghafarifarsani, H., Divsalar, E., & Doan, H. V. (2024). *Bacillus* sp. as potential probiotics for use in tilapia fish farming aquaculture – A review. *Annals of Animal Science*, 24(4), 995-1006. https://doi.org/10.2478/aoas-2024-0031

Villamil, L., & Martínez-Silva, M. A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38(2), 165-187.

Watts, J., Schreier, H., Lanska, L., & Hale, M. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6), 158. https://doi.org/10.3390/md15060158

Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X.-H. (2016). Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 451, 163-169. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.
2015.09.020

Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., & Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 683-689. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027

ANEXOS

Anexo 1.

Carga de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de langostinos en el primer y segundo ensayo.

Tabla 3

Carga de Vibrio spp*. en hepatopáncreas de Litopenaeus vannamei correspondiente al primer ensayo*

	Tratamiento			
Día	*Bacillus safensis*	*Bacillus licheniformis*	Oxitetraciclina	Control negativo
0	$2{,}13x10^{5}\pm1{,}30x10^{5}$	$2{,}73x10^{5}\pm1{,}01x10^{5}$	$4{,}20x10^{5}$*	$1{,}67x10^{5}\pm1{,}70x10^{5}$
5	$2{,}74x10^{8}\pm4{,}73x10^{8}$	$9{,}32x10^{6}\pm1{,}38x10^{7}$	$2{,}89x10^{7}\pm2{,}26x10^{7}$	$1{,}45x10^{7}\pm1{,}25x10^{7}$
8	$2{,}08x10^{8}\pm2{,}90x10^{8}$	$9{,}42x10^{8}\pm1{,}35x10^{9}$	$1{,}80x10^{8}\pm3{,}11x10^{8}$	$2{,}20x10^{9}\pm2{,}83x10^{9}$
13	$2{,}40x10^{6}$*	$1{,}14x10^{8}\pm1{,}96x10^{8}$	$1{,}22x10^{5}\pm3{,}68x10^{4}$	$1{,}04x10^{8}\pm1{,}47x10^{8}$
18	$3{,}11x10^{6}\pm5{,}27x10^{6}$	$1{,}75x10^{5}\pm1{,}49x10^{5}$	$6{,}10x10^{5}\pm2{,}12x10^{5}$	$1{,}12x10^{5}\pm2{,}55x10^{4}$

* No se pudo obtener la desviación estándar, pues se tuvo solo el dato del crecimiento de un solo ejemplar, en las otras dos muestras no hubo crecimiento.

Tabla 4

Carga de Vibrio spp*. en hepatopáncreas de Litopenaeus vannamei correspondiente al segundo ensayo*

	Tratamiento			
Día	*Bacillus safensis*	*Bacillus licheniformis*	Oxitetraciclina	Control negativo
0	$1{,}79X10^{7}\pm2{,}91X10^{7}$	$1{,}72X10^{6}\pm1{,}72X10^{6}$	$1{,}86X10^{8}\pm2{,}40X10^{8}$	$9{,}67X10^{6}\pm8{,}50X10^{6}$
4	$3{,}32X10^{8}\pm9{,}45X10^{7}$	$1{,}54X10^{8}\pm1{,}54X10^{8}$	$3{,}53X10^{8}\pm9{,}57X10^{7}$	$2{,}53X10^{8}\pm1{,}80X10^{8}$
8	$1{,}29X10^{8}\pm3{,}00X10^{7}$	$1{,}51X10^{7}\pm1{,}51X10^{7}$	$2{,}08X10^{8}\pm3{,}96X10^{7}$	$1{,}20X10^{8}\pm6{,}72X10^{7}$
12	$2{,}18X10^{6}\pm1{,}60X10^{6}$	$9{,}80X10^{5}\pm9{,}80X10^{5}$	$1{,}77X10^{6}\pm4{,}75X10^{5}$	$4{,}30X10^{8}\pm3{,}68X10^{8}$
17	$5{,}58X10^{5}\pm1{,}68X10^{5}$	$1{,}13X10^{5}\pm1{,}13X10^{5}$	$7{,}42X10^{5}\pm2{,}67X10^{5}$	$3{,}95X10^{8}\pm5{,}15X10^{8}$

Anexo 2.

Fotografías de la ejecución de la tesis

Figura 11

Llegada de los langostinos al laboratorio. A) Langostinos en bolsa de transporte. B) Suministro de aire a las bolsas mediante aireador

Figura 12

Disposición de los acuarios en el ensayo experimental

Figura 13

Extracción de hepatopáncreas de langostinos y siembra en medio TCBS. A) Extracción de hepatopáncreas. B) Siembra en medio TCBS

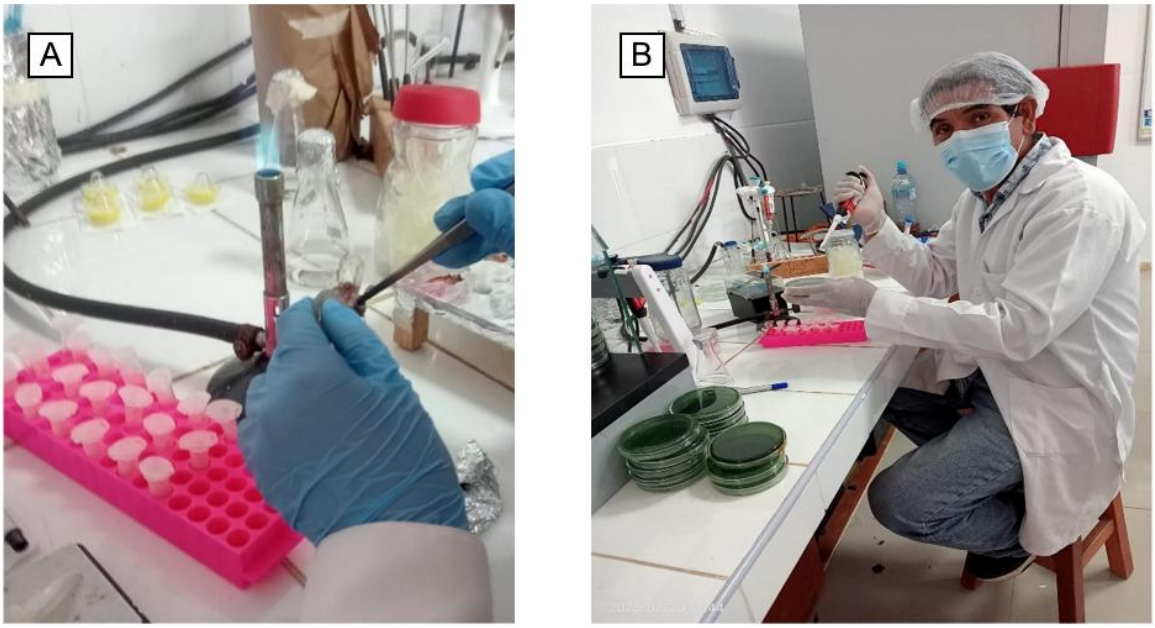


Figura 14

Colonias de Vibrio en TCBS. A) Colonias amarillas (no fermentadoras de sucrosa). B) Colonias verdes(no fermentadoras de sucrosa).

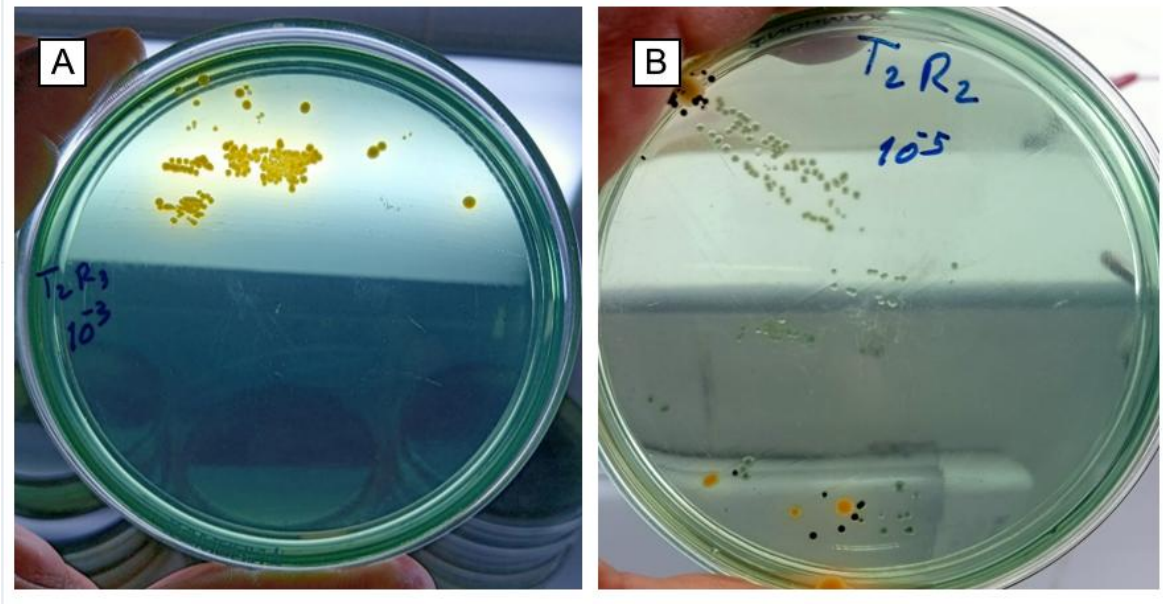
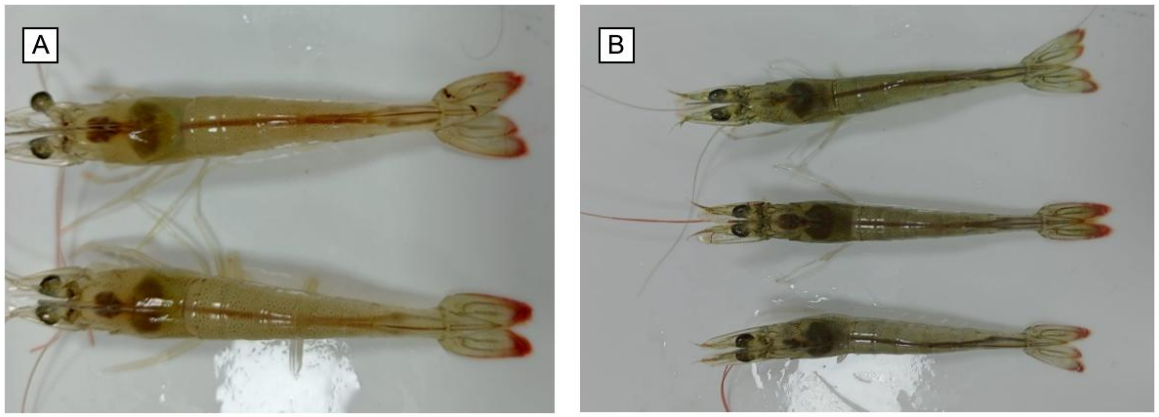


Figura 15

Características externas de los langostinos en el ensayo experimental. A) Langostinos infectados con coloración rojiza del cuerpo. B) Langostinos al final del ensayo, con coloración normal.