

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



**Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos**

TESIS

Para optar el título de Ingeniero Pesquero

Br. Vicsy Yanet Tinoco Elizalde

TUMBES, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR



Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos

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

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Vicsy Yanet Tinoco Elizalde

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

Dr. Alberto Ordinola Zapata

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

Dra. Tessy Peralta Ortiz

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

TUMBES, 2020

TUMBES, 2020

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



**Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos**

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

Br. Vicsy Yanet Tinoco Elizalde

AUTORA

Dr. Alberto Ordinola Zapata

ASESOR

TUMBES, 2021

**DEDICATORIA**



“AÑO DE LA UNIVERSALIZACION DE LA SALUD”

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En la localidad de Tumbes, a los dos días del mes de octubre del dos mil veinte, siendo las diecinueve horas, y en forma virtual, a través de la plataforma Zoom, cuyo link es <https://us02web.zoom.us/j/83977805168>, indicado por el Jurado Calificador de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, constituido por **Resolución N° 0004-2018/UNTUMBES-FIPCM-D, del 17 de mayo de 2018**, el Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, (Presidente), Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra, (Secretario) y la Dra. Tessy Peralta Ortiz, (Vocal), se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: **Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio Spp.* resistentes y sensibles a antibióticos**, para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO, presentado por la:

**Br. VICSY YANET TINOCO ELIZALDE**

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte de la sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 23 del Reglamento General de Grados y Títulos, declara a la:

**Br. VICSY YANET TINOCO ELIZALDE *Aprobada con calificativo de Regular***

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

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

Siendo las veinte horas del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, en forma virtual, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, dos de octubre del dos mil veinte.

**Dr. Auberto Hidalgo Mogollón**  
Presidente

**Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra**  
Secretario

**Dra. Tessy Peralta Ortiz**  
Vocal

c.c.:

- Jurado (03)
- Asesor: Mg. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA.
- Interesada.
- Archivo Decanato.
- DESY/Decano.
- Argentina B.

En primer lugar, doy gracias a Dios por ser quien guía mi camino enseñándome nuevas lecciones de vida cada día, por guiar mis pasos, motivar mi corazón y propiciar lucidez en mis pensamientos e ideas, pues gracias a Él, he logrado hallar las mejores personas que me han apoyado incondicionalmente durante mis estudios.

A mis hijos, Lhan Ypanaque Tinoco, Matt Ypanaque Tinoco y Arlet Ypanaque Tinoco, por brindarme su amor incondicional ellos son mi razón y mis motivos para superarme, esforzarme cada día.

A mi padres: Jesús Tinoco Vincés y Yessica Elizalde Oyola; a mi pareja: Leonardo Ypanaque Tinedo, y mi tía: Rosario Elizalde Oyola, por apoyarme a pesar de las adversidades a las que me enfrenté en el transcurso de mi carrera profesional.

## AGRADECIMIENTO

Expreso mi profundo reconocimiento a todas las personas que hicieron posible realizar esta investigación, en especial a todos aquellos que creyeron en mí y me dieron su respaldo y apoyaron incondicionalmente en esta investigación y me brindaron sus conocimientos y enseñanzas

Mi sincero agradecimiento a:

- ❖ A mi asesor Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su apoyo en la concepción del proyecto, ejecución y redacción de la presente tesis, así como por haberme dado la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto, amistad y valiosas sugerencias fundamentales para la concreción de este trabajo
- ❖ A los distinguidos integrantes de mi jurado: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón (Presidente), Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra (Secretario) y Dra. Tessy Peralta Ortiz (Vocal), por sus oportunos aportes y correcciones para perfeccionar tanto el proyecto como el informe final de tesis
- ❖ Un agradecimiento especial a la Dra. Tessy Peralta Ortiz, quien más allá de su labor de miembro del Jurado, me brindó su tiempo y experiencia que ayudaron a lograr algunos de los objetivos de mi tesis.
- ❖ A los maestros de mi *Alma Mater*, la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, por inculcar en mí todo su saber, valores y experiencias durante el lapso de mi formación profesional.

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen .....	xi
Abstract.....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1. Uso de antibióticos en acuicultura .....	15
2.2. <i>Vibrio</i> spp.....	16
2.3. Resistencia a antibióticos en <i>Vibrio</i> spp. ....	17
2.4. Probióticos .....	18
2.5. Bacterias ácido lácticas como probióticos .....	19
2.6. Investigaciones relacionadas al uso de bacterias ácido lácticas como probióticos en acuicultura .....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
3.1. Material y equipo.....	22
3.2. Métodos .....	24
3.2.1. Preparación de insumos y materiales para la siembra bacteriana.....	24
3.2.2. Recolección de langostinos.....	24
3.2.3. Obtención de muestras de tejidos para el cultivo bacteriano.....	25
3.2.4. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL).....	25
3.2.5. Aislamiento de cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	25
3.2.6. Purificación de cepas bacterianas .....	26
3.2.7. Conservación de cepas bacterianas.....	26
3.2.8. Aislamiento de cepas de <i>Vibrio</i> spp. resistentes a antibióticos.....	27
3.2.9. Evaluación del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de bacterias ácido láctico	28
3.2.10. Evaluación del efecto inhibitorio <i>in vivo</i> de bacterias ácido lácticas	29
3.2.11. Análisis estadístico .....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Peso y talla de los langostinos recolectados.....	32
4.2. Cepas de <i>Vibrio</i> spp. y bacterias ácido lácticas aisladas de langostino .....	32
4.3. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> spp.....	33
4.4. Diámetro de halos de inhibición de bacterias ácido lácticas en <i>Vibrio</i> spp. .....	35

4.5.	Supervivencia de langostinos infectados con <i>Vibrio</i> spp. y tratados con cepas de bacterias ácido lácticas. ....	36
4.6.	Recuento de colonias de <i>Vibrio</i> spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de bacterias ácido lácticas. ....	39
V.	CONCLUSIONES .....	41
VI.	RECOMENDACIONES .....	42
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Antibióticos a utilizar en el ensayo de resistencia a antibióticos .....	27
Tabla 2. Puntos de corte para la determinación de la sensibilidad a antibióticos en <i>Vibrio</i> .....	28
Tabla 3. Peso y talla (Media±DE) de los langostinos recolectados según muestreo ....	32
Tabla 4. Cepas de <i>Vibrio</i> spp. y bacterias ácido lácticas aisladas de langostino. ....	32
Tabla 5. Diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) a antibióticos de las cepas de <i>Vibrio</i> spp. aisladas. ....	33
Tabla 6. Sensibilidad antibiótica de las cepas de <i>Vibrio</i> spp .....	34
Tabla 7. Diámetro promedio (mm) de los halos en el ensayo de inhibición de <i>Vibrio</i> spp. con sobrenadante y cultivo puro de las bacterias ácido lácticas: C1L, C2L y C3L.....	35
Tabla 8. Diámetro promedio (mm) de los halos en el ensayo de inhibición de <i>Vibrio</i> spp. con sobrenadante y cultivo puro de las bacterias ácido lácticas: C4L, F1L y F2L.....	36
Tabla 9. Diámetro promedio (mm) de los halos en el ensayo de inhibición de <i>Vibrio</i> spp. con sobrenadante y cultivo puro de las bacterias ácido lácticas: F3L, F4L y F5L .....	36
Tabla 10. Supervivencia (%) (Media±DE) de langostinos según tratamiento en el ensayo <i>in vivo</i> .....	38
Tabla 11. Recuento de <i>Vibrio</i> spp. en hepatopáncreas de langostinos durante el ensayo <i>in</i> <i>vivo</i> .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Supervivencia de langostinos en experimentación según tratamiento, no considerando la mortalidad por los muestreos .....	37
Figura 2. Supervivencia de langostinos en experimentación según tratamiento, considerando la mortalidad por los muestreos.....	38

**Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos.**

Br. Vicsy Yanet Tinoco Elizalde<sup>1</sup>  
Dr. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

**RESUMEN**

Esta investigación tuvo como objetivo determinar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos. Para ello se obtuvieron langostinos de cultivo de tres localidades de la región de Tumbes (Puerto Pizarro, Tumbes y Zorritos); de éstos se aislaron nueve cepas bacterianas, tanto de *Vibrio* spp. como de bacterias ácido lácticas. Se evaluó la resistencia de *Vibrio* spp. contra 10 antibióticos para luego evaluar *in vitro* el efecto inhibitor de las cepas ácido lácticas contra ellos; se seleccionó dos de las cepas ácido lácticas que mostraron mayor efecto inhibitor. en el ensayo *in vitro* y se usaron en el ensayo *in vivo*, en el cual se colocaron 13 juveniles de langostino/acuario en nueve acuarios de 70 litros, éstos fueron infectados con un *pool* de cuatro cepas de *Vibrio* spp., y tratados con alimento suplementado con las cepas ácido lácticas seleccionadas, evaluándose su supervivencia y recuento de colonias de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas. Los resultados mostraron que las nueve cepas de *Vibrio* spp. fueron resistentes a fosfomicina y ácido nalidíxico pero sensibles al resto de antibióticos, entre ellos oxitetraciclina y enrofloxacina; así también que las cepas ácido lácticas F1L, C1L y F3L, inhibieron *in vitro* el crecimiento de todas las cepas de *Vibrio* spp. así como que las cepas F1L y C1L, mostraron incrementar la supervivencia y reducir el recuento de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas en langostinos en el ensayo *in vivo*, demostrando que las cepas nativas de bacterias ácido lácticas tienen potencial probiótico frente a *Vibrio* spp. sensible o resistente a antibióticos.

---

<sup>1</sup> Bachiller egresada de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Pesquera de la UNTUMBES

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

Tesis para optar el título profesional de Ingeniera Pesquera

Universidad Nacional de Tumbes  
Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar  
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera  
Calle Los Ceibos S/N, Villa de Puerto Pizarro, Tumbes. Perú  
Email: vytelhan@gmail.com  
2020

**Palabras clave:** Bacterias ácido lácticas, *Vibrio*, *Litopenaeus vannamei*, resistencia a antibióticos, alternativas a antibióticos.

**Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio* spp. resistant and sensitive to antibiotics.**

Br. Vicsy Yanet Tinoco Elizalde<sup>1</sup>  
Dr. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

This research aimed to determine the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio* spp. resistant and sensitive to antibiotics. For this, shrimps from three locations in the Tumbes region (Puerto Pizarro, Tumbes and Zorritos) were obtained; From these nine bacterial strains were isolated, both from *Vibrio* spp. as of lactic acid bacteria. The resistance of *Vibrio* spp. against 10 antibiotics and then evaluate *in vitro* the inhibitory effect of lactic acid strains against them; Two of the lactic acid strains that showed the greatest inhibitory effect were selected. in the *in vitro* test and were used in the *in vivo* test, in which 13 juveniles shrimp/aquarium were placed in nine 70-liter aquariums, these were infected with a pool of four strains of *Vibrio* spp., and stained with food supplemented with the selected lactic acid strains, assessing their survival and colony count of *Vibrio* spp. in the hepatopancreas. The results showed that the nine strains of *Vibrio* spp. were resistant to fosfomicin and nalidixic acid but sensitive to other antibiotics, including oxytetracycline and enrofloxacin; also that the lactic acid strains F1L, C1L and F3L, inhibited *in vitro* the growth of all *Vibrio* spp strains. as well as the F1L and C1L strains, showed increasing survival and reducing *Vibrio* spp. in hepatopancreas in shrimps in *in vivo* test, demonstrating that the native strains of acid-lactic bacteria have probiotic potential against *Vibrio* spp. sensitive or resistant to antibiotics.

---

<sup>1</sup> Graduated Bachelor of the Escuela Académico Profesional de Ingeniería Pesquera de la UNTUMBES

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

Thesis for the professional title of Fisheries Engineer

National University of Tumbes

Engineering Faculty of Fisheries and Marine Sciences

Academic Professional School of Fisheries Engineering

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

Email: vytelhan@gmail.com

2020

**Keywords:** Acid lactic bacteria, *Vibrio*, *Litopenaeus vannamei*, antibiotic resistance, alternatives to antibiotics.

## I. INTRODUCCIÓN

La principal amenaza para la acuicultura a nivel mundial son las enfermedades infecciosas que originan cuantiosas pérdidas económicas, que según World Bank (2014), se estiman en miles de millones de dólares al año.

Para combatir dichas enfermedades se usan de manera indiscriminada antibióticos, tanto en enfermedades bacterianas e incluso en las de origen viral, lo cual es completamente erróneo. El uso y abuso de estos antibióticos ha producido un verdadero problema ambiental, por la gran cantidad de ellos que ingresan al ecosistema acuático; así la magnitud de este problema es tal que, por ejemplo en Chile el año 2003, se registró el uso de hasta 1/2 (kg de antibióticos)/(kg de salmón producido) (Done et al., 2015).

En el caso del cultivo de langostino también se ha reportado un uso inadecuado de antibióticos empleándose en dosis inadecuadas e incluso como profiláctico (Letchumanan et al., 2015), generalmente para combatir las enfermedades que mayor gravedad revisten para el cultivo como es el caso de las originadas por *Vibrio* (Krishnani et al., 2015; Luis-Villaseñor et al., 2015) y dentro de ellas por una de las especies más virulentas, *Vibrio parahaemolyticus*. El uso inadecuado de estos antibióticos propician la aparición de cepas de bacterias resistentes a antibióticos (Watts et al., 2017).

En el caso del cultivo de *Litopenaeus vannamei*, se han reportado en varias investigaciones la presencia de cepas de *Vibrio* spp. con resistencia a uno o múltiples antibióticos (Stalin & Srinivasan, 2016), lo cual hace que la eficacia de los antibióticos usados tradicionalmente en su tratamiento sea cada vez menor; adicionalmente estas cepas resistentes constituyen un riesgo para el ambiente y la salud del ser humano, dada la posibilidad de su transmisión directa a través de la cadena alimenticia así como por la transferencia horizontal de estos genes de resistencia desde *Vibrio* spp. a otras cepas patógenas para los humanos (Jeyasanta et al., 2017; Millanao et al., 2011; Shakerian et al., 2018).

Debido a esta situación se han investigado alternativas al uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades en langostinos, así se han ensayado probióticos, prebióticos, simbióticos, fitobióticos y otros suplementos dietarios funcionales. Entre los probióticos más comúnmente utilizados en la acuicultura se destacan las bacterias

ácido-lácticas que han demostrado excelentes propiedades inhibidoras contra *Vibrio* spp. (Pandiyar et al., 2013; Rodríguez, 2017).

En particular hay una tendencia a desarrollar probióticos en base a bacterias nativas (del medio y el intestino del langostino) debido a que ya están adaptadas a su propio ambiente; es por ello que esta investigación tuvo como objetivo:

Determinar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de *Litopenaeus vannamei* en la inhibición de *Vibrio* spp. resistentes y sensibles a antibióticos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Uso de antibióticos en acuicultura

La acuicultura a nivel mundial tiene como principal problema a las enfermedades infecciosas, las cuales son responsables de pérdidas económicas muy grandes las cuales en el año 2014, se estima fueron alrededor de 6000 millones de dólares (Santiago et al., 2009; World Bank, 2014); esta situación también afecta de igual manera al cultivo de langostino, que en el 2001 registró pérdidas de casi 1000 millones de dólares anuales como reporta Flegel et al. (2008).

Muchas de las enfermedades infecciosas en el langostino son originadas por bacterias la mayoría de las cuales forman parte de la flora normal de este organismo pero pueden tornarse en patógenas de manera oportunista, algunas de estas bacterias son las que predominan en el intestino de los langostinos como las de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Zheng et al., 2016) de éstas, las que han representado el mayor problema en el cultivo de langostino son las del género *Vibrio* (Flegel, 2012), que forman las poblaciones más frecuentes de bacterias en el langostino (tanto en su sistema digestivo, branquias y exoesqueleto) e incluso estando presentes ocasionalmente en su hemolinfa (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014).

Las enfermedades originadas por *Vibrio* spp. son a menudo graves para el langostino, por ello los productores utilizan frecuentemente antibióticos para tratarlas. Los antibióticos son sustancias obtenidas de algunos microorganismos, o producto de modificaciones químicas de las mismas e incluso pueden ser sintéticas (Acosta, 2014; Santiago et al., 2009), las que pueden evitar la proliferación bacteriana a través de detener su crecimiento sin matarla, en este caso el antibiótico se denomina bacteriostático o matando a la bacteria, en dicho caso se le llama bactericida; al contrario de otras sustancias que también detienen el crecimiento bacteriano, como es el caso de los desinfectantes, la toxicidad de los antibióticos es suficientemente baja como para que pueda ser utilizado para controlar las bacterias dentro del cuerpo del huésped (Martínez, 2018).

Para controlar a *Vibrio* spp. en los cultivos de langostinos se ha empleado ciertos antibióticos siendo los más frecuentes: oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol (Otero, 2018).

## 2.2. *Vibrio* spp.

El género *Vibrio* conjuntamente con los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium* pertenecen a la clase Gammaproteobacteria y la familia Vibrionaceae (Serrano, 2014; Thompson et al., 2004). Las bacterias del género *Vibrio* son ubicuas en los ecosistemas marinos y estuarinos. Se trata de bacterias oportunistas que producen infección cuando el langostino está debilitado (Lin et al., 2018; Morales-Covarrubias, 2008); las infecciones por *Vibrio* spp. son capaces de originar mortalidades hasta del 100% en el cultivo de langostino, especialmente en larvicultura (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014).

El género *Vibrio* incluye más de 110 especies (Lin et al., 2018), 13 de las cuales son patógenas para el ser humano como son: *V. cincinnatiensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. carchariae*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. damsela* (actualmente clasificada como *Photobacterium damsela*), *V. metshnikovii*, *V. mimicus* y *V. hollisae*, también algunas de ellas afectan a la acuicultura, produciendo severas infecciones en los organismos en cultivo especialmente en langostinos, las principales especies que son causante de esto son *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* y *V. splendidus* (Rebouças et al., 2011; Serrano, 2014).

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos gram-negativos, no esporulantes con un tamaño de 1,4 a 2,6 µm de largo por 0,5 a 0,8 µm de ancho, son principalmente oxidasa positivas, rectas o curvas en forma de coma, pero en laboratorio crecen como varillas rectas. Cuentan con un solo flagelo polar monotrico el cual puede transformarse en multitrico al crecer en medio líquido, son aeróbicos o anaeróbicos facultativos. *Vibrio* spp. necesitan de sodio para crecer, así el requerimiento en el medio de cultivo de NaCl para estas bacterias está entre 0,029 y 4,1%, aunque su óptimo es de 2,0 a 2,5%. Metabólicamente muchas de sus especies producen catalasa, oxidasa y son capaces de fermentar la glucosa sin producir gas, además reducen el nitrato a nitrito, *Vibrio* spp. son capaces de usar diferentes fuentes de carbono, incluso la quitina, que es el segundo carbohidrato más abundante del mundo y que forma parte del exoesqueleto de crustáceos (Lin et al., 2018; Serrano, 2014; Silva et al., 2008).

Un carácter diagnóstico rápido es que *Vibrio* spp. son capaces de crecer en agar marino y agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y son principalmente oxidasa positivos (Thompson et al., 2004).

### 2.3. Resistencia a antibióticos en *Vibrio* spp.

Los antibióticos producidos naturalmente por ciertos microorganismos, así como los elaborados por el ser humano, han hecho que muchas cepas bacterianas se hayan visto expuestas por generaciones a los mismos, por lo que la selección natural ha seleccionado progresivamente a aquellas cepas bacterianas en las que se han desarrollado mecanismos para lidiar con los antibióticos. La resistencia a antibióticos es una estrategia muy antigua empleada por las bacterias para sobrevivir a estos y que se evidencia en sedimentos que datan de hace más de 30 000 años, en los que se detectaron genes de resistencia a antibióticos tales como tetraciclinas,  $\beta$ -lactámicos y glucopéptidos (Santos, 2017).

Se ha considerado frecuentemente que *Vibrio* spp. es un grupo de bacterias que son altamente sensibles a antibióticos usados clínicamente, sin embargo a lo largo del tiempo, se ha mostrado que la resistencia a antibióticos no es un hecho inusual en este grupo de bacterias más bien los casos de *Vibrio* spp. resistente, se reportan por todo el mundo, la causa de tal resistencia es el uso excesivo de estos en la medicina humana, la agricultura e incluso la acuicultura; si bien es cierto que en la acuicultura no se aplica antibióticos como promotores de crecimiento, si se aplica como profiláctico para prevenir enfermedades y en el tratamiento de las mismas. La resistencia a los principales antibióticos permitidos y usados en forma general en la acuicultura como son la oxitetraciclina, tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas y trimetoprim, crece cada día más de igual manera ocurre para aquellos antibióticos que son usados contra *Vibrio* spp. como son: cefalotina, cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima, tetraciclina, doxiciclina, orfluoroquinolona (Albuquerque et al., 2015; Jeyasanta et al., 2017; Rico et al., 2017; Shakerian et al., 2018; Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

En la acuicultura de langostino se han reportado casos de *Vibrio* spp. resistente o multirresistente a antibióticos como en *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* y *V. campbelli* (Stalin & Srinivasan, 2016); esta situación podría empeorar si se tiene en cuenta que *Vibrio* spp. puede portar plásmidos con genes de resistencia a antibióticos, los que pueden transferir horizontalmente la resistencia a antibióticos a otras cepas de *Vibrio* o de otros género; sin embargo el uso de probióticos que pueden controlar a cepas patógenas se está viendo como una verdadera alternativa al uso de antibióticos en la acuicultura (Balcazar et al., 2006).

#### **2.4. Probióticos.**

Los probióticos son cultivos de una cepa o de varias cepas de microorganismos que al ser ingeridos por su huésped le proporciona beneficios al mejorar las propiedades de su flora bacteriana nativa; en la acuicultura del langostino generalmente se aplican como suplementos alimenticios o al agua de cultivo para mejorar la salud del mismo o para mejorar la calidad del agua de cultivo (Javadi & Khatibi, 2017). Los probióticos son una de las alternativas más prometedoras para reemplazar a los antibióticos y su aplicación en la acuicultura es ampliamente aceptada. Los probióticos pueden mejorar la salud de los langostinos al mejorar su balance microbiano intestinal, al colonizar su intestino, privar a los patógenos de sitios de adhesión en el intestino competir con los mismos por nutrientes, para seleccionar una cepa bacteriana como potencial probiótico, ésta debe ser no patógenas y mostrar antagonismo hacia uno o más patógenos (Javadi & Khatibi, 2017; Lamari et al., 2014).

Generalmente las cepas probióticas usadas en acuicultura son obtenidas de la flora bacteriana indígena o exógena de los animales acuáticos, en los marinos las bacterias más frecuentes son *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp., mientras que en el caso de agua dulce, son más frecuentes *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas* spp., ambas de la familia Enterobacteriaceae, y bacterias obligadas de los géneros Bacteroides, Fusobacterium y Eubacterium. Las bacterias ácido lácticas que son muy frecuentes en el intestino de mamíferos y aves (Bifidobacterium en humanos, Lactobacillus en cerdos, roedores y aves, Enterococcus en carnívoros), son generalmente sub dominantes en los peces, sin embargo ello no ha impedido que sean una de las cepas más estudiadas (Balcazar et al., 2006).

Los estudios realizados sobre las especies bacterianas presentes en langostinos sanos y enfermos, muestran que en los enfermos se produce un desbalance de la flora bacteriana y muestran que bacterias de los géneros Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus y Bacillus que son bacterias con potencial probiótico se hallan notablemente disminuidos en dicho caso; así se ha encontrado que en langostinos sanos (Li et al., 2018).

## **2.5. Bacterias ácido lácticas como probióticos.**

La mayoría de los probióticos usados en acuicultura corresponden a bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*), *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Vibrio*; en particular las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacilos o cocos Gram positivos no formadores de esporas, no móviles y que producen a través de la fermentación de carbohidratos, ácido láctico; al igual que otras cepas probióticas poseen actividades inhibitoras de patógenos, competencia por sitios de adhesión e incluso inmuno moduladoras, como estimuladoras de fenoloxidasas, superoxidasa, peroxinectinas entre otras (Pérez-Sánchez et al., 2014; Quispe, 2017).

Pérez-Sánchez et al. (2014), señalan múltiples investigaciones en las que las bacterias ácido lácticas han sido empleadas con éxito en el cultivo de organismos acuáticos, así por ejemplo se han utilizado para tratar edwardisellosis, furunculosis y vibriosis; se ha usado *Lactobacillus carnarum* cepa 7-40 (NTU 102) para controlar *Vibrio alginolyticus* en *L. vannamei*, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Carnobacterium* sp. BA211, *Lactococcus lactis* CLFP 100, *Lactobacillus sakei* CLFP 202, *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196, para controlar *Aeromonas salmonicida* en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, para controlar *Lactococcus garvia* en *O. mykiss*; *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactococcus lactis* CLFP 100, para combatir *Aeromonas salmonicida* en *Salmo trutta*, *Lactobacillus plantarum* o *Carnobacterium* sp. Para tratar la vibriosis en *Scophthalmus maximus* entre otros, todo esto muestra que las bacterias ácido lácticas tienen un potencial probiótico probado y que pueden ser utilizadas en la acuicultura.

## **2.6. Investigaciones relacionadas al uso de bacterias ácido lácticas como probióticos en acuicultura.**

Algunos estudios realizados sobre bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas frente a patógenos en la acuicultura se tienen:

Xia et al. (2018), desarrollaron una investigación para evaluar el efecto de las cepas: *Lactobacillus rhamnosus* (LR) JCM1136 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL) JCM5805 solas y combinadas sobre el crecimiento, la microbiota intestinal, la morfología intestinal, la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para ello, seleccionaron 720 tilapias aparentemente

sanas y las alimentaron con una dieta suplementada con las cepas antes señaladas (LR, LL o LR+LL) a una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC/g, así como con una dieta testigo (CK) sin suplementación de probióticos. Luego de las seis semanas, se inyectó intraperitonealmente a las tilapias con 20  $\mu$ l del patógeno *Streptococcus agalactiae* (WC1535) a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, observándose que la tasa de supervivencia fue significativamente mayor en los tratamientos con probióticos comparados al testigo. También, al analizar las tilapias luego de las seis semanas de alimentación, y antes de la inyección intraperitoneal, se observó que el tratamiento LL mostró mayor crecimiento y mejor utilización del alimento que el testigo CK. La observación microscópica de las microvellosidades intestinales mostró que éstas fueron más grandes y se encontraron en mayor densidad en los tratamientos con probióticos. También se halló mayor expresión de genes inmunitarios en los tratamientos con probióticos. Esto demostró que los lactobacilos fueron efectivos probióticos frente a *S. agalactiae*.

Quispe (2017), realizó el aislamiento de *Lactobacillus* sp. a partir del intestino de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Puno (Perú) y probó su efecto probiótico frente a *Yersinia ruckeri*, uno de los principales patógenos de la trucha. Para ello recolectó 48 truchas sanas (alevines y juveniles) de una piscifactoría, luego las sacrificó con una sobredosis de eugenol y les extrajo el intestino de forma aséptica, para luego raspar su mucosa y sembrar la muestra en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) dejándolo incubar por 24-48 h a 30 °C. Las colonias fueron identificadas morfológicamente, aislándose tres cepas de *Lactobacillus* y una de *Bacillus*; luego fueron probados por su actividad probiótica *in vitro* contra *Y. ruckeri*, mostrando todas las cepas actividad probiótica al mostrarse halos de inhibición de 9 mm de diámetro en cultivos de *Y. ruckeri*. Concluyendo que en el intestino de la trucha existen bacterias con potencial probiótico para combatir a *Y. ruckeri* siendo una alternativa medioambientalmente amigable frente a los antibióticos.

Liu et al. (2010), probaron el potencial probiótico de la cepa de *Bacillus subtilis* E20, en la supervivencia, desarrollo, tolerancia al estrés y estado inmune de larvas de *L. vannamei*. Para ello realizaron un experimento con tres concentraciones de *B. subtilis*: 0 (control),  $10^8$  y  $10^9$  UFC/l de agua salada, aplicadas una vez cada 3 días, durante los 14 días que duró la larvicultura. Los resultados mostraron que el desarrollo larvario se

incrementó significativamente en los tratamientos en los que se aplicó *B. subtilis* a concentración de  $10^9$  UFC/l, de igual manera se produjo una fuerte inhibición del crecimiento de bacterias totales y de *Vibrio* luego de la aplicación de *B. subtilis* al agua. Las larvas se mostraron resistentes al estrés pues ninguna de ellas murió luego de que el agua de cultivo se redujo de 30 °C a 2 °C a una tasa de 0,1 °C/min, así también las mortalidades acumuladas luego de ser expuestas a una salinidad de 60 ‰ y a agua dulce, fueron menores en los tratamientos con *B. subtilis*. Concluyeron que *B. subtilis* E20 puede servir como probiótico al ser suministrado en concentración de  $10^9$  UFC/ml

Sha et al. (2016), evaluaron el efecto probiótico de bacterias ácido lácticas sobre la supervivencia, crecimiento, respuesta inmune y resistencia a enfermedades de *L. vannamei*, para ello obtuvieron 53 cepas de bacterias ácido lácticas de probióticos comerciales, del tracto intestinal del langostino *Fenneropenaeus indicus* y del pez *Acanthogobius hasta*. Las cepas fueron identificadas mediante análisis de su gen 16S ARNr. Se seleccionó dos cepas: *Enterococcus faecium* NRW-2 y *Lactobacillus pentosus* HC-2, las cuales se usaron en los experimentos, según los tratamientos siguientes: T1 (*E. faecium*), T2 (*L. pentosus*), T3 (*E. faecium* + *L. pentosus*) y T4 (control sin bacterias probióticas). Se realizó un ensayo de su poder probiótico *in vitro*, para lo cual siguieron el método de difusión en pozo de agar reportado por Lamari et al. (2014), aplicando dos tratamientos adicionales, el primero con polimixina B y el segundo con caldo MRS, los que constituyeron respectivamente los controles positivo y negativo del experimento. También se ensayó el sobrenadante del cultivo de *B. subtilis* como un tratamiento adicional. El poder inhibidor de las bacterias ácido lácticas se estimó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada pozo y comparándolo con el halo de inhibición de la polimixina B. Los resultados mostraron que *L. pentosus* HC-2 mostró mayor actividad inhibitoria contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, siendo una cepa probiótica que puede ser utilizada en el cultivo de *L. vannamei*.

A pesar de la existencia de este tipo de investigaciones a nivel internacional, luego de realizada la revisión bibliográfica respectiva, no se ha encontrado reportes locales ni regionales de investigaciones sobre el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas nativas contra *Vibrio* spp. aislados de *L. vannamei*.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material y equipo

##### Material biológico

- 180 ejemplares de *Litopenaeus vannamei*.

##### Materiales

- 400 jeringas de 1 ml
- 2 cajas de guantes nitrilo
- 2 cajas de guantes de examen
- 1 tubo de estándar Mac Farland 0,5 preparado artesanalmente.
- 1000 puntas de micropipeta de 0-10  $\mu$ l
- 1000 puntas de micropipeta de 10-100  $\mu$ l
- 500 puntas de micropipeta de 100-1000  $\mu$ l
- 1000 microtubos de centrifuga de 1,5 ml
- 100 placas Petri de 10 cm de diámetro
- 200 tubos falcon de 15 ml
- 30 tubos falcon de 50 ml
- 4 baldes de 10 l
- 1 galón de hipoclorito de sodio (lejía)
- 5 cinta maskingtape
- 1 libreta de campo
- 9 baldes de 20 l
- 2 cajas hojas de bisturí
- 1 balón de gas
- 2 rollos papel aluminio
- 4 l de alcohol de 96%
- 10 gal de agua destilada
- 1 docena de papel kraft
- 1 frasco de 500 g de agar TCBS
- 1 frasco de 500 g de caldo TSB
- 1 frasco de 500 g de caldo MRS
- 1 frasco de 250 g de cloruro de sodio al 99%
- 100 g de citrato de sodio
- 6 cartuchos de sensidiscos de ampicilina

- 6 cartuchos de sensidiscos de fosfomicina
- 6 cartuchos de sensidiscos de cloranfenicol
- 6 cartuchos de sensidiscos de florfenicol
- 6 cartuchos de sensidiscos de oxitetraciclina
- 6 cartuchos de sensidiscos de gentamicina
- 6 cartuchos de sensidiscos de tetraciclina
- 6 cartuchos de sensidiscos de ácido nalidíxico
- 6 cartuchos de sensidiscos de enrofloxacina
- 6 cartuchos de sensidiscos de norfloxacina
- 2 kg de alimento balanceado para langostino al 35% de proteínas

### **Equipos**

- 1 estuche de disección
- 6 maceradores de acero
- 6 sacabocados artesanales (preparados con jeringa hipodérmica de 1 ml)
- 1 cámara de flujo laminar marca Boeco
- 1 micropipeta de 0-10  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 10-100  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 100-1000  $\mu$ l
- 1 probeta de 100 ml
- 9 matraces de 250 ml
- 4 matraces de 500 ml
- 2 matraces de 1000 ml
- 1 horno de microondas marca LG
- 1 balanza analítica con precisión de 0,0001 g, marca Sartorius modelo TE2145
- 1 autoclave marca All American modelo 25x
- 1 centrifuga marca Sigma modelo 15K
- 1 caja de hisopos de algodón
- 1 mechero
- 1 refrigeradora marca LG modelo GM-323QC
- 1 congelador vertical a -18 °C marca Electrolux modelo EFCC10C3HQW
- 1 cocina marca Indurama modelo Cádiz

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Preparación de insumos y materiales para la siembra bacteriana.**

El día previo a la realización del muestreo de langostinos, se preparó la solución anticoagulante (citrato de sodio al 10%) la cual fue mantenida en un refrigerador a una temperatura de alrededor de 4 °C hasta su utilización.

Las placas petri, matraces, microtubos de centrifuga, pinzas y tijeras de acero inoxidable y maceradores fueron empacados y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Se preparó suficiente agar MRS suplementado con cloruro de sodio (a una concentración final de 2,5% de NaCl), teniendo en cuenta cuántas placas de petri se emplearían para la siembra (20 a 25 ml de agar MRS/placa). El medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C por 15 min y dispuesto en las placas petri, que fueron selladas con papel parafilm y mantenidas en refrigeración hasta su uso.

Se preparó medio TCBS en cantidad suficiente para la cantidad de placas petri que se utilizaron en el muestreo, teniendo en cuenta que por cada placa se requirió entre 20 a 25 ml de medio. El medio se preparó disolviendo en un matraz, agar TCBS en agua destilada, en cantidad de 88 g por cada litro de medio, al cual se agregó cloruro de sodio para alcanzar una concentración de 2,5%. El medio se disolvió calentándolo hasta ebullición para que se disuelva todo el agar, luego se dejó reposar pues el medio no necesitó esterilización. Una vez tibio, el medio fue vertido en las placas petri, las que se sellaron usando papel parafilm y se colocaron en forma invertida en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Se preparó TSA con adición de cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración final de 2,5%. El medio se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 min), para luego ser vertido en placas petri, que fueron selladas con papel parafilm y mantenidas en refrigeración hasta su uso.

### **3.2.2. Recolección de langostinos**

Los langostinos (*L. vannamei*) recolectados fueron animales de cultivo que fueron donados por empresas langostineras de las zonas de Puerto Pizarro, Zarumilla y Zorritos. Los langostinos fueron obtenidos de los estanques en los que se reportaron más casos de enfermedades, se seleccionó aquellos individuos que presuntamente padecían vibriosis según sus signos externos; pero también se seleccionaron aquellos

aparentemente sanos; los langostinos fueron colocados en depósitos que contenían agua del estanque del cual fueron obtenidos; y luego fueron transportados rápidamente a la sede de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (FIPCM) de la Universidad Nacional de Tumbes en la villa de Puerto Pizarro.

### **3.2.3. Obtención de muestras de tejidos para el cultivo bacteriano**

Cada ejemplar obtenido se pesó y observó sus características externas, en busca de heridas, coloraciones anormales, erosiones, bioluminiscencia, entre otros. Se extrajo además al menos 0,1 ml de hemolinfa del seno ventral, con una jeringa de 1 ml conteniendo 0,1 ml de citrato de sodio al 10% refrigerado. La hemolinfa se mantuvo refrigerada hasta que se realizó la siembra bacteriana. También se extrajo un fragmento de 0,1 g de hepatopáncreas, el cual fue colocado en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml. Se extrajo la mayor parte del intestino del animal, el que fue colocado también en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml. Finalmente, se tomó también muestras de las heridas y erosiones en el exoesqueleto, los que fueron colocados en otro microtubo de centrifuga de 1,5 ml.

Las muestras sólidas (obtenidas del hepatopáncreas, intestino, de heridas y erosiones), fueron trituradas en el mismo microtubo con varillas metálicas de acero inoxidable esterilizadas, al tejido triturado se le agregó solución de NaCl al 2,5% hasta alcanzar un volumen de 1 ml.

### **3.2.4. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)**

El aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas se realizó siguiendo el método de Quispe (2017), para lo cual se tomó el macerado del intestino y se sembró por agotamiento en placas petri conteniendo medio MRS. Las placas fueron selladas con cinta parafilm e incubadas por 24 h a 48 h en posición invertida a una temperatura de 37 °C.

### **3.2.5. Aislamiento de cepas de *Vibrio* spp.**

Se sembraron 100 µl de la hemolinfa extraída (mezclada con el anticoagulante) en su correspondiente placa petri, en la cual se había dispensado medio agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS). La muestra fue extendida en estrías con un asa de siembra sobre la superficie del medio. Luego las placas petri fueron selladas con parafilm y dejadas incubar en posición invertida por 24 h a 37 °C.

Para las muestras de intestino, hepatopáncreas, erosiones y heridas, el microtubo con el macerado de éstos, fue etiquetado como solución madre, se prepararon adicionalmente soluciones diluidas en el rango de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  en otros microtubos del mismo volumen: Se sembraron 100 µl de cada dilución en placas petri con TCBS. Las placas sembradas fueron selladas con parafilm e incubadas a 37 °C por 24 h.

### **3.2.6. Purificación de cepas bacterianas.**

La purificación se realizó de manera similar para las cepas bacterianas obtenidas en los medios MRS y TCBS, consistiendo la observación posterior a la incubación de las placas petri para determinar cuáles fueron las cepas bacterianas más representativas; las mismas que se subcultivaron en TSA, sembrando por estrías cada colonia elegida a otra placa petri con TSA. Las placas se sellaron e incubaron a 37 °C por 24 h, luego de lo cual se observó si las colonias que crecieron fueron similares, sino fue así se volvió a subcultivar en nuevas placas petri con TSA, hasta obtener un monocultivo de bacterias.

El código con que se designó a las cepas purificadas, tuvo una estructura como la siguiente: E1V, donde su primera letra indicó el campo de cultivo del cual procedió el langostino del que se obtuvo la cepa, luego un número secuencial de la cepa purificada y por último la letra V para designar a *Vibrio* spp. o L para designar a bacterias ácido lácticas.

### **3.2.7. Conservación de cepas bacterianas.**

Para la conservación de la cepa, ya sea de bacterias ácido lácticas como de *Vibrio* spp., se tomó una colonia de las cepas bacterianas purificadas y se colocó en un microtubo con 1 ml de caldo de lisogenia (LB), dejándose incubar por 24 h a 37 °C. También se realizaron al menos dos réplicas de respaldo para cada una de estas colonias para lo cual se tomó 10 µl de la suspensión bacteriana del primer microtubo y se colocó en otro microtubo conteniendo 1 ml de caldo LB, se incubó nuevamente por 24 h a 37 °C. Luego de las 24 h de incubación, se observó si hubo crecimiento en cada microtubo, pero al no haberlo se esperó hasta las 48 h, cuando se confirmó su crecimiento, a continuación se adicionó glicerol helado hasta alcanzar una concentración de 15% y se conservó a -20 °C, hasta su uso

### 3.2.8. Aislamiento de cepas de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos

Las cepas de *Vibrio* spp. conservadas, fueron utilizadas en el ensayo de antibiograma. Para ello se tomó una colonia y se sembró en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml con 1 ml de TSB. Este se dejó crecer por 48 h hasta que alcanzó un nivel de turbidez que superó al estándar de MacFarland 0,5.

Se empleó el método de disco de difusión, que consistió en que las colonias a sembrar que se hallaban en los microtubos, se centrifugaron a 10 000 xg por 5 min, para separar el *pellet* bacteriano del medio TSB, luego el *pellet* fue resuspendido en un microtubo de 1,5 ml con solución salina al 2,5% y se trató de igualar su turbidez (por inspección visual) con la que tiene el estándar de MacFarland 0,5 (equivalente a una concentración de  $1 \times 10^8$  cél./ml) para lo cual en caso fue necesario se diluyó la solución bacteriana con solución salina al 2,5%. La muestra bacteriana estandarizada se usó para la siembra en placas petri conteniendo medio Müeller-Hinton (preparado disolviendo 38 g en 1 litro de agua destilada). Para ello se tomó 100 µl de la muestra bacteriana y se extendió sobre toda la placa petri con un cotonete esterilizado. A continuación se aplicó con la aguja de una jeringa, sobre la placa sembrada, discos antibióticos comerciales conforme a la tabla 1:

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

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

Luego de aplicar los discos, se esperó 24 h para observar el crecimiento de las bacterias y la formación de halos de inhibición en el caso de que no fueran resistentes. Los diámetros de los halos de inhibición generados por los discos de sensibilidad se midieron utilizando una regla milimetrada. Las cepas de *Vibrio* spp. que mostraron ser resistentes a uno o más antibióticos fueron colocadas en microtubos de 1,5 ml con

medio TSB y almacenadas en refrigeración para su posterior uso. La determinación de la resistencia de las cepas a los antibióticos ensayados se realizó tomando como puntos de corte los que se muestran en la tabla 2.

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

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

Se eligieron las cepas que mostraron resistencia a algunos de los antibióticos señalados, las que fueron usadas en los ensayos de sensibilidad frente a bacterias ácido lácticas.

### 3.2.9. Evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* de bacterias ácido láctico.

Para determinar el efecto inhibitorio de las cepas de bacterias ácido lácticas, se empleó el método de difusión en pozo de agar como lo realizaron Lamari et al. (2014), con modificaciones como se detalla a continuación: Se tomó 10 µl del cultivo de *Vibrio* spp. en el microtubo conservado y se transfirió a un microtubo de centrífuga de 1,5 ml con 1 ml de TSB. Este se dejó crecer por 24 a 48 h hasta que alcanzó un nivel de turbidez que superó al estándar de MacFarland 0,5. Los microtubos se centrifugaron a 10 000 xg por 5 min, para separar el *pellet* bacteriano del medio TSB, luego el *pellet* fue resuspendido en un microtubo de 1,5 ml con solución salina al 2,5% y se trató de igualar su turbidez (por inspección visual) con la que tuvo el estándar de MacFarland 0,5 (equivalente a una concentración de  $1 \times 10^8$  cél./ml) para lo cual en caso ser necesario se diluyó la solución bacteriana con solución salina al 2,5%. La muestra

bacteriana estandarizada se usó para la siembra en placas petri conteniendo medio Müeller-Hinton. Para ello se tomó 100 µl de la muestra bacteriana y se extendió sobre toda la placa petri con un asa de drigalski esterilizada.

Las cepas de bacterias ácido lácticas fueron dejadas crecer en tubos falcon de 15 ml con caldo MRS; luego se igualó su turbidez con la del estándar de MacFarland 0,5. De cada uno de estos tubos se transfirió la cepa a dos microtubos de centrifuga de 1,5 ml, el primero se designó como cultivo (C), mientras que el segundo se centrifugó a 10000 rpm por 3 min para separar el pellet bacteriano del sobrenadante (S).

En cada una de las placas petri en que se sembraron las cepas de *Vibrio* spp. se perforaron pozos en el agar usando una jeringa de 1 ml a la que se le cortó la parte anterior y que fue esterilizada. La distancia entre pozos no fue menor a 25 mm y estuvieron uniformemente espaciados sobre la placa petri.

En cada pozo se colocó entre 20 a 70 µl de la suspensión bacteriana del microtubo marcado como C, así también en otro pozo se colocó un volumen similar del sobrenadante del microtubo marcado como S. Esto se repitió por triplicado para cada una de las cepas de bacterias ácido lácticas y se dejó incubar por 24 h, luego de lo cual se midieron con una regla los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los pozos.

### **3.2.10. Evaluación del efecto inhibitorio *in vivo* de bacterias ácido lácticas.**

Para evaluar el efecto inhibitorio *in vivo* de las cepas de bacterias ácido lácticas se efectuó un experimento en acuarios utilizando juveniles de *L. vannamei*, los cuales fueron infectados con un *pool* de cuatro cepas de *Vibrio* spp. más resistentes a antibióticos a los que se les administró alimento balanceado impregnado con las cepas ácido lácticas potencialmente probióticas.

Se seleccionó las dos cepas ácido lácticas que mostraron el mayor efecto inhibitorio en el ensayo *in vitro*, para ser utilizadas en el ensayo *in vivo*; de igual manera se seleccionó cuatro cepas (E1V, E2V, C1V, C2V) de *Vibrio* spp, no fermentadora de sucrosa (colonias verdes en TCBS, las mismas que generalmente se consideran patógenas para el langostino), las cuales fueron mezcladas en un *pool*.

Para la preparación del alimento suplementado con las cepas ácido lácticas se siguió la metodología empleada por Esguerra (2012), con modificaciones:

Las cepas ácido lácticas se cultivaron en medio TSA, y luego de 48 h, se sembraron en TSB por 24 h, a continuación se realizaron diluciones hasta obtener una

concentración de  $10^6$  UFC/ml. Estas diluciones se emplearon para agregarlo al alimento en cantidad tal que el alimento quedó humedecido de manera uniforme, luego se dejó secar y se agregó aceite de pescado como attractante. Las cantidades aplicadas de cultivo bacteriano diluido y aceite de pescado, fueron de 1 ml y 0,5 ml por cada 100 g de alimento balanceado respectivamente. El alimento se preparó a diario de esta manera, antes de ser administrado a los langostinos.

Antes de iniciar el experimento, se tomó una muestra de dos langostinos de cada acuario, a los cuales se les extrajo el hepatopáncreas para poder determinar su carga de *Vibrio* spp. mediante recuento de colonias en placas petri con medio TCBS.

Para el experimento se utilizaron nueve acuarios de 70 l aproximadamente en cada uno de los cuales se colocaron 13 langostinos de peso promedio 1,3 g. Cada acuario fue sorteado para determinar el tratamiento que se le asignaría (testigo o la aplicación de alimento con cepa potencialmente probiótica F1L y F2L).

Se preparó un balde de 20 l en el cual se colocó agua salobre al cual se le agregó un *pool* de *Vibrio* spp. (Constituido por las cepas E1V, E2V, C1V, C2V) en cantidad tal que se aseguró una concentración final de  $10^6$  UFC/ml, los langostinos fueron sumergidos 10 min en el agua de dicho balde para lograr su infección. Posteriormente se retiró los langostinos y se colocaron en su respectivo acuario, los langostinos recibieron el primer día de infección, alimento balanceado sin ningún tipo de probiótico. A partir del segundo día de cultivo, se empezó a alimentar a los langostinos conforme a lo que indicó cada tratamiento (alimento con adición de cepas de bacterias ácido lácticas o sin ellas).

En el día cinco de cultivo, se tomó una muestra de dos langostinos de cada acuario y se sacrificaron para obtener un recuento de *Vibrio* spp. en su hepatopáncreas. El experimento continuo hasta el día 8 de cultivo, en el cual se obtuvo nuevo recuento de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas. Diariamente se llevó control de crecimiento, supervivencia y de consumo de alimento.

### **3.2.11. Análisis estadístico.**

Los resultados de los análisis anteriores fueron organizados en tablas y gráficos para una mejor comprensión. Se elaboraron tablas en las que se mostró la cantidad y porcentaje de cepas de *Vibrio* spp. que mostraron resistencia a antibióticos.

Para el ensayo de inhibición *in vitro* se realizó un experimento bajo el diseño completamente al azar (DCA) con nueve tratamientos (cepas de bacterias ácido

lácticas obtenidas del intestino y hepatopáncreas de langostinos sanos), las cuales fueron ensayadas contra las nueve cepas de *Vibrio* spp. aisladas (todas ellas fueron resistentes a solo dos antibióticos) de langostinos de cultivo. Las repeticiones fueron tres placas petri conteniendo cultivos de *Vibrio* spp. antes mencionados, se usó como control positivo el antibiótico al cual fueron más sensibles las cepas de *Vibrio* spp. ensayadas. Se evaluó los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los pozos practicados en el agar de las placas petri. La evaluación estadística se realizó usando análisis de varianza y prueba de Duncan y Tuckey con  $\alpha = 5\%$ .

Para el ensayo de inhibición *in vivo* se realizó un experimento bajo el diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos (dos tratamientos en que se aplicó al alimento balanceado, dos de las cepas de bacterias ácido lácticas que mayor inhibición produjeron en el ensayo *in vitro*, y un tratamiento testigo sin aplicación de cepas de bacterias) las cuales fueron ensayadas en langostinos infectados experimentalmente con un *pool* de cepas de *Vibrio* spp. (E1V, E2V, C1V y C2V). Las repeticiones fueron tres acuarios de 70 l en los que se colocó 13 juveniles de *L. vannamei* aparentemente sanos, a los cuales se infectó experimentalmente con *Vibrio* spp.; los tratamientos experimentales recibieron tratamiento con alimento balanceado al que se agregó bacterias ácido lácticas (F1L y C1L), mientras que el testigo recibió alimento sin bacterias ácido-lácticas. Se evaluó la supervivencia de los langostinos en experimentación y el recuento de *Vibrio* spp. en su intestino. La evaluación estadística se realizó usando análisis de varianza y prueba de Duncan y Tuckey con  $\alpha = 5\%$ .

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Peso y talla de los langostinos recolectados

Los langostinos presentaron tallas y pesos promedios distintos en cada muestreo, pero en cada muestreo sus tallas y pesos fueron bastante similares como lo indica su baja desviación estándar (DE). Los langostinos más pequeños correspondieron al primer muestreo (peso de  $3,6\pm 0,3$  g y talla de  $7,5\pm 1,7$  cm) y los de mayor tamaño, al segundo (peso de  $9,0\pm 1,3$  g y talla de  $12,3\pm 1,9$  cm)(tabla 3).

Tabla 3. Peso y talla (Media $\pm$ DE) de los langostinos recolectados según muestreo.

Muestreo	N° de ejemplares	Peso(g)	Talla(cm)
1	9	$3,6\pm 0,3$	$7,5\pm 1,7$
2	12	$9,0\pm 1,3$	$12,3\pm 1,9$
3	11	$4,7\pm 0,6$	$6,1\pm 1,1$

### 4.2. Cepas de *Vibrio* spp. y bacterias ácido lácticas aisladas de langostino

Se aislaron nueve cepas de *Vibrio* spp. y nueve de bacterias ácido lácticas, las primeras procedieron principalmente del hepatopáncreas (seis de nueve), mientras que las segundas del intestino (cinco de nueve) (tabla 4). El código que se les asignó estuvo compuesto de la inicial de la langostinera, el número de cepa aislada y la indicación de ser cepa de *Vibrio* (V) o bacteria ácido láctica (L).

Tabla 4. Cepas de *Vibrio* spp. y bacterias ácido lácticas aisladas de langostino

Identificación presuntiva	Cepa	Langostino	Órgano del cual fue aislada
<i>Vibrio</i> spp.	C1V	3	Hepatopáncreas
	C2V	7	Hepatopáncreas
	F1V	6	Intestino
	E1V	2	Hepatopáncreas
	E2V	3	Intestino
	E3V	4	Hepatopáncreas
	E4V	5	Hepatopáncreas
	E5V	5	Intestino
	E6V	10	Hepatopáncreas
Bacterias ácido lácticas	C1L	2	Hepatopáncreas
	C2L	4	Intestino
	C3L	6	Hepatopáncreas
	C4L	7	Intestino
	F1L	3	Intestino
	F2L	5	Hepatopáncreas
	F3L	8	Hepatopáncreas
	F4L	9	Intestino
	F5L	11	Intestino

El hecho de obtener cepas de *Vibrio* spp. y de bacterias ácido lácticas de los langostinos muestreados, obtenidas principalmente del hepatopáncreas e intestino, es compatible con el hecho de que *Vibrio* spp. forman parte de la flora nativa del langostino, siendo patógenas oportunistas, así como que las bacterias acidolácticas sean comunes en el tracto intestinal (Cornejo-Granados et al., 2017; Md Zoqratt et al., 2018).

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

En la tabla 5 se observa el diámetro promedio de los halos de inhibición que se obtuvieron en los antibiogramas realizados a las cepas de *Vibrio* spp. (tres repeticiones por cepa). Las cepas en general mostraron halos con diámetros reducidos frente a fosfomicina ( $0,3\pm 0,6$  mm) y ácido nalidíxico ( $1,6\pm 1,7$  mm); pero con diámetros mayores contra oxitetraciclina ( $38,3\pm 1,7$  mm), ampicilina ( $33,0\pm 3,9$  mm), florfenicol ( $33,0\pm 2,3$  mm), cloranfenicol ( $32,2\pm 2,0$  mm) y tetraciclina ( $32,2\pm 0,9$  mm).

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

Cepa	Penicilinas	Fosforatos	Fenicoles		Tetraciclinas		Aminoglucósidos	Quinolonas		
	Ampicilina (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Acido nalidíxico (30 µg)	Enrofloxacin (5 µg)	Norfloxacin (10 µg)
C1V	34,7	0,7	31,7	34,0	36,3	32,3	31,0	0,0	30,7	20,7
C2V	34,3	0,0	32,7	35,0	38,0	32,3	33,0	0,7	34,3	16,7
F1V	37,3	0,7	36,7	31,7	38,7	32,0	32,3	3,0	30,7	20,0
E1V	31,7	0,0	33,3	36,7	36,7	31,7	30,0	3,3	33,0	21,3
E2V	34,0	0,0	31,7	30,0	35,7	31,3	31,3	3,0	33,0	18,0
E3V	23,3	0,0	30,0	31,3	40,0	33,0	28,3	4,0	34,7	20,0
E4V	34,0	0,0	31,7	35,0	40,0	34,0	29,7	0,0	28,3	18,3
E5V	34,3	1,7	30,0	31,3	39,3	31,0	35,0	0,0	31,3	20,7
E6V	33,3	0,0	32,0	31,7	40,0	32,0	35,0	0,0	30,7	21,0
<i>Media±DE</i>	33,0±3,9	0,3±0,6	32,2±2,0	33,0±2,3	38,3±1,7	32,2±0,9	31,7±2,3	1,6±1,7	31,9±2,1	19,6±1,6

El análisis de la sensibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp. (tabla 6), indica que éstas en general fueron resistentes a fosfomicina y a ácido nalidíxico, pero fueron sensibles ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina, gentamicina, enrofloxacin y norfloxacin. En el caso de la cepa C2V tuvo resistencia intermedia a norfloxacin.

Tabla 6. Sensibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp.

Cepa	Penicilinas	Fosfonatos	Fenicoles		Tetraciclinas		Aminoglucósidos	Quinolonas			N° antibióticos a los que muestra resistencia
	Ampicilina (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Acido nalidíxico (30 µg)	Enrofloxacin (5 µg)	Norfloxacin (10 µg)	
C1V	S*	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
C2V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	I	2
F1V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
E1V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
E2V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
E3V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
E4V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
E5V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2
E6V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	2

\*R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible

El 100% de las cepas de *Vibrio* spp. aisladas mostraron ser resistentes a dos de los antibióticos ensayados (fosfomicina y ácido nalidíxico); el hecho de que las cepas de *Vibrio* spp. fuesen resistentes a algunos de los antibióticos es un aspecto común entre *Vibrio* spp. aislados de langostinos en cultivo, así por ejemplo, Banerjee et al. (2012), reportaron que el 97,6% de las cepas de *Vibrio* spp. que aislaron de langostineras en Malasia fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos que ensayaron, por otra parte el 75% de las cepas analizadas por Rebouças et al. (2011), en Brasil y el 61% de las cepas estudiadas por Albuquerque et al. (2015), también mostraron ser resistentes al menos a un antibiótico; por lo que se puede concluir que la tasa de resistencia antibiótica es alta entre las cepas de *Vibrio*.

Debido a que las cepas mostraron ser resistentes a dos antibióticos correspondientes a las familias fosfonatos (fosfomicina) y quinolonas (ácido nalidíxico), pero no mostraron resistencia a antibióticos de al menos tres de las familias ensayadas (criterio establecido para declarar multiresistencia), ninguna de las cepas se calificó como multiresistente.

Respecto a la resistencia a los antibióticos fosfomicina y ácido nalidíxico que se encontraron en esta investigación, no se trata de una resistencia que se halle presente en todas las cepas de *Vibrio*, como lo demuestran estudios como los de Sotomayor et al. (2019) que reportaron en cepas de dicha especie, 100%; de sensibilidad a ácido nalidíxico y 95% a fosfomicina. Sin embargo no es de sorprender la existencia de resistencia antibiótica en *Vibrio* spp, puesto que como lo ha mostrado Zhao et al.

(2018) en estas cepas es posible localizar un gran número de genes de resistencia a antibióticos.

#### 4.4. Diámetro de halos de inhibición de bacterias ácido lácticas en *Vibrio* spp.

En las tablas 7 a 9 se observan los diámetros promedio de los halos de inhibición en *Vibrio* spp. usando las cepas de bacterias ácido lácticas, se apreció que las cepas C2L, C4L y F2L, no produjeron ninguna inhibición tanto al ser aplicadas como sobrenadante o como cultivo puro, careciendo de actividad probiótica *in vitro*. La cepa F5L no produjo inhibición al ser aplicado como cultivo puro, y solo inhibió a una de las seis cepas de *Vibrio* spp. al ser aplicada como sobrenadante, poseyendo casi nula actividad prebiótica. Por otra parte las cepas F1L, C1L y F3L fueron las que produjeron mayores halos de inhibición en todas las cepas de *Vibrio* spp., ya sea aplicadas como cultivo o como sobrenadante, seguidas de las cepas F4L y C3L.

Tabla 7. Diámetro promedio (mm) de los halos en el ensayo de inhibición de *Vibrio* spp. con sobrenadante y cultivo puro de las bacterias ácido lácticas: C1L, C2L y C3L

Cepa de <i>Vibrio</i> spp.	Sobrenadante			Cultivo		
	C1L	C2L	C3L	C1L	C2L	C3L
C1V	2	0	0	4	0	0
C2V	13	0	0	2	0	0
E2V	9	0	0	10	0	0
E3V	2	0	10	5	0	6
E5V	2	0	10	5	0	10
E6V	5	0	11	10	0	10
<i>Media±DE</i>	5,5±4,6 <sup>a*</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	5,2±5,7 <sup>a</sup>	6,0±3,3 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>	4,3±5,0 <sup>ab</sup>

\* Letras diferentes indican resultados estadísticamente diferentes

Tabla 8. Diámetro promedio (mm) de los halos en el ensayo de inhibición de *Vibrio* spp. con sobrenadante y cultivo puro de las bacterias ácido lácticas: C4L, F1L y F2L

Cepa de <i>Vibrio</i> spp.	Sobrenadante			Cultivo		
	C4L	F1L	F2L	C4L	F1L	F2L
C1V	0	5	0	0	10	0
E1V	0	12	0	0	15	0
E2V	0	5	0	0	15	0
E4V	0	5	0	0	5	0
E5V	0	5	0	0	10	0
F1V	0	5	0	0	10	0
<i>Media±DE</i>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	6,2±2,9 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>	10,8±3,8 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>c</sup>

\* Letras diferentes indican resultados estadísticamente diferentes

Tabla 9. Diámetro promedio (mm) de los halos en el ensayo de inhibición de *Vibrio* spp. con sobrenadante y cultivo puro de las bacterias ácido lácticas: F3L, F4L y F5L

Cepa de <i>Vibrio</i> spp.	Sobrenadante			Cultivo		
	F3L	F4L	F5L	F3L	F4L	F5L
C2V	15	0	15	18	0	0
E1V	12	5	0	15	8	0
E3V	5	5	0	10	2	0
E4V	10	2	0	9	10	0
E6V	5	10	0	10	14	0
F1V	5	11	0	8	14	0
<i>Media±DE</i>	8,7±4,3 <sup>ab*</sup>	5,5±4,3 <sup>bcd</sup>	2,5±6,1 <sup>cd</sup>	11,7±3,9 <sup>a</sup>	8,0±5,9 <sup>abc</sup>	0,0±0,0 <sup>d</sup>

\* Letras diferentes indican resultados estadísticamente diferentes

De las nueve cepas de bacterias ácido lácticas ensayadas, tres tuvieron el máximo efecto inhibitor contra *Vibrio* spp. tanto como al ser aplicadas como cultivo o como sobrenadante, seguidas de otras dos que tuvieron menor efecto (F4L y C3L) y finalmente por otras tres que no tuvieron efecto inhibitor alguno (C2L, C4L y F2L); en particular las cepas que tuvieron el máximo efecto inhibitor produjeron halos entre 5,5±4,6 mm y 11,7±3,9 mm; diámetros similares estos, han sido reportados por Le & Yang (2018) en su investigación sobre el efecto de *Lactobacillus* spp. aislados de langostino fermentado en la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus*, los cuales mostraron diámetros de los halos de inhibición mayores a 8 mm.

#### 4.5. Supervivencia de langostinos infectados con *Vibrio* spp. y tratados con cepas de bacterias ácido lácticas

La supervivencia de los langostinos durante la fase de experimentación *in vivo* se reporta en las figuras 1 y 2, en la primera de ellas no se considera la mortalidad originada por los muestreos en los días 1, 5 y 8 del experimento (dos langostinos

sacrificados/muestreo para poder hacer el recuento de colonias de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas); mientras que en la segunda si se considera tal mortalidad. En ambos casos se observa que la supervivencia en los tratamientos en los que se empleó las cepas de bacterias ácidos lácticos potencialmente probióticas (F1L y C1L) consistentemente tuvieron una supervivencia superior a la del tratamiento testigo, en que no se aplicó bacterias ácido lácticas.

El análisis estadístico aplicado a la supervivencia al final de los ocho días de experimentación, confirmó que considerando o no la mortalidad debido a los muestreos, los tratamientos en que se aplicaron las cepas F1L y C1L, obtuvieron supervivencias estadísticamente superiores; en el caso de no tomar en cuenta la mortalidad por muestreos, se obtuvo 92,3% de supervivencia en los tratamientos con cepas BAL frente a 51,3% en el testigo y cuando se tomó en cuenta la mortalidad por muestreos, se obtuvo 53,8% en los tratamientos con cepas BAL frente a 12,8% en el testigo.

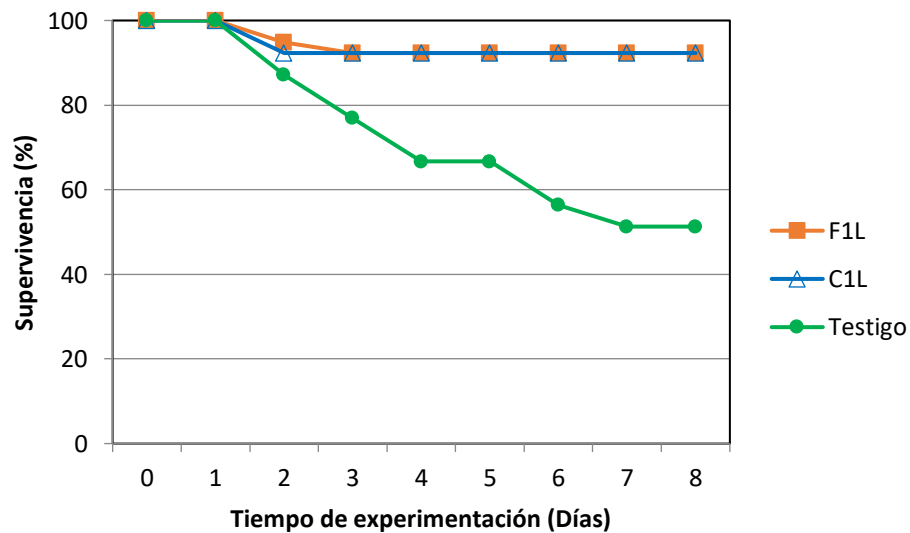


Figura 1. Supervivencia de langostinos en experimentación según tratamiento, no considerando la mortalidad por los muestreos

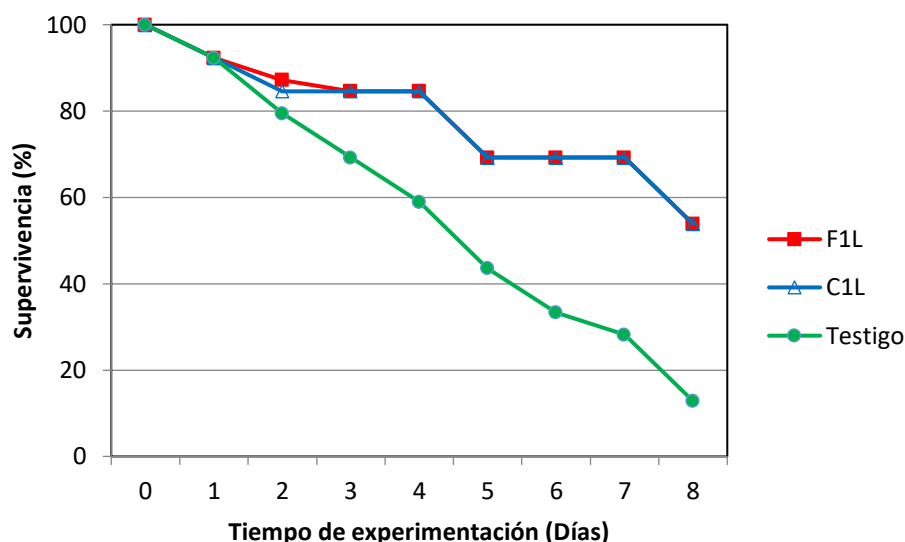


Figura 2. Supervivencia de langostinos en experimentación según tratamiento, considerando la mortalidad por los muestreos

Tabla 10. Supervivencia (%) (Media±DE) de langostinos según tratamiento en el ensayo *in vivo*

Tratamiento	Supervivencia (%) (Media±DE)	
	Mortalidad por muestreos No considerada	Mortalidad por muestreos Considerada
Testigo	51,3±4,4 <sup>b*</sup>	12,8±4,4 <sup>b</sup>
F1L	92,3±0,0 <sup>a</sup>	53,8±0,0 <sup>a</sup>
C1L	92,3±0,0 <sup>a</sup>	53,8±0,0 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes indican resultados estadísticamente diferentes

Respecto a la supervivencia de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. al ser tratados con alimento suplementado con las cepas ácido lácticas F1L y C1L, se encontró que tuvieron una superior a la de los langostinos infectados que no recibieron alimento con cepas ácido lácticas (92,3% frente a 51,3%); estos datos muestran una tendencia similar a la reportada por Karthik et al. (2014), quienes ensayaron una cepa de *Lactobacillus* sp. contra *Vibrio harveyi* en un ensayo *in vivo* en langostinos *Penaeus monodon* y *L. vannamei*, encontrando que a los diez días de iniciada la infección experimental y el tratamiento con *Lactobacillus* sp., las supervivencias de *P. monodon* y *L. vannamei* tratados con la cepa de *Lactobacillus* sp. fueron de 94% y 88%, mientras que los testigos tuvieron supervivencias de 20% y 12% respectivamente; esto es

compatible con un efecto benéfico de las cepas de bacterias ácido lácticas en el tratamiento de vibriosis en langostinos.

#### 4.6. Recuento de colonias de *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente y tratados con cepas de bacterias ácido lácticas

En la tabla 11 se muestra el recuento de *Vibrio* spp. (UFC/g) en el hepatopáncreas de los langostinos durante el experimento *in vivo*. Al inicio de la experimentación y hasta el día 5, el recuento de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de los langostinos en experimentación no mostraron diferencia estadística entre todos los tratamientos, sin embargo en el día 8 de experimentación se observó que el recuento de *Vibrio* spp. fue significativamente menor en los tratamientos con bacterias ácido lácticas comparados con el tratamiento testigo en que no se aplicó bacterias ácido lácticas.

Tabla 11. Recuento de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de langostinos durante el ensayo *in vivo*.

Día de experimentación	Recuento de <i>Vibrio</i> spp. (UFC/g)		
	Testigo	FIL	C1L
1	$1,50 \times 10^1 \pm 1,76 \times 10^{1a*}$	$1,23 \times 10^1 \pm 4,04 \times 10^{0a}$	$6,67 \times 10^0 \pm 1,15 \times 10^{0a}$
5	$5,05 \times 10^5 \pm 2,14 \times 10^{5a}$	$3,64 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^{5a}$	$3,80 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^{5a}$
8	$1,02 \times 10^6 \pm 4,97 \times 10^{5a}$	$9,64 \times 10^4 \pm 3,59 \times 10^{4b}$	$9,33 \times 10^4 \pm 4,50 \times 10^{4b}$

\* Letras diferentes indican resultados estadísticamente diferentes

En cuanto al recuento de colonias de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. y tratados con las cepas de bacterias ácido lácticas, fueron similares a aquellos del tratamiento testigo, hasta el día cinco post-infección, sin embargo para el día ocho, se observó una menor carga de *Vibrio* spp. en los tratados con bacterias ácido lácticas ( $9,64 \times 10^4$  y  $9,33 \times 10^4$  UFC/g) frente al testigo ( $1,02 \times 10^6$  UFC/g); indicando que las bacterias ácido lácticas tienen un efecto inhibidor contra *Vibrio* spp. *in vivo*, situación que también ha sido observado en los estudios realizados por Huynh et al. (2018, 2019) y Karthik et al. (2014), quienes reportan que la adición de *Lactobacillus* sp. en el alimento de langostino pudo modular la población bacteriana en el intestino de *L. vannamei*, reduciendo la presencia de bacterias patógenas como *Vibrio* y *Photobacterium*.

De manera general se puede afirmar que las cepas de bacterias ácido lácticas C1L y FIL mostraron poder inhibidor de *Vibrio* spp. en langostinos en ensayo *in vivo*.

## V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron nueve cepas de *Vibrio* spp., principalmente del hepatopáncreas de *L. vannamei* y nueve cepas de bacterias ácido lácticas principalmente del intestino de *L. vannamei*
2. Las nueve cepas de *Vibrio* spp. mostraron ser resistentes a fosfomicina y ácido nalidíxico pero sensibles a oxitetraciclina, ampicilina, florfenicol, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, norfloxacin y enrofloxacin.
3. Las cepas de bacterias ácido lácticas F1L, C1L y F3L mostraron tener actividad inhibitoria *in vitro* en todas las cepas de *Vibrio* spp., tanto al ser aplicadas como cultivos puros así como al aplicar el sobrenadante del cultivo centrifugado.
4. Las dos cepas de bacterias ácido lácticas empleadas en el ensayo *in vivo*: F1L y C1L mostraron incrementar la supervivencia de langostinos infectados experimentalmente con un *pool* de cepas de *Vibrio* spp (supervivencia de 92,3% para los tratamiento con bacterias ácido lácticas y 51,3% para el testigo).
5. Las dos cepas de bacterias ácido lácticas empleadas en el ensayo *in vivo*: F1L y C1L redujeron el recuento de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de langostinos infectados experimentalmente con *Vibrio* spp ( $9,64 \times 10^4$  y  $9,33 \times 10^4$  UFC/g para los tratamiento con bacterias ácido lácticas y  $1,02 \times 10^6$  UFC/g para el testigo).
6. Las dos cepas de bacterias ácido lácticas empleadas en el ensayo *in vivo*: F1L y C1L demostraron tener potencial probiótico frente a *Vibrio* spp. resistente y sensible a antibióticos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Dados los buenos resultados obtenidos por algunas de las cepas de bacterias ácido lácticas, en los ensayos de inhibición de *Vibrio* spp. *in vitro* e *in vivo*, se recomienda continuar con el aislamiento y evaluación de las propiedades probióticas de este tipo de bacterias obtenidas de *Litopenaeus vannamei*.
2. Ensayar mezclas de bacterias ácido lácticas nativas en la inhibición de *Vibrio* spp.

## 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, 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. H. S. dos F. (2015). Antibiotic-Resistant Vibrios in Farmed Shrimp. *BioMed Research International*, 2015, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/505914>
- Balcazar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- 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>
- Cayul, A. A. (2003). *Estudio de resistencia a antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria, de patógenos bacterianos aislados de metritis bovina en rebaños lecheros de la décima región* [Tesis de Médico Veterinario, Universidad Austral de Chile]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc385e/doc/fvc385e.pdf>
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2019). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100* (29th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED29:2019&scope=user>
- Cornejo-Granados, F., López-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Brieba, L. G., Viana, M. T., Sotelo-Mundo, R. R., &

- Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of pacific whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between wild, aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w>
- Done, H. Y., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2015). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture?. *The AAPS Journal*, 17(3), 513-524. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9722-z>
- Esguerra, D. A. (2012). *Evaluación en un sistema cerrado de cuatro aislados bacterianos con potencial probiótico en la dieta de tilapia Oreochromis niloticus* [Tesis de Biólogo Marino, Universidad Jorge Tadeo Lozano]. <http://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/1313/T996.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Flegel, T. W., Lightner, D. V., Lo, C.-F., & Owens, L. (2008). Shrimp Disease Control: Past, Present and Future. En M. G. Bondad-Reantaso, C. V. Mohan, M. Crumlish, & R. P. Subasinghe (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture VI* (pp. 355 – 378). Asian Fisheries Society. [http://www.fhs-afs.net/daa\\_vi\\_files/27.pdf](http://www.fhs-afs.net/daa_vi_files/27.pdf)
- Gómez-Gil, B. (2005). *Bacteriología de camarones*. <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Bacteriologia%20de%20camarones.pdf>
- Huynh, T.-G., Chi, C.-C., Nguyen, T.-P., Tran, T.-T.-T. H., Cheng, A.-C., & Liu, C.-H. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus*

- vannamei*. *Aquaculture Research*, 49(7), 2416-2428. <https://doi.org/10.1111/are.13701>
- 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), 807-817. <https://doi.org/10.1111/are.13951>
- 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>
- 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.
- Karthik, R., Hussain, A. J., & Muthezhilan, R. (2014). Effectiveness of *Lactobacillus* sp. (AMET1506) as probiotic against vibriosis in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp aquaculture. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(SE), 297-305. <https://doi.org/10.13005/bbra/1423>
- 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>
- Lamari, F., Sadok, K., Bakhrouf, A., & Gatesoupe, F.-J. (2014). Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemia nauplii*. *Aquaculture International*, 22(2), 699-709. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9699-5>

- Le, B., & Yang, S. H. (2018). Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Microbiology*, 56(2), 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>
- Letchumanan, V., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). An insight of traditional plasmid curing in *Vibrio* species. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00735>
- Li, Z., Chen, S., Xu, C., Ju, L., & Li, F. (2018). Rapid subtyping of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by fourier transform infrared spectroscopy with chemometric analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 155, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.003>
- Lin, H., Yu, M., Wang, X., & Zhang, X.-H. (2018). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of vibrios. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4531-2>
- Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., & Liu, C.-H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 837-844. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.012>
- Lomelí-Ortega, C. O., & Martínez-Díaz, S. F. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>
- Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Gomez-Gil, B., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. I., Audelo-Naranjo, J. M., & Zamudio-Armenta, O. O. (2015). Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Latin american journal of aquatic research*, 43(4), 766-775. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue4-fulltext-15>

- Martínez, C. (2018). *Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <http://eprints.ucm.es/46375/1/T39569.pdf>
- Md Zoqratt, M. Z. H., Eng, W. W. H., Thai, B. T., Austin, C. M., & Gan, H. M. (2018). Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: Implications for aquaculture research and management. *PeerJ*, 6, e5826. <https://doi.org/10.7717/peerj.5826>
- Millanao, A., Barrientos, M., Gómez, 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.), *Guía técnica—Patología e inmunología de camarones penaeidos* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 117-134). Programa CYTED Red II-D Vannamei. <http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf>
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1999). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. NCCLS Document M7-A3* (3rd Edition). NCCLS.
- Otero, J. P. (2018). *Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco Litopenaeus vannamei y sus métodos de control* [Trabajo de titulación de Ingeniero Acuicultor, Universidad Técnica de Machala]. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12225/1/DE00002\\_EXAMEN\\_COMPLEXIVO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12225/1/DE00002_EXAMEN_COMPLEXIVO.pdf)

- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 5(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Quispe, W. R. (2017). *Aislamiento de Lactobacillus sp.de "trucha arco iris" Oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a Yersinia ruckeri en Puno* [Tesis de Licenciado en Biología, Universidad Nacional del Altiplano]. [http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe\\_Gallegos\\_Wilson\\_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe_Gallegos_Wilson_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rebouças, R. H., de Sousa, O. V., Sousa, A., Vasconcelos, F. R., Barroso, P., & Silva, R. H. (2011). Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. *Environmental Research*, 111(1), 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.09.012>
- Rico, A., Jacobs, R., Van den Brink, P. J., & Tello, A. (2017). A probabilistic approach to assess antibiotic resistance development risks in environmental compartments and its application to an intensive aquaculture production scenario. *Environmental Pollution*, 231, 918-928. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.079>
- 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., Espinosa, A., & Bermúdez, M. del C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32.

- Santos, A. (2017). *Importancia de los plásmidos ColE1 en la resistencia a antibióticos* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <http://eprints.ucm.es/44191/1/T39064.pdf>
- Seguel, V. A. (2009). *Evaluación de la susceptibilidad y determinación de la concentración inhibitoria mínima de cuatro antibióticos blindados en agentes bacterianos asociados a enfermedades de salmonídeos* [Tesis de médico veterinario, Universidad Austral de Chile]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc385e/doc/fvc385e.pdf>
- Serrano, L. V. (2014). *Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida* [Tesis de Ingeniero en Acuicultura, Escuela Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25086/1/Tesis%20Lizette%20Serrano.pdf>
- 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>
- Shakerian, A., Barton, M. D., Akinbowale, O. L., & Khamesipour, F. (2018). Antimicrobial resistance profile and resistance genes of *Vibrio* species isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) raised in Iran. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68(1), 79-88. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15566>
- Silva, W., Olea, A., Cachicas, V., Fernández, J., Ibáñez, D., Hormazábal, J. C., García, J., & Maldonado, A. (2008). *Manual de Procedimientos Aislamiento, Identificación y Caracterización de Vibrio parahaemolyticus*. Ministerio de Salud - Instituto de Salud

- Pública. [https://www.medica-tec.com/arg/files/Manual%20de%20Procedim.%20Chrom.Vibrio%20-%20Chile\[1\].pdf](https://www.medica-tec.com/arg/files/Manual%20de%20Procedim.%20Chrom.Vibrio%20-%20Chile[1].pdf)
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* hatcheries. *PLOS ONE*, 14(1), e0210478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- 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>
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Watts, J., Schreier, H., Lanska, L., & Hale, M. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6), 158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- World Bank. (2014). *Reducing disease risk in aquaculture*. World Bank. <http://documents.worldbank.org/curated/en/110681468054563438/pdf/882570REPLACEM00NAM E0Reantaso0Melba.pdf>

- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H., & Yi, M. (2018). Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 76, 368-379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.020>
- Zhao, Y., Zhang, X., Zhao, Z., Duan, C., Chen, H., Wang, M., Ren, H., Yin, Y., & Ye, L. (2018). Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp. *Journal of Hazardous Materials*, 350, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.004>
- 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>

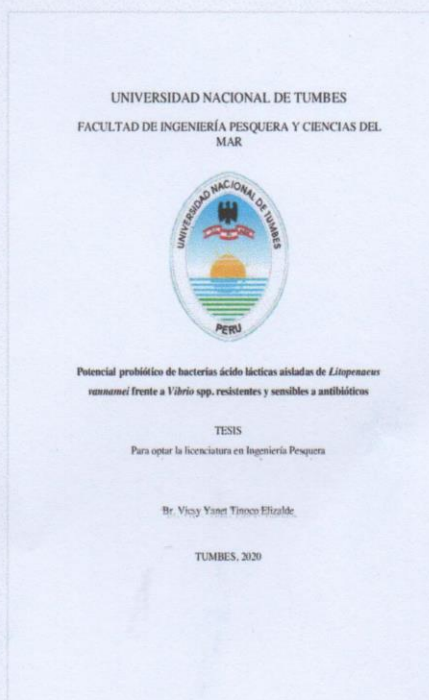


## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Vicsy Tinoco  
Título del ejercicio: Tesis  
Título de la entrega: Tesis Vicsy Tinoco  
Nombre del archivo: is\_Vicsy\_corregido\_AOZ\_absolviendo\_observaciones\_jurado\_...  
Tamaño del archivo: 588.25K  
Total páginas: 51  
Total de palabras: 12,539  
Total de caracteres: 69,138  
Fecha de entrega: 13-jun-2021 08:48a.m. (UTC-0500)  
Identificador de la entrega... 1605588247



# Tesis Vicsy Tinoco

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>12%</b>	<b>11%</b>	<b>9%</b>	<b>%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>repositorio.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>renati.sunedu.gob.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>Leonardo Tachibana, Guilherme Silveira Telli, Danielle de Carla Dias, Giovani Sampaio Gonçalves et al. " and in diets for Nile tilapia ( ): Effects on growth performance, gut microbiota modulation and innate immunology ", Aquaculture Research, 2020</b> Publicación	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>www.scielo.org.mx</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>repositorio.unap.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>Murugadas Vaiyapuri, Sravya Pailla, Madhusudana Rao Badireddy, Devika Pillai et</b>	<b>&lt;1%</b>



al. "Antimicrobial resistance in Vibrios of shrimp aquaculture: Incidence, identification schemes, drivers and mitigation measures", *Aquaculture Research*, 2021

Publicación

- |    |   |      |
|----|---|------|
| 8  | Usman Dawood Butt, Na Lin, Najeeb Akhter, Tooba Siddiqui, Sihui Li, Bin Wu. "Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture", <i>Fish &amp; Shellfish Immunology</i> , 2021 | <1 % |
| 9  | <a href="https://link.springer.com">link.springer.com</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 10 | <a href="https://repositorio.urp.edu.pe">repositorio.urp.edu.pe</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 11 | <a href="https://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 12 | <a href="https://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 13 | <a href="https://repositorio.usfq.edu.ec">repositorio.usfq.edu.ec</a><br>Fuente de Internet   | <1 % |
| 14 | Amin Hashemi Panah, Gholamreza Rafiee, Kamran Rezaei Tavabe, Sepideh Bozorgi, Alireza Mirvaghefi. " Effects of utilization of and as probiotic to improve quality of west   | <1 % |



white leg shrimp ( ) postlarvae ", Aquaculture Research, 2021

Publicación

15 repositorio.concytec.gob.pe <1 %  
Fuente de Internet

16 Ma. de Jesús Durán-Avelar, Alejandro Vázquez-Reyes, Ana Lourdes González-Mercado, José Francisco Zambrano-Zaragoza et al. " A- and -like gene identification in strains in Mexico ", Journal of Fish Diseases, 2018 <1 %  
Publicación

17 Rika Nakamura, Ivane R. Pedrosa - Gerasmio, Rod Russel R. Alenton, Reiko Nozaki, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono. "Anti - PirA - like toxin immunoglobulin (IgY) in feeds passively immunizes shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease", Journal of Fish Diseases, 2019 <1 %  
Publicación

18 Jaypee Solsona Samson, Karl Marx A Quiazon, Casiano H Choresca. "Application of probiotic Bacillus spp. isolated from African nightcrawler (Eudrilus eugeniae) on Nile Tilapia (Oreochromis niloticus L.)", Cold Spring Harbor Laboratory, 2020 <1 %  
Publicación



19 D. Joshua Parris, Michael M. Morgan, Frank J. Stewart. "Feeding Rapidly Alters Microbiome Composition and Gene Transcription in the Clownfish Gut", Applied and Environmental Microbiology, 2019  
Publicación <1 %

20 [eur-lex.europa.eu](http://eur-lex.europa.eu)  
Fuente de Internet <1 %

21 [www.dspace.espol.edu.ec](http://www.dspace.espol.edu.ec)  
Fuente de Internet <1 %

22 B. C. J. De Silva, Sabrina Hossain, P. S. Dahanayake, Mahanama De Zoysa, Gang-Joon Heo. " Comparative prevalence and characterization of spp. isolated from live and frozen white-leg shrimp ( ) in Korean markets ", Journal of Food Safety, 2018  
Publicación <1 %

23 Qin Guo, Chunyan Zhang, Qingguo Cao, Jiahui Cai, Hui Chen. " Synergistic inhibition effects of tea polyphenols as adjuvant of oxytetracycline on and enhancement of Vibriosis resistance of ", Aquaculture Research, 2021  
Publicación <1 %

24 [dspace.bracu.ac.bd:8080](http://dspace.bracu.ac.bd:8080)  
Fuente de Internet <1 %

[repositorio.espe.edu.ec](http://repositorio.espe.edu.ec)



25	Fuente de Internet	<1 %
26	Claudio Magallanes, César Córdova, Rita Orozco. "Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú", Revista Peruana de Biología, 2013 Publicación	<1 %
27	repositorio.educacionsuperior.gob.ec Fuente de Internet	<1 %
28	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
29	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
30	www.ins.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
31	R. Prathiviraj, Riya Rajeev, Henrietta Fernandes, K. Rathna, Anuj Nishanth Lipton, Joseph Selvin, George Seghal Kiran. "A gelatinized lipopeptide diet effectively modulates immune response, disease resistance and gut microbiome in Penaeus vannamei challenged with Vibrio parahaemolyticus", Fish & Shellfish Immunology, 2021 Publicación	<1 %

32	Jianchun Shao, Wei Zhao, Siyin Han, Yang Chen, Baojie Wang, Lei Wang. " Partial replacement of fishmeal by fermented soybean meal in diets for juvenile white shrimp ( ) ", Aquaculture Nutrition, 2019 Publicación	<1 %
33	idoc.pub Fuente de Internet	<1 %
34	kundoc.com Fuente de Internet	<1 %
35	repositorio.udes.edu.co Fuente de Internet	<1 %
36	res.mdpi.com Fuente de Internet	<1 %
37	Ynon Deutsch, Lior Gur, Ilana Berman Frank, David Ezra. "Endophytes From Algae, a Potential Source for New Biologically Active Metabolites for Disease Management in Aquaculture", Frontiers in Marine Science, 2021 Publicación	<1 %
38	repositori.uji.es Fuente de Internet	<1 %
39	www.ridaa.unicen.edu.ar Fuente de Internet	<1 %

- 40 Alejandro Fenollar Penadés. "Estudio de la transmisión de resistencias a antibióticos mediante métodos moleculares en el sector avícola y su implicación para la salud pública", Universitat Politecnica de Valencia, 2020  
Publicación <1 %
- 41 Mehrdad Sarkheil, Iman Sourinejad, Maryam Mirbakhsh, Davood Kordestani, Seyed Ali Johari. " Antibacterial activity of immobilized silver nanoparticles on TEPA-Den-SiO against shrimp pathogen, sp. Persian1 ", Aquaculture Research, 2017  
Publicación <1 %
- 42 [www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)  
Fuente de Internet <1 %
- 43 Ângela Novais, Luísa Peixe. "Chapter 11 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) for Food and Water Microbiology", Springer Science and Business Media LLC, 2021  
Publicación <1 %
- 44 Alexander Varela Mejías, José Valverde Moya. "Determinación de la causa de mortalidad en un vivero del langostino gigante de agua dulce Macrobrachium rosenbergii en Costa Rica: análisis de caso", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2018  
Publicación <1 %



45 **d-nb.info**  
Fuente de Internet

<1%

46 **www.colmayor.edu.co**  
Fuente de Internet

<1%

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía Activo





**FORMATO**

**AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS EN EL REPOSITORIO  
INSTITUCIONAL DIGITAL**

**1.- IDENTIFICACIÓN PERSONAL (datos de cada uno de los autores)**

Apellidos y Nombres: Tinoco Elizalde Vicsy Yanet  
DNI: 47015098 Correo Electrónico: Uytelhan@gmail.com  
Código del alumno: 020028072 Teléfono: 920 002 002

**2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS**

Escuela Académico Profesional: Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar

Título Profesional o Grado obtenido:

Br. Ingeniería Pesquera

Autor(es): Vicsy Yanet Tinoco Elizalde

Asesor(es): Dr. Alberto Ordinola Zapata

DNI del Asesor(es): 00326333

Código ORCID del Asesor(es): 0000-002-9644-0531

Título de la Tesis: Potencial probiótico de bacterias ácidas lácticas  
aisladas de *Litopenaeus Vannamei* frente a *Vibrio* spp,  
resistentes y sensibles a antibióticos.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN  
DIRECCIÓN DE PROPIEDAD INTELECTUAL Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

### 3. TIPO DE ACCESO

- Acceso abierto\*  
 Acceso restringido\*\*

Si el autor eligió el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de Tumbes una licencia no exclusiva, para que se pueda hacer arreglos de forma en la obra y difundir en el Repositorio Institucional Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso de que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### 4. ORIGINALIDAD DEL ARCHIVO DIGITAL DE LA TESIS

Por el presente dejo constancia de que el **CD-ROM (Archivo Word y Archivo PDF)** que entrego a la Universidad, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.


### 5. AREAS DEL CONOCIMIENTO - OCDE (Metadato Obligatorio - Repositorio Institucional)

Área: Ciencias Naturales

Sub área: Ciencias Biológicas

Disciplina: Biología Celular y Microbiología

Fecha de Firma de Autorización: 11/06/2021

  
.....  
Firma del autor que autoriza  
DNI: 47015098



(\*) Acceso abierto: uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

(\*\*) Acceso restringido: el documento no se visualizará en el Repositorio.