UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA PESQUERA ACUÌCOLA

Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de *Vibrio* spp. aislados del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*, en laboratorio.

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero Acuícola

Autor:

Ismael Vicente Torres Canales

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de *Vibrio* spp. aislados del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*, en laboratorio

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Tessy Peralta Ortiz (Presidente)

Dr. Marco Antonio Zapata Cruz (Secretario)

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra (Vocal)

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de *Vibrio* spp. aislados del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*, en laboratorio

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

Br. Ismael Vicente Torres Canales (Autor)

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra (Asesor)

ORCID: 0000-0002-9637-6250

Ing. José Alberto Serna Cruz (Coasesor)

ORCID: 0000-0002-85008-0518

Tumbes, 2025

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

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

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Puerto Pizarro, el día diecisiete del mes de enero del dos mil veinticinco, siendo las diez y cuarenticinco horas, en el aula A-6 de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES, se reunieron el Jurado Calificador, designado con **Resolución Nº 025-2023/UNTUMBES-FIPCM-D**, Dra. **TESSY PERALTA ORTIZ (Presidenta), Dr. MARCO ANTONIO ZAPATA CRUZ (Secretario) y Dr. OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA (Vocal – asesor,** CODIGO ORCID N° 0000-0002-9637-6250) y al Ing. JOSÉ ALBERTO SERNA CRUZ, (CODIGO ORCID N° 0000-0002-8508-0518) como Coasesor, luego de la presentación, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: **"Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de Vibrio spp. aislados del tracto digestivo de Litopenaeus vannamei, en laboratorio"**, para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO ACUICOLA, presentado por el:

Br. ISMAEL VICENTE TORRES CANALES

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado, según el artículo Nº 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al Bachiller **ISMAEL VICENTE TORRES CANALES**, APROBADO, con calificativo:

BUENO

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

En consecuencia, queda APTO para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Pesquero Acuícola, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria Nº 30220, el Estatuto, Reglamento General de la UNTUMBES, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 11 horas y 55 minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta de sustentación.

Tumbes, 17 de enero 2025

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

Dr. MARCO A. ZAPATA CRUZ
CODIGO DE ORCID N° 0000-0002-9018-280X
DNI. N° 00219827
Secretario

Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA
CODIGO ORCID N° 0000-0002-9637-6250
DNI. N° 00204986
Vocal

C.C.:
- Jurado (03)
- Interesado
- Asesor: Dr. OSCAR A. MENDOZA N. Coasesor: Ing. JOSE A. SERNA C.
- Archivo Decanato.

Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de Vibrio spp

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	16%	5%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	repositorio.upse.edu.ec Fuente de Internet	2%
3	docplayer.es Fuente de Internet	2%
4	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	1%
5	www.dspace.espol.edu.ec Fuente de Internet	1%
6	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	1%
7	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1%
9	marviva.net Fuente de Internet	

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

ORCID: 0000-0002-9637-6250

Docente Asesor

		<1 %
10	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
11	buscador.una.edu.ni Fuente de Internet	<1 %
12	nbcgib.uesc.br Fuente de Internet	<1 %
13	erp.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	aprenderly.com Fuente de Internet	<1 %
16	repositorio.upao.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
17	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.utmachala.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
19	firmaonline.org Fuente de Internet	<1 %
20	www.cris.uns.ac.rs Fuente de Internet	<1 %

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

ORCID: 0000-0002-9637-6250

Docente Asesor

21	revistas.utm.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
22	cibnor.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %
23	bibdigital.epn.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
24	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
25	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
26	repositorio.upla.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
27	repositorioinstitucional.uabc.mx Fuente de Internet	<1 %
28	www.repositorio.unach.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
29	ciad.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 15 words
Excluir bibliografía	Activo		

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

ORCID: 0000-0002-9637-6250

Docente Asesor

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de investigación a mis padres Yalila y Vicente, a mis hermanas y mi pequeño sobrino, quienes siempre me apoyaron para enfrentar y terminar este gran reto durante mi paso por la universidad, también a Maxy, un ángel que siempre me cuida desde el cielo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas que estuvieron pendientes y me ayudaron en esta investigación, también a los profesores por impartirme sus conocimientos, especialmente al Dr. Oscar Mendoza y al Ing. José Serna por guiarme con su experiencia para presentar un buen trabajo.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 17

2. REVISIÓN DE LITERATURA 18

2.1. Antecedentes 18

2.1.1. Ácidos orgánicos en la inhibición de bacterias patógenas 18

2.1.2. Probióticos con poder antimicrobiano 21

2.2. Bases teóricas y científicas 25

2.2.1. Uso de antibióticos en acuicultura 25

2.2.2. Uso de ácidos orgánicos en acuicultura 27

2.2.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias probióticas 27

3. MATERIALES Y MÉTODOS 30

3.1. Lugar de ejecución 30

3.2. Tipo y diseño de investigación 30

3.3. Población y muestra 31

3.3.1. Población 31

3.3.2. Muestra 31

3.4. Preparación de material biológico y medios cultivo 31

3.4.1. Preparación de medios cultivo 31

3.4.2. Selección de juveniles 33

3.4.3. Aislamiento de bacterias del género Vibrio 34

3.5. Preparación de productos antimicrobianos 36

3.5.1. Preparación de ácidos orgánicos 36

3.5.2. Preparación de probióticos 36

3.6. Pruebas de sensibilidad 37

3.6.1. Prueba de concentración mínima inhibidora (MIC) 37

3.6.2. Prueba de concentración mínima bactericida (CMB) 38

3.6.3. Prueba de antagonismo 39

3.7. Procesamiento y análisis de datos 40

3.7.1. Diseño experimental 40

3.7.2. Evaluación estadística 40

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41

4.1. Animales con signos de Enfermedad 41

4.2. Caracterización fenotípica de *Vibrio spp.* 41

4.3. Concentración mínima inhibitoria 42

4.4. Concentración mínima bactericida 44
4.5. Medición del diámetro de los halos de inhibición 45
5. CONCLUSIONES 50
6. RECOMENDACIONES 51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de colonias en agar TCBS. 41

Tabla 2. Caracterización de colonias en ChromAgar. 41

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de los ácidos orgánicos frente a cepas de Vibrio spp. 43

Tabla 4. Concentración mínima bactericida de los ácidos orgánicos frente a cepas de Vibrio spp. 455

Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición del probiótico A 46

Tabla 6. Diámetro de los halos de inhibición del probiótico B 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Instalaciones del laboratorio Agroacuanálisis S.R.L. 30

Figura 2. Preparación de medios de cultivo 33

Figura 3. Juveniles de *Litopenaeus vannamei* 33

Figura 4. Cultivo en agar TCBS 35

Figura 5. Cultivos selectivos cromogénicos (ChromAgar *Vibrio*) 35

Figura 6. Tubos de ensayo con caldo TSB e inoculados con *Vibrio* spp. 35

Figura 7. Ácidos orgánicos C y D preparados 36

Figura 8. Preparación de los probióticos 37

Figura 9. Prueba de concentración mínima inhibidora 38

Figura 10. Prueba de concentración mínima bactericida. 38

Figura 11. Prueba de antagonismo. 39

Figura 12. Prueba de concentración mínima inhibidora 42

Figura 13. Prueba de concentración mínima bactericida 44

Figura 14. Halos de inhibición de los probióticos A y B 46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del probiótico A 61

Anexo 2. Composición del probiótico B 61

Anexo 3. Resultados obtenidos de la prueba de concentración mínima inhibitoria 59

Anexo 4. Resultados obtenidos de la prueba de concentración mínima bactericida 63

Anexo 5. Resultados obtenidos de la prueba de antagonismo 64

Anexo 6. Análisis de varianza para el probiótico A 65

Anexo 7. Análisis de varianza para el probiótico B 65

Anexo 8. Prueba t para dos muestras (cepa 1V2 del probiótico A y B) 66

Anexo 9. Prueba t para dos muestras (cepa 2V3) del probiótico A y B 66

Anexo 10. Prueba t para dos muestras (cepa 3V4) del probiótico A y B 67

Efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de *Vibrio* spp. aislados del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei* en laboratorio

Br. Ismael Vicente Torres Canales[1]
Dr. Oscar A. Mendoza Neyra[2]
Ing. José Alberto Serna Cruz[3]

RESUMEN

La presente investigación se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de dos ácidos orgánicos y dos probióticos en la inhibición *in vitro* de Vibrio spp. aislados del hepatopáncreas e intestino de juveniles de *Litopenaeus vannamei*, en laboratorio. Luego de obtener las muestras de langostino que presentaban signos clínicos patológicos, se procedió a extraer el hepatopáncreas e intestino para realizar cultivos en placas y aislar a *Vibrio spp.* obteniéndose 3 cepas. Los productos antimicrobianos (ácidos orgánicos y probióticos) fueron preparados y activados. Posteriormente se realizaron las pruebas de sensibilidad (prueba de concentración mínima inhibidora, prueba de concentración mínima bactericida y prueba de antagonismo), enfrentando tanto los ácidos orgánicos; C (ácido cítrico, ácido gálico, acido fumárico y ácido láctico) y D (ácido propiónico, ácido acético, acido fórmico) contra las tres cepas de *Vibrio spp.* y de la misma forma los probióticos A (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter sp.*) y B (*Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis)*. Los resultados mostraron que el ácido orgánico C tuvo una mejor eficacia al tener una mejor concentración mínima de inhibición y concentración mínima bactericida. Los probióticos, demostraron tener capacidad antagónica, al poder eliminar las cepas de *Vibrio spp.*

Palabras clave: ácidos orgánicos, probióticos**,** *Vibrio spp.*, pruebas de sensibilidad, halos.

[1]Estudiante de la Escuela de Ingeniería Pesquera Acuícola de la Universidad Nacional de Tumbes
Facultad de Ingeniería de Pesquera y Ciencias del Mar
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera Acuícola
e-mail: ismaelvicentetorresc@gmail.com
[2]Docente de la Universidad Nacional de Tumbes
e-mail: omendozan@untumbes.edu.pe
[3] Ingeniero Pesquero de la Universidad Nacional de Tumbes
e-mail: jasc29887@gmail.com

Effect of commercial products antibacterial on growth *Vibrio spp*. isolated from digestive tract of *Litopenaeus vannamei* in laboratory

Br. Ismael Vicente Torres Canales[1]
Dr. Oscar A. Mendoza Neyra[2]
Ing. José Alberto Serna Cruz[3]

ABSTRACT

This research evaluated the effect of two organic acids and two probiotics on growth or inhibition in laboratory of *Vibrio spp*. isolated from hepatopancreas and intestine of juveniles of *Litopenaeus vannamei*. After obtaining the shrimp samples with clinical pathological signs, the hepatopancreas and intestine was grown and isolated *Vibrio spp* on plates, obtaining three differential strains. Antimicrobial products (organic acids and probiotics) were prepared and activated. Subsequently, sensitivity tests were carried out (minimum inhibitory concentration test, minimum bactericidal concentration test and antagonism test), facing both organic acids; C (citric acid, gallic acid, fumaric acid and lactic acid) and D (propionic acid, acetic acid, formic acid) against the three strains of *Vibrio spp*. and the same way probiotics A (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp*., *Nitrobacter sp*.) and B (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis*). The results showed that organic acid C had better efficacy by having a better minimum inhibition concentration and minimum bactericidal concentration. Probiotics demonstrated to have antagonistic capacity, being able to eliminate strains of *Vibrio spp*.

Keywords: organic acids, probiotics, *Vibrio spp*., sensitivity tests, halos.

---

[1]Student of the School of Aquaculture Fisheries Engineering of the National University of Tumbes
Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences
Professional Academic School of Industrial Fisheries Engineering
e-mail: ismaelvicentetorresc@gmail.com
[2]Professor the National University of Tumbes
e-mail: omendozan@untumbes.edu.pe
[3]Fisheries engineer from the National University of Tumbes
e-mail: jasc29887@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La población humana en el planeta cada día, crece de manera exponencial estimándose que estamos acercándonos a los 8 mil millones de habitantes, eso hace que cada año se necesite más alimento para satisfacer esta necesidad primaria que tenemos, razón por lo cual la acuicultura marina-continental, tanto de peces como crustáceos, en especial del camarón de mar del género Litopenaeus se ha empoderado de los mercados del mundo. La región Tumbes en Perú, también aporta su cuota de producción al mundo; aun cuando su cultivo tiene altos y bajos debido a los problemas patológicos que se presentan.

La producción mundial del langostino *Litopenaeus vannamei* proveniente de la industria acuícola alcanzó una tasa promedio anual de crecimiento del 8,2% durante el periodo 2009 al 2018. En el Perú, la producción de langostino blanco *L. vannamei* ascendió a 4,9 mil toneladas, lo que corresponde al 31,5% de la producción nacional de acuicultura, concentrándose en las regiones de Tumbes y Piura, durante el 2018 (FAO, 2020; PRODUCE, 2019).

En la actualidad el cultivo de *L. vannamei* viene siendo afectado por agentes patógenos de origen bacteriano, virales, micóticos y parasitarias, causantes de altas mortalidades y pérdidas económicas. Esto, debido principalmente a la intensificación de los sistemas de cultivo (Morales y Cuéllar-Anjel, 2008).

Los principales agentes patógenos bacterianos que afectan considerablemente la producción de los sistemas de cultivo de *L. vannamei*, son del género Vibrio, que han causado elevadas mortalidades durante el ciclo larval y de engorde (Soltani et al., 2010; Chandrakala & Priya, 2017).

La camaronicultura enfrenta desafíos en el tratamiento y prevención de enfermedades bacterianas. La mayoría de las empresas acuícolas utilizan antibióticos para combatir estas enfermedades; sin embargo, su uso excesivo y sin regulación adecuada genera contaminación del

agua y altera los ecosistemas. Esto provoca la propagación de genes resistentes entre comunidades bacterianas a través de la transferencia horizontal, aumentando la resistencia a diversos antibióticos y originando graves problemas de salud humana (Pepi & Focardi, 2021).

Por tal motivo, este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de productos antibacterianos comerciales sobre el crecimiento de *Vibrio* spp. aislados del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*, en laboratorio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

2.1.1. Ácidos orgánicos en la inhibición de bacterias patógenas

Muñoz (2022) realizó la validación de estrategias profilácticas en larvas de *L. vannamei*, enfrentando en laboratorio, bacterias patógenas de género Vibrio con productos de uso común, encontrando que los aceites esenciales y ácidos orgánicos poseen mayor antagonismo frente a *Vibrio* spp. Asimismo, Silva et al. (2021) realizaron experiencias en larvicultura utilizando ácidos orgánicos, obteniendo que la mezcla de ácidos orgánicos aumenta la supervivencia y productividad de larvas de langostinos *Peneidos*. También Reyes (2017), aisló a *Vibrio parahaemolyticus* de *Litopenaeus vannamei,* para enfrentarlos a ácidos orgánicos y fitoquímicos, y así evaluar el efecto sinérgico antimicrobiano. Para ello aplicó ácidos (ácido acético, butírico, nicotínico y propiónico), teniendo una mayor efectividad antimicrobiana ($p<0,05$) y su concentración de inhibición fue distinta en la evaluación de cada cepa, en rango de 11,23-50 mm, con lo cual demostró *in vitro*, que los ácidos orgánicos presentan un amplio espectro de inhibición de forma individual o sinérgico frente a cepas de *Vibrio parahaemolyticus* asociadas a la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda.

Por su parte Zambrano (2023) evaluó la susceptibilidad de bacterias responsables de enfermedades en *L. vannamei* ante diferentes productos comerciales, obteniendo que los microorganismos identificados presentan resistencia ante el uso de ácidos orgánicos en concentraciones menores de 300 ppm, por lo cual requieren concentraciones mayores para inhibir su proliferación (600 ppm).

Chávez & Llanos (2015) evaluaron la capacidad antimicrobiana de ácidos orgánicos realizando el método de concentración mínima inhibitoria (MIC). Seleccionaron cepas bacterianas, las cuales fueron inhibidas por ácidos orgánicos a diferentes concentraciones. Los datos fueron evaluados por ANOVA para hallar el porcentaje de inhibición y luego realizaron la evaluación estadística por medio del análisis de varianza. Los autores concluyeron que los ácidos orgánicos utilizados presentaron actividad microbiana frente a las cepas bacterianas en laboratorio.

Da Silva et al. (2013) seleccionaron sales de ácidos orgánicos para la nutrición de camarones, analizando la inhibición *in vitro* de *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*. demostraron que, al usar ácidos orgánicos, se puede optimizar la absorción de nutrientes y la salud de los langostinos marinos. El propionato de sal presenta un gran potencial para adicionar como complemento dietético para *Litopenaeus vannamei*, debido a que redujo la concentración de los patógenos (*Vibrio*) en el microbiota intestinal ($p<0,05$), además de incrementar la digestibilidad aparente de energía ($p<0,01$) y fósforo ($p<0,02$).

Por otro lado, He et al. (2017) realizaron una experiencia de alimentación en 8 semanas, mezclando ácidos orgánicos [ácido cítrico, 25%; ácido sórbico, 16,7%] y aceites esenciales [timol, 1,7%; vanillin, 1,0%], para evaluar crecimiento, inmunidad y resistencia de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio parahaemolyticus*. Demostrando que la aplicación de esta

mezcla a la dieta mejoró significativamente la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario, incluida la lisozima, la penaeidina y la catalasa a las 48 h después de la exposición. Por lo tanto, la mezcla probada de ácidos orgánicos y aceites esenciales afecta de manera beneficiosa a la microflora intestinal y mejora la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades de *L. vannamei.*

Adams & Boopathy (2013) en su investigación realizaron medición de la efectividad mediante el método de densidad óptica y estudiar la inhibición del crecimiento de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* usando ácido fórmico. Se sembró las especies de *Vibrio* en agar de Muller-Hinton y agua de peptona alcalina, con diferentes concentraciones de ácido fórmico. Teniendo como resultado una inhibición significativa del crecimiento de *Vibrio* frente al ácido fórmico, el cual estaba a una concentración menor de 0,039%, esto indica que el ácido fórmico sirve como método alternativo para controlar y recudir la proliferación de las bacterias *Vibrio* en el cultivo de camarón.

Mine & Boopathy (2011), indicaron que el primordial componente inhibidor puede ser el efecto del pH de los ácidos orgánicos. Asimismo, refieren, concentración efectiva (EC50) de los ácidos orgánicos, eran ácido fórmico (0,023%), acético (0,041%), propiónico (0,03%) y butírico (0,066%), después de 96 h de inoculación. En cuanto a la concentración inhibitoria mínima (MIC), se determinó que el ácido fórmico al 0,035% inhibe el crecimiento de *Vibrio harveyi*.

Ng et al. (2015), mezclaron ácidos orgánicos microencapsulados (OAB) para la producción de *Litopenaeus monodon*, en estanques de tierra, alimentando con alimento comercial dieta a) y la segunda dieta mezclando suplementos de ácidos orgánicos al 2% de OAB en la etapa de engorde (dieta b). Luego de 5 meses y 2 semanas de cultivo el crecimiento fue parecido, sin

embargo, en la dieta b se encontró más bajo los nitritos y nitratos (NO2-N y NO3-N). En cuanto al conteo de las presuntas bacterias del género Vibrio, estuvieron en mínimas concentraciones.

Reyes (2018), ejecutó una investigación a cerca de la sensibilidad de especies de Vibrio frente a agentes beneficiosos (ácidos orgánicos, probióticos y aceites esenciales), para controlar enfermedades bacterianas en larvas de *Litopenaeus vannamei*. Al realizar el análisis de concentración mínima inhibitoria (MIC) y antibiogramas, de demostró que el ácido orgánico (AC10) fue eficaz para inhibir el desarrollo del 95% de las bacterias, en concentraciones inferiores a 1000 ppm; sin embargo, a 100 ppm es tóxico a nivel celular, alterando la viabilidad de los hemocitos.

2.1.2. Probióticos con poder antimicrobiano

El poder antimicrobiano de las bacterias probióticas por cepa o por mezcla de cepas, está demostrado en varios reportes de investigadores, que han mencionado haber encontrado antagonismo en bacterias patógenas para el cultivo de langostino *L. vannamei*, encontrándose los siguientes:

Urresta (2017) evaluó dos probióticos comerciales A y B a diferentes concentraciones de 5 ppm, 10 ppm y 15 ppm y como antagonistas, bacterias del género Vibrio en el cultivo larval de *L. vannamei*. Obtuvieron una disminución del crecimiento de las bacterias patógenas en todos los tratamientos, sin diferencia significativa ($p<0,05$) entre los tratamientos y controles.

Arias-Moscoso et al. (2018) usaron dos probióticos comerciales con la finalidad de mejorar la calidad de agua y los parámetros de producción en un cultivo de biofloc sin recambio de agua o recambio cero, al finalizar el ensayo los resultados obtenidos no mostraron diferencia significativa ($p<0,05$) entre los tratamientos (con probióticos) y controles (sin probióticos).

Rivera & Ríos (2010) evaluaron la efectividad del probiótico “EPICIN 3W” conformado por bacilos, lactobacilos y levaduras contra la disminución del crecimiento de dos especies de *Vibrio* (*V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*) en tanques de cultivo de postlarvas. Después de cinco semanas de cultivo observaron una disminución del crecimiento de las dos especies de *Vibrio* a diferencia del control donde se aplicó probiótico.

Abarike et al. (2018) mencionaron que en la prueba de desafío con juveniles de *Oreochromis niloticus* infectados con *Streptococcus agalactiae*, se suministraron al alimento cuatro dosis de un probiótico comercial BS (una mezcla de *B. subtilis* y *B. licheniformis*) de 3, 5, 7 y 10 $g.kg^{-1}$. Al finalizar la prueba las tasas de mortalidad de *O. niloticus* obtenida fue significativamente más altas en el grupo BS10 ($p<0,05$), concluyendo el uso de probióticos mejora el crecimiento y el estado inmunológico en el cultivo de tilapia.

Balcázar & Rojas-Luna (2007) evaluaron el poder antimicrobiano de la cepa probiótica *Bacillus subtilis* frente a tres especies de bacterias patógenas del género Vibrio (*V. alginolyticus, V. parahaemolyticus*, y *V. harveyi*) en juveniles de *L. vannamei*, determinaron que al aplicar el alimento suplementario con estas bacterias probióticas a concentración de 10^5 UFC/g desafiados con juveniles infectados con 10^5 UFC/mL de la cepa *V. harveyi*, obtuvieron que la mortalidad al final del estudio disminuyo a 18,25% comparado con el control que fue de 51,75%; asimismo, en las pruebas de sensibilidad los resultados obtenidos de 15 mm, 15 mm y 10 a 15 mm para *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. harveyi*, respectivamente.

Sotomayor y Balcázar (2003) evaluaron la capacidad antagónica de combinaciones de cepas probióticas contra Vibrios patógenos (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 y *V. parahaemolyticus* PA2) mediante pruebas de inhibición in vitro. Los resultados mostraron que las combinaciones P63-Ili, P62-P64 y P62-P63-Ili lograron inhibir a los patógenos en más del 50%. Estos hallazgos sugieren que estas mezclas de probióticos tienen un potencial prometedor para controlar la presencia de Vibrios patógenos en la acuicultura.

Leyton et al. (2014) evaluaron la actividad inhibitoria de 53 cepas de bacterias probióticas aisladas de capsulas de huevos de *Concholepas concholepas*, logrando identificar 19 cepas de *Bacillus pumilus* que inhibieron el crecimiento de *V. cholerae*, con halos de inhibición variados con un máximo de 40 mm y un mínimo de 11 mm; concluyeron que *Bacillus pumilus* tiene gran capacidad de inhibición sobre estas bacterias patógenas.

Luis (2012) aisló e identificó nueve bacterias probióticas del género Bacillus del tracto digestivo del *L. vannamei*, entre las más comunes se encuentran; *B. endophyticus, B. tequilensis, B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*, las cuales fueron enfrentados contra bacterias patógenas del género *Vibrio* (*V. cambelli, V. parahaemolyticus, V. harveyi y V. vulnificus*). En la prueba de difusión en placa de cultivo determinaron que dos especies de probióticos (*B. tequilensis y B. amyloliquefaciens*) lograron inhibir todos los Vibrios con halos de inhibición de 11,0 ±1,8 a 18,0 ±1,4 mm.

Delgado-Díaz et al. (2020) en su ensayo de sensibilidad con cuatro cepas probióticas nativas *Lactobacillus paracasei* (E91 y E107) y *Lactococcus lactis* (E33 y E72) que fueron enfrentadas con bacterias patógenas de langostino blanco *Litopenaeus vannamei*, obtuvieron halos de inhibición de 14 y 15 mm para las cepas E91 y E 33.

Las bacterias probióticas mediante sus procesos fisiológicos secretan sustancias antibacterianas denominadas metabolitos secundarios, encontramos los siguientes reportes:

Sánchez (2018) aisló bacterias con capacidad antagónica de fuentes naturales y organismos marinos, con la finalidad de inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana patógena *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND). Los metabolitos extraídos de los caldos de cultivo de 36R *Bacillus pumilus* 13L, *B. safensis* y 36Y *Pseudoalteromonas piscicida* obtuvieron 25 µg/ml MIC y 50 µg/ml MBC de actividad antimicrobiana contra el *V. parahaemolyticus*.

Leyton et al. (2012) aislaron e identificaron cinco metabolitos secundarios conocidos como dicetopiperazinas a partir de *Bacillus sp*. procedentes de ambientes marino, aislados de la cápsula de huevo de *Concholepas concholepas*, que posee la capacidad de inhibir el crecimiento del *V. parahaemolyticus* pandémico en la industria langostinera. Además, encontraron que la actividad inhibitoria de los productos bacterianos aumentó cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, la cual se dio entre 72 y 96 horas de cultivo.

Xu et al. (2014), determinaron que la actividad antibacteriana de la sustancia bioactiva cruda producida por cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* M1 tuvo amplio espectro contra 10 especies de bacterias patógenas de *Vibrio spp*. obteniendo como diámetros de halos de inhibición entre 12±0,3 a 28±0,4 mm. Además, encontraron que la *B. amyloliquefaciens* M1 produce un producto lipopéptido N3 que contiene isoformas de surfactina con aminoácidos e hidroxiácidos grasos (de 12 a 15 carbonos en longitud).

Muñoz (2022), al enfrentar cuatro productos de probióticos de diversas marcas comerciales, contra bacterias patógenas del género Vibrio y Pseudomonas encontradas en estadios larvales de *L. vannamei*, determinó que la concentración mínima inhibitoria de los probióticos (1, 2, 3 y 4), estuvo entre el rango de 600 a 750 ppm, para el caso de Pseudomonas.

2.2. Bases teóricas y científicas

2.2.1. Uso de antibióticos en acuicultura

La acuicultura es una actividad de rápido crecimiento en el mundo y para lograr compensar la demanda que existe de productos acuáticos, los sistemas de cultivo se están intensificando. Esto ha provocado el brote de enfermedades y el uso de insumos terapéuticos, especialmente antibióticos, los cuales son usados para la prevención y control de enfermedades bacterianas que resulta de las deficiencias sanitarias dentro de las unidades de producción (Mog et al., 2020).

Entre los patógenos que afectan la producción de camarón encontramos: virus, protozoarios, hongos, bacterias, y otros que al ser oportunistas representan un riesgo constante de producir enfermedades. Para contrarrestar las infecciones bacterianas patógenas, se utilizan antibióticos como oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol que debido a sus cualidades bacteriostáticas inhiben el crecimiento de bacterias cuando se los utiliza en las dosis adecuadas y por tiempo determinado (Redrován, 2017).

Santiago et al. (2009), indican que los antibióticos son suministrados a través del alimento a las unidades productores o sistemas de cultivo de langostino blanco, con la finalidad de tratar enfermedades bacterianas, ha provocado la presencia de pequeñas concentraciones de antibióticos en los sedimentos por efecto de la lixiviación y el uso continuo, puede provocar el

desarrollo de cepas bacterianas resistentes o multirresistentes a los antibióticos.

Cada día es más frecuente en granjas camaroneras las enfermedades infecciosas y debido a esta incidencia ha aumentado la aplicación de antibióticos por parte de los productores, como medida para frenar las pérdidas causadas por estos agentes patógenos. Muchas veces los tratamientos aplicados son realizados por personas que tienen conocimientos sobre las propiedades farmacológicas de los productos. Uno de los antibióticos más usados en el cultivo del camarón es la oxitetraciclina (Valera-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

El empleo continuo de la oxitetraciclina que es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas de amplio espectro y que se usa ampliamente en la acuicultura y especialmente en el cultivo de *L. vannamei* para combatir las infecciones bacterianas como la vibriosis, ha generado diversos problemas ambientales y de salud humana, los que se incluyen la resistencia bacteriana, la persistencia en el ambiente acuático y los efectos sobre la biogeoquímica del sedimento (Mog et al., 2020).

Es importante tener bioseguridad con los alimentos que ingiere el ser humano, sin embargo, el uso de medicamentos en el cultivo de camarones para eliminar bacterias, genera residuos de antibióticos en sus tejidos. En Bangkok durante octubre de 1990, se estableció el 37% de residuos de ácido oxolínico y oxitetraciclina, para el caso de *P. monodon*. En Japón al inicio de 1991, las autoridades descubrieron residuos de antibióticos en camarones procedentes de Tailandia. En el año 2001 autoridades alemanas detectaron restos de cloranfenicol en camarones importados desde China, seguidamente se corrobora residuos de antibióticos en camarones provenientes de Vietnam e Indonesia. Luego de estos antecedentes Europa instaura la inspección obligatoria de los camarones provenientes de dichos países. En el año 2022 la FDA se suma a mejorar los

controles de revisión de productos acuícolas y genera una alerta para no promover y prohibir el uso de drogas en acuicultura (Montoya, 2002).

2.2.2. Uso de ácidos orgánicos en acuicultura

La salud del camarón se relaciona con otros cohabitantes del mismo ecosistema, como son las bacterias, hongos, protozoarios, virus, etc., que generalmente son patógenos oportunistas y causan un peligro constante produciendo enfermedades. Para dar solución a este problema, actualmente existen dos tipos de medidas, profilácticas (ácidos orgánicos, prebióticos, probióticos), que suelen aplicar como un refuerzo inmunitario del camarón y los tratamientos con antibióticos, que se aplican cuando ya existe una proliferación de patógenos (Redrován, 2017).

En diversos estudios se han investigado alternativas para sustituir la aplicación de antibióticos en la producción del camarón, demostrando que los ácidos orgánicos, son una gran alternativa debido a sus características profilácticas y antimicrobianas (Reyes, 2017).

Da Silva et al. (2013), mencionan que los ácidos orgánicos son utilizados como promovedor de crecimiento en el cultivo de especies acuáticas, cuya función es la inhibición de microorganismos infecciosos en el tracto intestinal, suministrando energía a las especies acuáticas y optimizando la digestibilidad del alimento (nutrientes como fósforo y nitrógeno).

2.2.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias probióticas

Los probióticos en acuicultura se les atribuye una variedad de beneficios en los cultivos de organismos acuáticos como valor alimenticio mejorado, aporte enzimático a la digestión, promotores del crecimiento, inhibidor de microorganismos patógenos y aumento de la respuesta inmune, además de

mejorar la calidad del agua. Los microrganismos encargados de estos procesos pueden ser bacterias grampositivas y gramnegativas, como también, los bacteriófagos, microalgas y levaduras que cumplen dicha función probiótica (Hai, 2015; Pandiyan et al., 2013).

El efecto benéfico de los probióticos se debe principalmente a los mecanismos de acción como la capacidad para colonizar y adherirse al tracto intestinal, la modulación del sistema inmune, la producción de compuestos benéficos, la producción de sustancias antagónicas contra patógenos y la mejora de la calidad del medio acuático (Do Nascimento et al., 2018).

En la industria de acuicultura se están aplicando bacterias probióticas que al ser cultivadas producen enzimas, como proteasa, amilasa, lipasa y celulasas, que son capaces de mitigar el crecimiento de bacterias patógenas como las del género *Vibrio* y que a su vez mejora las condiciones fisiológicas del hospedero (Wang et al., 2020).

Los microorganismos en determinadas condiciones pueden producir sustancias antibacterianas, que por lo general son liberadas al medio exterior, estos productos se le denominan metabolitos secundarios. Por ejemplo, las bacterias del género Bacillus durante la germinación o esporulación liberan al medio el ácido dipicolínico (ácido piridín-2-6-dicarboxílico), encontrándose entre el 10 al 15% del peso seco de las esporas (Parés & Juárez, 2012).

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias probióticos, vienen siendo usada tando en la industria agricola y acuicola como antimicrobianos, Chen et al. (2017) indican que la cepa *Bacillus licheniformis* aislada de sedimento marino, produce lipopéptidos que pueden ser usados como bacteriostáticos y tienen la ventaja de resistir la luz ultravioleta y

al cambio de pH y temperatura. La surfactinas producidos por diferentes cepas del género Bacillus, como el *B. subtilis* además de ser buenos controladores de enfermedades fitopatógenas, también son usadas en la industria petrolera como biorremediadores de hidrocarburos (Abdel-Mawgoud et al., 2008).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Se realizó la investigación en las instalaciones del laboratorio Agroacuanálisis S.R.L. (figura 1), ubicado en la urbanización Andrés Araujo Moran, Tumbes, Perú.

Figura 1. Instalaciones del laboratorio Agroacuanálisis S.R.L. Tomado de Google Earth, 2024).

3.2. Tipo y diseño de investigación

Aplicada:

Es aplicada porque con los resultados de esta investigación se solucionará de manera inmediata, el problema de mortalidad por microorganismos patógenos como las bacterias del género Vibrio de *L. vannamei* en cultivo.

Experimental:

Porque el estudio se llevó a cabo a través de un experimento a nivel de laboratorio mediante pruebas de sensibilidad (prueba de concentración inhibitoria, prueba de concentración mínima bactericida y prueba de antagonismo), se evaluó el efecto de dos ácidos orgánicos C y D, probióticos comerciales A y B en la inhibición del crecimiento de *Vibrio spp*.

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

- Procedentes de cultivo semi intensivo de *L. vannamei* en la región Tumbes.

3.3.2. Muestra

- La muestra estuvo conformada por 10 langostinos y el muestreo fue dirigido seleccionando animales con signos clínicos patológicos (tamaño reducido, coloración anormal, expansión de cromatóforos, musculo flácido).

3.4. Preparación de material biológico y medios cultivo

3.4.1. Preparación de medios cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo (figura 2), se procedió según las especificaciones técnicas de cada Agar:

a) Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa: Se pesó 17,6 g de Agar TCBS y 4,0 g de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se enrasó hasta 200 mL con agua destilada. Posteriormente se hirvió por 3 a 4 minutos. Se dejó reposar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C y se dispensó en diez placas de Petri esterilizadas.

b) ChromAgar Vibrio: Se pesó 7,5 g de ChromAgar *Vibrio* y 2,0 g de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se enrasó hasta 100 mL con agua destilada. Se llevó a hervir por 3 a 4 minutos. Se dejó reposar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C y se dispensó en cinco placas de Petri esterilizadas.

c) Agar Triptona-Soja: Se pesó 8 g de TSA y 4 g de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se enrasó hasta 200 mL con agua destilada. Se llevó a hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución total. Se dispensó en recipientes apropiados y se esterilizó en autoclave a 121 ºC durante 15 minutos y se dispensó en diez placas de Petri esterilizadas.

d) Caldo Soja Tripticaseína: Se pesó 6 g de TSB y 4 g de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se enrasó hasta 200 mL con agua destilada. Se agitó para disolver y luego distribuir en tubos y frascos tapa rosca. Se esterilizó en autoclave a 121 ºC durante 15 minutos.

e) Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) al 2% NaCl: Se pesó 1 g de NaCl en un frasco de vidrio con tapa rosca de 100 mL, se enrasó hasta 50 mL con agua destilada, luego se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Se dejó enfriar y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

Figura 2. Preparación de los medios de cultivo

3.4.2. Selección de juveniles

Las muestras de juveniles de *L. vannamei*, fueron extraídos de estanques de cultivo semi-intensivo de langostinera Tumbes S.A.C. El muestreo estuvo dirigido, seleccionando juveniles con signos de enfermedad; tamaño reducido, coloración anormal, expansión de cromatóforos, musculo flácido. (figura 3).

Figura 3. Juveniles de *Litopenaeus vannamei*

3.4.3. Aislamiento de bacterias del género Vibrio

A partir de 10 ejemplares de *L. vannamei* con signos de enfermedad, se realizó asépticamente la extracción del hepatopáncreas e intestino, luego se depositó en un tubo de 15 ml con base cónica conteniendo 10 ml de solución salina fisiológica estéril (SSFE) al 2% NaCl, y posteriormente se realizó los cultivos en placas con medio de cultivo TCBS (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa, 2003).

Después de 24 horas de incubación de la placa de cultivo TCBS, se procedió a aislar las Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) mediante la técnica descrita por Moreno & Albarracín (2012), utilizando placas Petri con medios de cultivos selectivos cromogénicos (ChromAgar *Vibrio*) con ayuda de un asa de siembra mediante la técnica de estriado se purificó a *Vibrio spp*.

Las bacterias que se aislaron del hepatopáncreas e intestino del langostino fueron cultivadas en medios selectivos y diferenciales (ChromAgar *Vibrio*) para la detección presuntiva de especies de *Vibrio* (figura 5).

De las bacterias cultivadas, se eligió 3 cepas, las cuales se caracterizaron fenotípicamente y posteriormente se inoculó en tubos de ensayo con caldo TSB. Luego se llevó a incubación (figura 6).

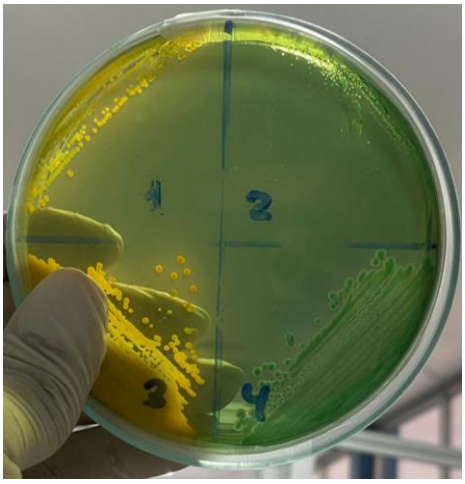

Figura 4. Cultivo en agar TCBS

Figura 5. Cultivos selectivos cromogénicos (ChromAgar *Vibrio*)

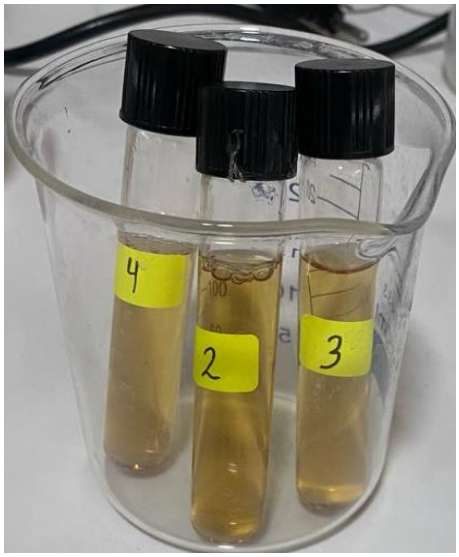

Figura 6. Tubos de ensayo con caldo TSB e inoculados con *Vibrio* spp.

3.5. Preparación de productos antimicrobianos

3.5.1. Preparación de ácidos orgánicos

Se preparó la solución de trabajo a una concentración de 1% del ácido orgánico C, se pesó 0,1 g en un tubo de ensayo y se enrasó hasta 10 ml de SSFE al 2% NaCl.

Se preparó la solución de trabajo a una concentración de 2% del ácido orgánico D, se pesó 0,2 mL en un tubo de ensayo y se enrasó hasta 10 mL de SSFE al 2% NaCl (figura 7).

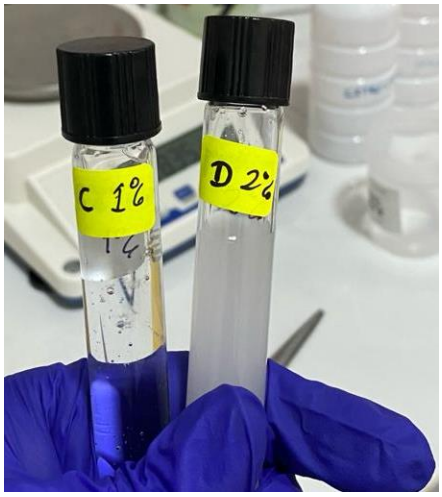

Figura 7. Ácidos orgánicos C y D preparados

3.5.2. Preparación de probióticos

Según la ficha técnica (Anexo 1 y 2), los probióticos presentan una concentración de 10^9 UFC/g. Para la preparación, se diluyó dicha concentración en un tubo con tapa rosca, añadiendo 1 g de probiótico y 9 mL de SSFE al 2% NaCl. Se incubó a 35 °C por 2 horas (figura 8).

Figura 8. Preparación de los probióticos: A) Se pesó el probiótico comercial, B) Se llenó de Solución Salina Fisiológica Estéril, C) Mezclado de los probióticos y SSFE.

3.6. Pruebas de sensibilidad

3.6.1. Prueba de concentración mínima inhibidora (MIC)

Para la prueba de concentración mínima inhibidora, el procedimiento esta descrito por (Rodríguez-Tudela et al., 2002), Se utilizó una placa de Elisa de 96 pocillos, cada pocillo tiene una capacidad de 360 µL. Se procedió a llenar los pocillos con 180 µL de TSB, posteriormente se realizó diluciones sucesivas a partir de la solución de trabajo de los ácidos orgánicos C (1%) y D (2%). Las diluciones se realizaron con una micropipeta de volumen variado (20 a 200 µL), de tal manera, que la concentración de la solución de trabajo se fue diluyendo a la mitad de la concentración anterior (figura 9).

Al final se inoculó 20 µL con *Vibrio spp*. a una concentración $1x10^8$ UFC/mL (la concentración fue determinada utilizando un estándar de turbidez correspondiente a la escala de McFarland 0.5 que contiene aproximadamente 10^8 bacterias por mL). Después de 24 horas de incubación se evaluó el crecimiento de *Vibrio spp*. mediante la turbidez en las diluciones.

Figura 9. Prueba de concentración mínima inhibidora

3.6.2. Prueba de concentración mínima bactericida (CMB)

A partir de la prueba del MIC los pocillos con y sin presencia de turbidez se sembró 20 µL en placas con agar TSA. Después de 24 horas de incubación a temperatura, se evaluó el crecimiento de *Vibrio spp*. (figura 10), este método fue descrito por (Eloff, 1998, como se citó en Jabo, 2023).

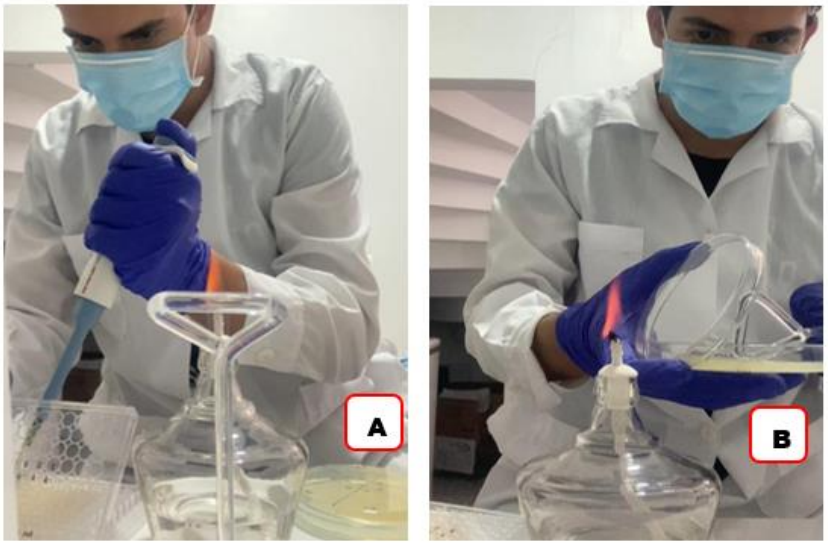

Figura 10. Prueba de concentración mínima bactericida; A) Inoculación de los pocillos en ausencia de turbidez hacia el agar TSA, B) Siembra por el método de extendido en agar TSA.

3.6.3. Prueba de antagonismo

Para determinar el poder antagónico de los probióticos A y B en presencia de las cepas de *Vibrio* spp. se procedió a realizar el método de difusión de discos (Chythanya et al., 2002), el cual consistió en colocar discos en placas con agar TSA previamente sembrado por superficie con las cepas aisladas *Vibrio,* posteriormente se inoculó 20 µL con los cultivos activos de las bacterias probióticas (figura 11). Las placas de cultivo fueron incubadas a 30 °C por 24 horas.

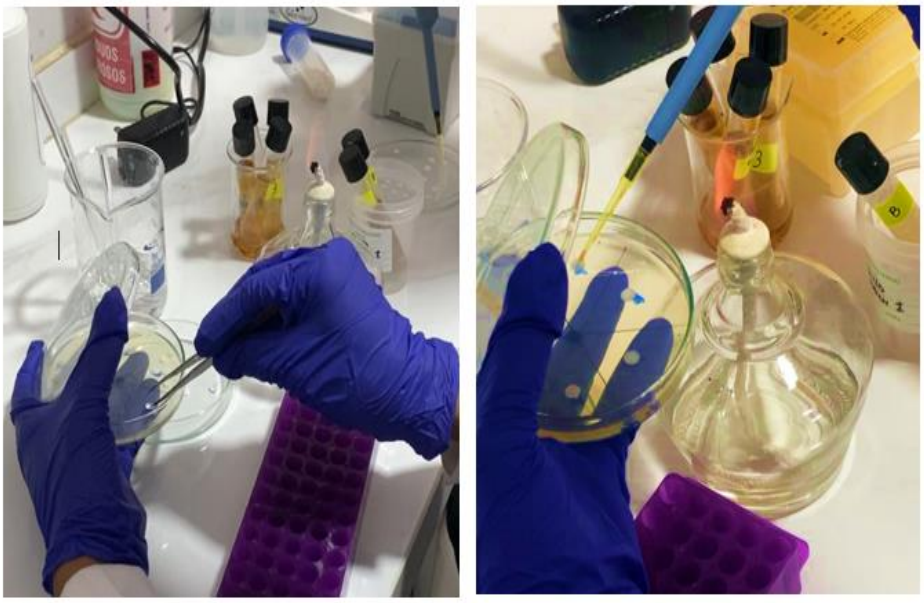

Figura 11. Prueba de antagonismo; A) Colocación de discos sobre medio de cultivo en placa, B) Inoculación de cultivos activos (bacterias probióticas).

3.7. Procesamiento y análisis de datos

3.7.1. Diseño experimental

El diseño experimental consistió en:

Prueba de concentración mínima inhibidora, se utilizó los ácidos orgánicos C (Tratamiento 1) y D (Tratamiento 2) enfrentados contra tres cepas patógenas del género Vibrio que serán aisladas de juveniles de *L. vannamei*. Cada tratamiento tendrá tres repeticiones. Después de 24 horas de incubación se observó la turbidez en las placas de Elisa, lo que indicó el crecimiento de las bacterias.

Prueba de concentración mínima bactericida, se utilizó los pocillos con ausencia de turbidez de los ácidos orgánicos C (Tratamiento 1) y D (Tratamiento 2) enfrentados contra tres cepas patógenas del género Vibrio que fueron aisladas de juveniles de *L. vannamei*. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y los controles fueron agua esterilizada. Después de 24 horas de incubación se evaluó el crecimiento de *Vibrio* spp. en las placas con agar TSA.

Prueba de antagonismo, se utilizó los caldos de cultivos de los probióticos A (Tratamiento 3) y B (Tratamiento 4); enfrentados contra tres cepas patógenas del género *Vibrio* que fueron aisladas de juveniles de *L. vannamei*. Cada prueba tuvo tres repeticiones y los controles fueron agua esterilizada. Después de 24 horas de incubación se midió los diámetros del halo de inhibición de cada placa Petri de cultivo TSA.

3.7.2. Evaluación estadística

La evaluación estadística se realizó sobre la sensibilidad bacteriana expresada en mm. Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Animales con signos de Enfermedad

Los resultados obtenidos a partir de la observación de los langostinos seleccionados mostraron signos de enfermedad, 7 individuos presentaban musculo flácido acompañados de coloración anormal, mientras que 3 individuos tenían tamaño reducido y expansión de cromatóforos.

4.2. Caracterización fenotípica de *Vibrio spp.*

Al observar signos clínicos (tamaño reducido, coloración anormal, expansión de cromatóforos, músculo flácido) de juveniles de cultivo semi intensivo, se seleccionó y se procedió al aislamiento bacteriano en el medio de cultivo TCBS (tabla 1), luego se aisló 3 cepas con características fenotípicas en el medio selectivo ChromAgar Vibrio (tabla 2). La diferenciación se clasificó de acuerdo al tipo de bordes, elevación, texturas, tamaños y coloraciones como se puede observar en las siguientes tablas.

Tabla 1. Caracterización de colonias en agar TCBS.

Cepas	Tipo de bacteria	Tinción Gram	Caracterización de colonias en agar TCBS				
			Borde	Elevación	Textura	Color	Tamaño
2	Vibrio	-	Regular	convexa	seca	verde	Pequeño
3	Vibrio	-	Regular	plana	cremoso	amarilla	Grande
4	Vibrio	-	Regular	convexa	cremoso	verde	mediana

Tabla 2. Caracterización de colonias en ChromAgar.

Cepas	Tipo de bacteria	Tinción Gram	Caracterización de colonias en agar Cromogénico				
			Borde	Elevación	Textura	Color	Tamaño
C1V2	Vibrio	-	Regular	convexa	Seca	malva	Pequeño
C2V3	Vibrio	-	Regular	plana	Cremoso	cremosa	Grande
C3V4	Vibrio	-	Regular	convexa	Cremoso	azulado	mediana

Las características observadas en esta investigación coincidieron con las cepas de *Vibrio spp.* al desarrollarse en el medio de cultivo TCBS. Según Sabir et al. (2013), estas colonias deben ser circulares, con bordes regulares y superficie lisa, presentando colores que van desde el amarillo hasta el verde, dependiendo de la especie de Vibrio.

4.3. Concentración mínima inhibitoria

Los ácidos orgánicos (C y D) usados en esta investigación fueron enfrentados en dos tratamientos y tres repeticiones contra 3 cepas de *Vibrio spp.* (figura 12).

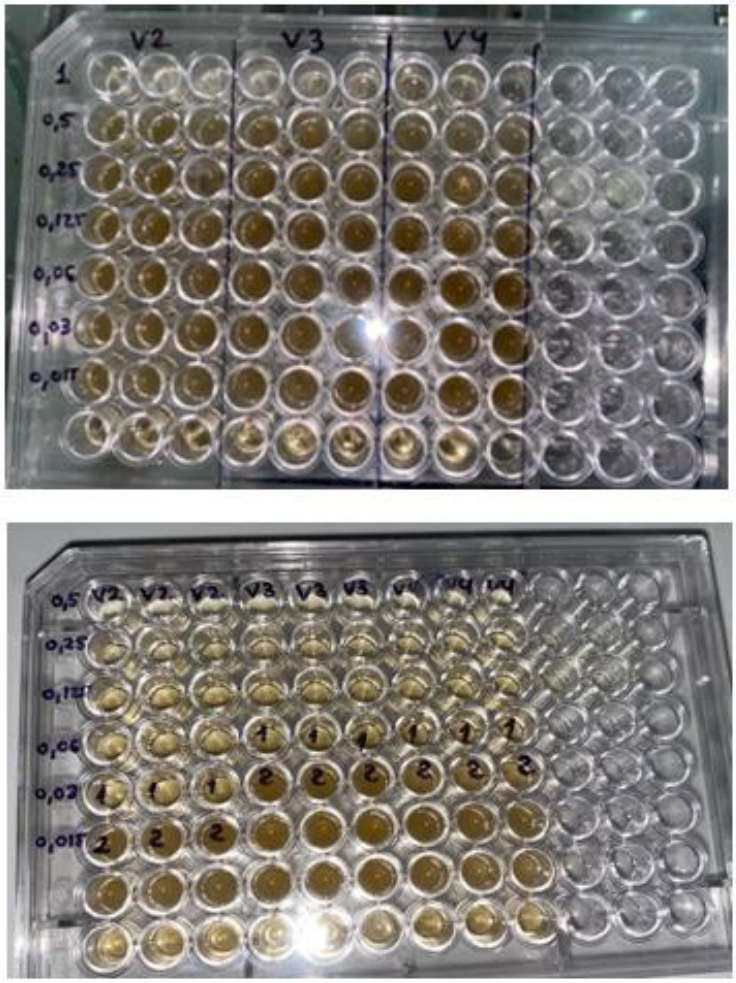

Figura 12. Prueba de concentración mínima inhibidora

Las concentraciones mínimas inhibitorias del ácido orgánico C, fueron muy efectivas. Se logró inhibir a *Vibrio spp.* en todas las repeticiones con diferentes cepas del tratamiento 1, para el caso de la cepa 1V2 la inhibición fue de 0,031 g/ml, para la cepa 2V3 fue de 0,063 g/ml y para la cepa 3V4 la inhibición fue de 0,063g/ml, en cambio, en el tratamiento 2 utilizando el ácido orgánico D, también se logró inhibir a *Vibrio spp*. en las cepas 1V2, 2V3, 3V2 y la inhibición fue de 1 g/ml (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de los ácidos orgánicos frente a cepas de Vibrio spp.

Vibrio spp. (cepas)	Tratamientos	MIC (g/ml).
C1V2	T1 AO(C)	0,031 ± 0,00
	T2 AO(D)	1,0 ± 0,00
C2V3	T1 AO(C)	0,063 ± 0,00
	T2 AO(D)	1,0 ± 0,00
C3V4	T1 AO(C)	0,063 ± 0,00
	T2 AO(D)	1,0 ± 0,00

Muñoz (2022) demuestra que al enfrentar a cepas patógenas de *Vibrio spp*. contra ácidos orgánicos, logra su inhibición a concentraciones mínimas, en tanto los resultados de esta investigación indican que fueron comparables, debido a que también se logró disminuir y detener la proliferación *Vibrio spp*. frente a el uso de los ácidos orgánicos probados (ácido cítrico, ácido gálico, acido fumárico y ácido láctico), siendo una gran alternativa para dejar de usar antibióticos en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, la investigación de Reyes (2018), indica que luego de probar 10 ácidos orgánicos comerciales contra *Vibrio sp.* solo el ácido orgánico AC10 demostró ser efectivo en la inhibición del crecimiento con un porcentaje significativo (95%), incluso a concentraciones bajas (inferiores a 1000 ppm). No obstante, es importante destacar que este compuesto presenta

toxicidad a nivel celular a concentraciones relativamente bajas (100 ppm), lo que afecta negativamente la viabilidad de los hemocitos.

Por otro lado, en la investigación de Reyes (2017), menciona que, mediante la identificación de *P. dioica*, *R. officinalis* y *A. absinthium*, se demostró que contienen principios activos con propiedades antimicrobianas solubles en diversos disolventes orgánicos y solo el ácido acético demostró ser el extractante más efectivo para lograr un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra diversas cepas de Vibrio. Mientras que, en esta investigación se encontró que hay otros ácidos orgánicos (el ácido cítrico, acido fumárico y ácido láctico), los cuales también son efectivos para lograr inhibir el crecimiento bacteriano de *Vibrio spp*.

4.4. Concentración mínima bactericida

Después de las 24 horas de incubación, se observó que hubo crecimiento bacteriano en agar TSA proveniente del inóculo de los pocillos con turbidez; sin embargo, los inóculos de los pocillos sin turbidez dieron un resultado efectivo al no observar crecimiento (figura 13), las concentraciones mínimas bactericidas para el tratamiento 1 fue de 0,031 g/ml en la cepa C1V2 y 0,063 para las cepas C2V3, C3V4. En el tratamiento 2 las concentraciones mínimas bactericidas fueron de 1g/ml para las tres cepas (Tabla 4).

Figura 13. Prueba de concentración mínima bactericida

Tabla 4. Concentración mínima bactericida de los ácidos orgánicos frente a cepas de *Vibrio spp*.

Vibrio spp. (cepas)	Tratamientos	MBC (g/ml).
C1V2	T1 AO(C)	0,031 ± 0,00
	T2 AO(D)	1,0 ± 0,00
C2V3	T1 AO(C)	0,063 ± 0,00
	T2 AO(D)	1,0 ± 0,00
C3V4	T1 AO(C)	0,063 ± 0,00
	T2 AO(D)	1,0 ± 0,00

Los resultados encontrados de las pruebas concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida indicaron que los ácidos orgánicos usados lograron inhibir el crecimiento de *Vibrio spp.* siendo compatible con lo encontrado por Chávez & Llanos (2015) y Adams & Boopathy (2013), realizaron pruebas en cultivo de agar TSA y Muller-Hinton, obteniendo también como resultado la inhibición del crecimiento de *Vibrio spp*. En tanto, Mine & Boopathy (2011), indicaron que el primordial componente inhibidor de los ácidos orgánicos se debe al efecto genera el pH.

4.5. Medición del diámetro de los halos de inhibición

La medición de halos indica que los probióticos utilizados en esta investigación (A y B) consiguieron inhibir a las 3 cepas de *Vibrio spp.* (figura 14).

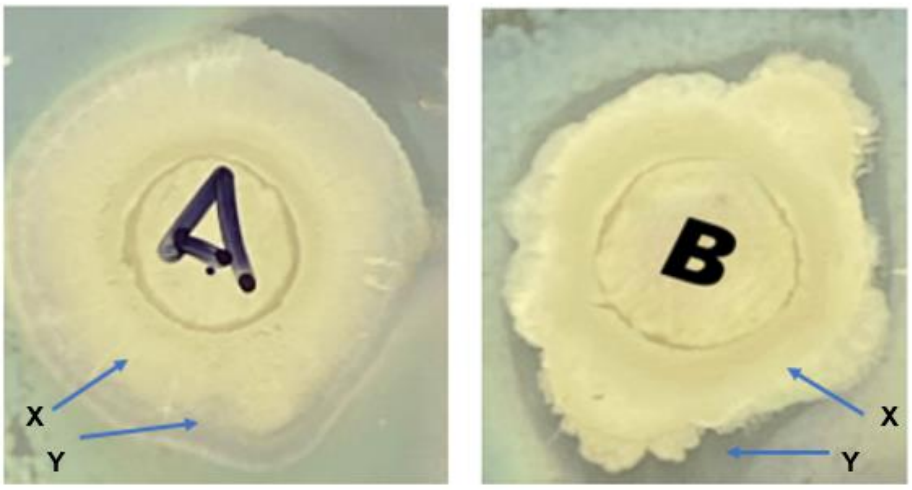

Figura 14. Halos de inhibición de los probióticos A y B frente a *Vibrio spp.,* donde: X: crecimiento de bacterias probióticas, Y: zona de inhibición.

En el tratamiento 3 con el probiótico A y con la cepa 1V2 se encontró 10,5 a 11,3 mm de diámetro de halos de inhibición, para el caso de la cepa 2V3 se encontró 14,0 a 16,0 mm y la cepa 2V4 15,5 a 17,5 diámetros de halos de inhibición (tabla 5).

Tabla 5. Diámetro de los halos de inhibición del probiótico A

Tratamientos	*Vibrio spp*. (cepas)	Diámetro de halos de inhibición (mm)
T_3 R_1		10,5
T_3 R_2	Cepa 1 (V2)	10,5
T_3 R_3		11,3
T_3 R_1		14,0
T_3 R_2	Cepa 2 (V3)	15,5
T_3 R_3		16,0
T_3 R_1		15,5
T_3 R_2	Cepa 3 (V4)	18,5
T_3 R_3		17,5

En el tratamiento 4 con el probiótico B y con la cepa 1V2, se encontró 15,5 a 16,0 mm de diámetro de halos de inhibición, en la cepa 2V3 y cepa 3V4 se encontró 13,0 a 15,5 mm y 15,0 a 17,0 mm de diámetros de halos de inhibición respectivamente (tabla 6).

Tabla 6. Diámetro de los halos de inhibición del probiótico B

Tratamientos	Bacteria (cepas)	Diámetro de halos de inhibición (mm)
T_4 R_1		15,5
T_4 R_2	Cepa 1 (V2)	16,0
T_4 R_3		15,5
T_4 R_1		15,0
T_4 R_2	Cepa 2 (V3)	13,0
T_4 R_3		15,0
T_4 R_1		17,0
T_4 R_2	Cepa 3 (V4)	16,0
T_4 R_3		15,0

Los probióticos utilizados en este estudio, A (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomas sp.*, *Nitrobacter sp.)* y B *(Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis),* produjeron halos de inhibición para contrarrestar el crecimiento de *Vibrio spp*., coincidiendo con Tinoco (2020), ya que en su investigación realizó aislamiento de bacterias acido lácticas con potencial probiótico para inhibir a *Vibrio spp.* resistentes y sensibles a antibióticos, demostrando una efectiva capacidad inhibitoria en cultivos in vitro contra todas las cepas de *Vibrio spp*. Sin embargo, la investigación de Mendoza (2023), donde utilizó *Mentha piperita* sobre el crecimiento de *Vibrio spp.*, obtuvo halos mayores por la esencia obtenida con extracción etanólica de menta procesada en baño maría. Cabe resaltar que las investigaciones antes mencionadas demuestran formas de inhibir a *Vibrio spp*. sin el uso de antibióticos.

Los halos de inhibición obtenidos en las cepas 1V2, 3V4 del probiótico B y la cepa 3V4 del probiótico A, fueron mayores a las encontradas por Delgado-Díaz et al. (2020), con un máximo de 14 y 15 mm para las cepas E91 y E 33. Por su parte Balcázar & Rojas-Luna (2007), obtuvieron halos de inhibición con un rango distinto, entre 10 mm a 15 mm para *Vibrio spp.* siendo también menores a los encontrados en esta investigación.

Mediante la evaluación estadística se aplicó el análisis de varianza al promedio de halos usando el probiótico A contra las 3 cepas de *Vibrio spp.* encontrando que si existe diferencia significativa (tabla 5, anexos). Aplicando Duncan, estadísticamente, todas las cepas son afectadas por el probiótico A, pero la Cepa 3 presenta un mayor halo (anexo 4).

Aplicando análisis de varianza para los halos encontrados en el enfrentamiento del probiótico B contra 3 cepas de *Vibrio spp.* se encontró que no hay diferencia significativa estadística (anexo 5).

Para realizar una evaluación estadística entre cepas del probiótico A y B, se hizo lo siguiente: Para verificar la eficacia de cada probiótico se realizó un análisis de varianza (ANOVA α=5%) y se corroboró mediante una prueba de significación de Duncan α=5%. Por otro lado, para comparar si el promedio del halo fue igual o diferente en cada cepa al usar los probióticos A y B, se aplicó una prueba *t-student* α=5%

- Con el probiótico A, las 3 cepas bacterianas tuvieron un promedio de halo diferente (ANOVA α=5%; $p<0,05$). Al aplicar la prueba de Duncan se concluye que las tres cepas bacterianas son afectadas por el A, pero la cepa 3 presentó un promedio de halo mayor.

- Con el probiótico B al aplicar el ANOVA, se concluye que no existe diferencia significativa estadística ($p<0,05$), es

decir, el promedio del halo es parecido en las 3 cepas bacterianas.

- La prueba *t-student* α=5% para comparar estadísticamente el promedio del halo formado al aplicar el probiótico A y probiótico B, se concluye que para la cepa 2 es indiferente colocar cualquiera de los dos probióticos.

5. CONCLUSIONES

1. El ácido orgánico “C” compuesto por ácido cítrico, ácido gálico, acido fumárico y ácido láctico consiguió una mejor concentración mínima de inhibición al ser enfrentado contra tres cepas de *Vibrio spp*.

2. Los ácidos orgánicos “C” y “D” fueron muy efectivos al poder eliminar las cepas de *Vibrio spp.* mediante pruebas de laboratorio, sin embargo, el ácido orgánico “C” obtuvo una mayor concentración mínima bactericida.

3. La aplicación de los probióticos A y B en laboratorio mediante una prueba de sensibilidad (antibiograma), demostraron la capacidad antagónica al ser enfrentados contra cepas bacterianas de *Vibrio spp*, encontrando halos de inhibición.

4. El probiótico “B “conformado por *Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* presentó mejores halos de inhibición contra la cepa 1 (V2) y el probiótico “A” conformado por *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter sp.* presentó mejores halos de inhibición contra las cepas 2 (V3) y 3 (V4).

5. El probiótico B afecta por igual a las tres capas bacterianas, Cepa1 (V2), Cepa2 (V3), Cepa3 (V4), ya que el promedio del halo es parecido en todas.

6. El probiótico A afecta por igual a las tres capas bacterianas, Cepa1 (V2), Cepa2 (V3), Cepa3 (V4), aunque la cepa 3 presentó un promedio de halo mayor que las otras 2.

7. Estadísticamente el promedio del halo formado al aplicar el probiótico A y probiótico B, se concluye que para la cepa 2 es indiferente colocar cualquiera de los dos probióticos.

6. RECOMENDACIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se debería realizar pruebas de sensibilidad a otras especies de bacterias patógenas que afecten el cultivo de *Litopenaeus vannamei.*
2. Utilizar métodos moleculares para la identificación de especies del género Vibrio y enfrentarlas con otros productos antimicrobianos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abarike, E. D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun L., Kuebutornye, F. K. (2018). Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *82* (1), 229-238. doi:10.1016/j.fsi.2018.08.037

Abdel-Mawgoud, A., Aboulwafa, M., & Hassouna, N. (2008). Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied biochemistry and biotechnology*, *150* (3), 289-303. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z.

Adams, D., & Boopathy, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, *68*(6), 1017-1021. doi:10.2478/s11756-013-0251-x

Arias-Moscoso, J. L., Espinoza-Barrón, L.G., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M. E., & Nieves-Soto, M. (2018). Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water exchange. *Aquaculture Reports*, *11*(1), 47-52. doi:10.1016/j.aqrep.2018.06.001

Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against Vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current microbiology*, *55*(5), 409-412. doi:10.1007/s00284-007-9000-0

Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa. (2003). Técnicas de Bacteriología, Análisis en Fresco, Calidad de Agua y Buenas Prácticas de Manejo y Bioseguridad en Granjas Camaroneras. https://www.academia.edu/28519092/Manual_Capacitacion.

Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). Vibriosis in shrimp aquaculture a review. International Journal of Scientific Research in Science*. Engineering and Technology*, *3*(2), 27-33. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53205059/2297-with-coverpagev2.pdf?Expires=1632432448&Signature=OBiCIa2~LLUKlrGWYHiKilq2kdMQCuTyM~QAASQIIomBYyVbvdu0kRpIGYct7cnFtn T1mwOc9x4isEmrNcmtQM6QnOwuINvHs7u5BVACKbRPgv7B3f1QAiIccTNYMUsLc9B7mnVtCS-Sn29Vr1Y9h.

Chávez, M., & Llanos, K. (2015). *Estudio de la actividad antibacteriana de diferentes ácidos orgánicos sobre distintas bacterias Gram negativas de importancia en la industria acuícola*. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/29554/1/D-76456%20Llanos%20Fern%c3%a1ndez.

Chen, Y., Liu, S., Mou, H., Ma, Y., Li, M., & Hu, X. (2017). Characterization of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from Marine Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 1-11. doi:10.3389/fmicb.2017.00871

Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine Pseudomonas I-2 strain. *Aquaculture*, *208*(1), 1-10. doi:10.1016/S0044-8486(01)00714-1

Da Silva, B., Do Nascimento, F., Mouriño, J., Ferreira, G., & Seiffert, W. (2013). Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture*, *384*, 104-110.https://www.Sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848612007399

Delgado-Díaz, L. M., Paz-Quevedo, N. E., Molina-Velásquez, N. E., & Navarrete-Soriano, A. (2020). Incorporación de bacterias ácido lácticas nativas como probióticos en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) en la camaronera Las Ánimas, El Salvador. *Revista Minerva*, *3*(1), 81-97. http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Do Nascimento, F., Bolivar, N. C., Legarda, E. C., Seiffert, W. Q., & Hayashi, L. (2018). Aditivos Alimentarios para Camarones Marinos: Salud y Nutrición. *Revista de Producción Animal*, *30*(2), 57-71. doi: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222479202018000200009.

FAO, (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020*. Roma. https:// www.Fao.org/3/ca 9229es/ca9229es.pdf.

Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*, *119*(4), 917-935. doi:10.1111/jam.12886

He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, *70*, 164-173. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.007

Jabo, c. (2023). *Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Ocimum basilicum L. "albahaca" y Zingiber officinale Roscoe "jengibre" frente a cepas patógenas del género Vibrio aisladas de langostinos enfermos cultivados en centros acuícolas de Tumbes – Perú.* [Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/13444/Evaluacion_JaboAbad_Carito.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Leyton, Y., Borquez, J., Darias, J., Cueto, M., Díaz-Marrero, A. R., & Riquelme, C. (2012). Diketopiperazines Produced by an Bacillus Species Inhibits *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Aquaculture*, *3*(4), 1-5. doi:10.4172/2155-9546.1000144

Leyton, Y., Pohl, K., & Riquelme, C. (2014). Inhibición de la cepa patogénica de *Vibrio cholerae* (tor1) por *Bacillus pumilus* aislados del ambiente marino. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *49*(3), 595-600.

Luis, I. (2012). *Efecto de probióticos en la modulación de la microbiota intestinal y respuesta inmune del camarón blanco Litopenaeus vannnamei.* [Tesis de doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. https://cibnor. Repositorioinstitucional .mx/jspui/bitstream /1001/199/1/luis_i.pdf

Mendoza, G. (2023). *Efecto de la esencia de Mentha piperita sobre el crecimiento in vitro e in vivo de Vibrio spp. en Litopenaeus vannamei*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Tumbes]. https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/64185/TESIS%20%20MENDOZA%20NOBLECILLA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Mine, S., & Boopathy, R. (2011). Effect of Organic Acids on Shrimp Pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, *63*(1), 1-7. doi:10.1007/s00284-011-9932-2

Mog, M., Ngasotter, S., Tesi, S., Waikhom, D., Panda, S., Sharma, S., & Varshney, S. (2020). Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *8*(3), 1075-1082. https://www.entomoljournal. com/archives/2020/vol8issue3/PartQ/8-3-144-531.pdf

Morales, V., & Cuéllar-Anjel, J. (2008). Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos.https://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar /docs/RinconLiterario/2011/febrero/F_269.pdf.

Moreno, J. & Albarracín, H. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*, *5*(9); 79-93. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/17156

Montoya. N. (2002). Residuos de antibióticos en camarones: límites residuales y detección de fenicoles. *CENAIM INFORMA*. *54*(1). https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/8513.

Muñoz, D. (2022). *Validación de estrategias profilácticas en larvicultura del camarón Penaeus vannamei en la provincia de Santa Elena, Mar Bravo*. [Tesis de pregrado, Universidad Estatal Peninsula de Santa Elena]. https://repositorio.upse.edu.ec/xml ui/handle/46000/8074

Ng, W., Koh, C., Teoh, C. Y., & Romano, N., C., & Romano, N. (2015). Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture*, *449*, 69-77. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.006

Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). *Probiotics in aquaculture*,*5*(1), 55-59. doi:10.1016/j.dit.2013.03.003

Parés, R., & Juárez, A. (2012). *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté S.A. https://api.pageplace.de/preview/ DT0400.9788429191875 _A40681897/preview-9788429191875_A40681897.pdf

Pepi, M., & Focardi, S. (2021). Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. *International journal of environmental research and public health*, *18*(11), 1-31. doi:10.3390/ijerph18115723.

Ministerio de la producción. (2019). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola. Lima: Ministerio de la Producción. https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oeedocumentospublicaciones/publicacionesanuales/item/949-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2019

Redrován, K. (2017). *Medidas Terapéuticas para el control de Vibrios en el cultivo de Camarón Blanco Litopenaeus vannamei*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11355/1/DE00017_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf.

Reyes, G. (2017). *Efecto sinérgico antimicrobiano in vitro de ácidos orgánicos y fitoquímicos, frente a Vibrio parahaemolyticus, potencialmente patógenos aislados de cultivos de camarón Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)*. [Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.]. Obtenido de http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3065/reyesg%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y (TESIS)

Reyes, J. (2018). *Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de Penaeus vannamei*. [Tesis de pregrado, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. doi:https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4432/1/UPSE-TBM-2018-0009.pdf.

Rivera Saavedra, D. F., & Ríos Canales, M. O. (2010). *Efecto del probiótico 3W vs al ataque de vibriosis (Vibrio parahemolítico y Vibrio alginolítico) en cultivo de camarones Litopenaeus vannamei en condiciones experimentales en la Isla Santa Lucía, Las Peñitas* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/1507/1/218313.pdf

Rodríguez-Tudela, J., Barchiesi, F., Bille,J., Chryssanthou,E., Cuenca-Estrella,M., Denning,D., Donnelly,J. Dupont,B., Fegeler,W., Moore, C., Richardson, M., Verweij, P. (2002). Method for the determination of minimum inhibitory concentración (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and infection*. *9*(8), 1-8.

Sabir, M., Ennaji, M. M., & Cohen, N. (2013). Vibrio Alginolyticus: An emerging pathogen of foodborne diseases. *International Journal of Science and Technology*,2(4),302-309. https://www.researchgate.net/publication/236214804VibrioAlginolyticusAnEmerging_Pathogen_of_Foodborne_Diseases.

Sánchez, R. (2018). *Evaluación de bacterias marinas y su potencial uso como aditivo en alimento y/o agente probiótico contra Vibrio parahaemolyticus, agente causal de la enfermedad de la necrosis Hepatopancreática aguda (AHPND) en camarón blanco Litopenaeus vannamei* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León]. http://eprints.uanl.mx/16697/1/108029032.pdf

Santiago, M., Espinosa, A., & Bermúdez, M. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 22-32. https://www.redalyc.org/pdf/579/57912963005.pdf

Silva, J., Jiménez, I., Vivas J., Mayer, L., & Figueredo, A. (2021). Algunas experiencias usando ácidos orgánicos para optimizar el desempeño de una larvicultura comercial de camarón blanco, *Penaeus vannamei*. *El Acuicultor*, 11-19. https://www.researchgate.net/profile/ArnaldoFigueredo2/publication/349194917_Algunas_experiencias_usando_acidos_organicos_para_optimizar_el_desempeno_de_una_larvicultura_comercial_de_camaron_blanco_Penaeus_vannamei/links/60248b4d92851c4ed5631890/Algunas-experiencias-usando-acidos-organicos-para-optimizar-el-desempeno-de-una-larvicultura-comercial-de-camaron-blanco-Penaeus-vannamei.pdf

Soltani, M., Ahmadi, M., Yavari, H., & Mirzargar, S. (2010). Red-pink colony-producing *Pseudomona sp*. is the causative agent of mass mortality in larvae and post-larvae of *Litopenaeus vannamei* raised in hatcheries in south Iran. *International Journal of Veterinary Research*, *4*(2), 89-94. https://www.researchgate.net/publication/228821974_Red-pink_colony-producing_Pseudomonas_sp_is_the_causative_agent_of_mass_mortality_in_larvae_and_postlarvae_of_Litopenaeus_vannamei_raised_in_hatcheries_in_south.

Sotomayor, M. A., & Balcázar, J. L. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas. *Revista AquaTIC*, *19*, 9-15. http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=156.

Tinoco, V. (2020). *Potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de Litopenaeus vannamei frente a Vibrio spp. resistentes y sensibles a antibióticos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Tumbes]. https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/63483/TESIS%20-%20TINOCO%20ELIZALDE.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Urresta, P. (2017). *Evaluación de 2 probióticos comerciales como controladores de patógenos en tanques de larvas de camarón blanco Penaeus vannamei*. [Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle /3317/7712

Varela-Mejías, A. & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. *29* (1). 1-14. http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186.

Wang, Y., Al Farraj, D., Vijayarag, P., Hatamleh, A., Biji, G., & Rady, A. (2020). Host associated mixed probiotic bacterUia induced digestive enzymes in the gut of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(9), 2479-2484. doi:10.1016/j.sjbs.2020.07.010

Xu, H. M., Rong, Y. J., Zhao, M. X., Song, B., & Chi, Z. M. (2014). Antibacterial activity of the lipopetides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio spp*. isolated from diseased marine animals. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(1), 127–136. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5291-1.

Zambrano, C. (2023). *Aislamiento y caracterización de bacterias responsables de enfermedades en el camarón Penaeus vannamei, determinando su caracterización bioquímica y su respuesta a la susceptibilidad a diferentes productos comerciales*. [Trabajo de pregrado, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. https://repositorio. upse.edu.ec /bitstream/46000 /9670/4/UPSE-TBI-2023-0028.pdf

Anexos

Anexo 1. Composición del probiótico A

Probiótico A	
Bacillus subtilis	1X10^9 CFU/g
Lactobacillus lactis	1X10^9 CFU/g
Nitrosomonas sp.	1X10^9 CFU/g
Nitrobactar sp.	1X10^9 CFU/g

Anexo 2. Composición del probiótico B

Probiótico B	
Bacillus subtilis	1X10^9 CFU/g
Bacillus licheniformis	1X10^9 CFU/g
Bacillus pumilus	1X10^9 CFU/g

Anexo 3. Resultados obtenidos de la prueba de concentración mínima inhibitoria

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Bacteria	Concentraciones de antimicrobianos (%)						
			1.000	0.500	0.250	0.125	0.063	0.031	0.016
COD001142024	C-1	Cepa 1 (V2)	B	B	B	B	B	MIC	CB
	C-2		B	B	B	B	B	MIC	CB
	C-3		B	B	B	B	B	MIC	CB
	C-1	Cepa 2 (V3)	B	B	B	B	MIC	CB	CB
	C-2		B	B	B	B	MIC	CB	CB
	C-3		B	B	B	B	MIC	CB	CB
	C-1	Cepa 3 (V4)	B	B	B	B	MIC	CB	CB
	C-2		B	B	B	B	MIC	CB	CB
	C-3		B	B	B	B	MIC	CB	CB
COD001152024	D1	Cepa 1 (V2)	MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D2		MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D3		MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D1	Cepa 2 (V3)	MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D2		MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D3		MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D1	Cepa 3 (V4)	MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D2		MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D3		MIC	CB	CB	CB	CB	CB	CB

Anexo 4. Resultados obtenidos de la prueba de concentración mínima bactericida

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Bacteria	Concentraciones de antimicrobianos (%)						
			1.000	0.500	0.250	0.125	0.063	0.031	0.016
COD001142024	C-1	Cepa 1 (V2)	B	B	B	B	B	MBC	CB
	C-2		B	B	B	B	B	MBC	CB
	C-3		B	B	B	B	B	MBC	CB
	C-1	Cepa 2 (V3)	B	B	B	B	MBC	CB	CB
	C-2		B	B	B	B	MBC	CB	CB
	C-3		B	B	B	B	MBC	CB	CB
	C-1	Cepa 3 (V4)	B	B	B	B	MBC	CB	CB
	C-2		B	B	B	B	MBC	CB	CB
	C-3		B	B	B	B	MBC	CB	CB
COD001152024	D1	Cepa 1 (V2)	MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D2		MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D3		MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D1	Cepa 2 (V3)	MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D2		MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D3		MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D1	Cepa 3 (V4)	MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D2		MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB
	D3		MBC	CB	CB	CB	CB	CB	CB

Anexo 5. Resultados obtenidos de la prueba de antagonismo

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Bacteria	Prueba de antagonismo
			Diámetro de halo de inhibición (mm)
	A-1	Cepa 1 (V2)	10.5
	A-2		10.5
	A-3		11.3
	A-1	Cepa 2 (V3)	14.0
COD001122024	A-2		15.5
	A-3		16.0
	A-1	Cepa 3 (V4)	15.5
	A-2		18.5
	A-3		17.5
	B-1	Cepa 1 (V2)	15.5
	B-2		16.0
	B-3		15.5
	B-1	Cepa 2 (V3)	15.0
COD001132024	B-2		13.0
	B-3		15.0
	A-3		16.0
	A-1	Cepa 3 (V4)	15.5
	A-2		18.5
	A-3		17.5
	B-1	Cepa 1 (V2)	15.5
	B-2		16.0
	B-3		15.5
	B-1	Cepa 2 (V3)	15.0
COD001132024	B-2		13.0
	B-3		15.0
	B-1	Cepa 3 (V4)	17.0
	B-2		16.0
	B-3		15.0
Oxitetracicina		Cepa 1 (V2)	17
		Cepa 2 (V3)	17
		Cepa 3 (V4)	18

Anexo 6. Análisis de varianza para el probiótico A.

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Cepa 1	3	32.3	10.76666667	0.213333333
Cepa 2	3	45.5	15.16666667	1.083333333
Cepa 3	3	51.5	17.16666667	2.333333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	64.32	2	32.16	26.5785124	0.0010434	5.14325285
Dentro de los grupos	7.26	6	1.21			
Total	71.58	8				

Anexo 7. Análisis de varianza para el probiótico B.

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Cepa 1	3	47	15.66666667	0.0833333
Cepa 2	3	43	14.33333333	1.3333333
Cepa 3	3	48	16	1

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	4.6666667	2	2.333333333	2.8965517	0.131695	5.14325285
Dentro de los grupos	4.8333333	6	0.805555556			
Total	9.5	8				

Anexo 8. Prueba t para dos muestras (cepa 1V2 del probiótico A y B).

	Cepa 1	
	A	*B*
Media	10.766667	15.666667
Varianza	0.2133333	0.0833333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.1483333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-15.58197	
P(T<=t) una cola	4.952E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2.1318468	
P(T<=t) dos colas	9.904E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	±2,77644510519779	

Anexo 9. Prueba t para dos muestras (cepa 2V3) del probiótico A y B.

	Cepa 2	
	A	*B*
Media	15.166667	14.333333
Varianza	1.0833333	1.3333333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1.2083333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0.9284767	
P(T<=t) una cola	0.2028577	
Valor crítico de t (una cola)	2.1318468	
P(T<=t) dos colas	0.4057155	
Valor crítico de t (dos colas)	±2,77644510519779	

Anexo 10. Prueba t para dos muestras (cepa 3V4) del probiótico A y B.

	Cepa 3	
	A	*B*
Media	17.166667	16
Varianza	2.3333333	1
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1.6666667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1.1067972	
P(T<=t) una cola	0.1652301	
Valor crítico de t (una cola)	2.1318468	
P(T<=t) dos colas	0.3304601	
Valor crítico de t (dos colas)	±2,77644510519779	