



Inhibición *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. aislados del langostino *Litopenaeus vannamei* utilizando bacterias ácido lácticas nativas

In vitro and *in vivo* inhibition of *Vibrio* spp. isolated from the shrimp *Litopenaeus vannamei* using native lactic acid bacteria

Vicsy Y. Tinoco Elizalde¹, Tessy Peralta-Ortiz¹ y Alberto Ordinola-Zapata^{1,2,*}

0000-0002-1413-7951

0000-0001-5907-7713

0000-0002-9644-0531

1. Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes. Calle Los Ceibos S/N, Puerto Pizarro, Tumbes, Perú. vinocoe@untumbes.edu.pe, tperaltao@untumbes.edu.pe

2. Grupo de Biodiversidad en Ecosistemas Acuáticos Tropicales (BioTrop) de la Universidad Nacional de Tumbes. Calle Los Ceibos S/N, Puerto Pizarro, Tumbes, Perú. aordinolaz@untumbes.edu.pe*

* Autor de correspondencia / Corresponding Author

RESUMEN

Las enfermedades originadas por *Vibrio* spp. ocasionan las mayores pérdidas económicas en el cultivo de langostino, la terapia antibiótica ha originado el surgimiento de cepas resistentes por lo que se está investigando el uso de probióticos para su tratamiento. Esta investigación tuvo como objetivo obtener bacterias ácido lácticas (BAL) nativas aisladas de langostinos de cultivo y determinar su potencial probiótico contra *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos *in vitro* e *in vivo*. Se aislaron nueve cepas tanto de BAL como de *Vibrio* spp. de langostinos de cultivo de Tumbes. Se determinó la resistencia antibiótica de *Vibrio* spp.; así como el poder inhibidor *in vitro* de las cepas de BAL contra dichas cepas, mediante ensayo en pozo de agar e *in vivo*, mediante infección experimental de langostinos con cepas de *Vibrio* spp. y tratamiento por ocho días con cepas de BAL adicionadas al alimento balanceado. Las nueve cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos de cultivo, fueron resistentes a fosfomicina y ácido nalidixico, con un índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) de 0,2. En el ensayo *in vitro*, las cepas C1L, F1L y F3L, inhibieron el mayor número de cepas de *Vibrio* spp.; así también, *in vivo*, las cepas C1L y F1L, incrementaron significativamente ($p < 0,05$) la supervivencia y disminuyeron en el hepatopáncreas, el recuento de *Vibrio* spp. de los langostinos infectados. Se concluye que las cepas de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos aislados de langostinos de cultivo pudieron ser inhibidas por las cepas de BAL nativas, C1L y F1L, demostrando un prometedor potencial probiótico.

PALABRAS CLAVE: cultivo de camarón; vibriosis; resistencia bacteriana; alternativa a antibióticos; probiótico.

ABSTRACT

The diseases caused by *Vibrio* spp. cause the greatest economic losses in shrimp farming, antibiotic therapy has led to the emergence of resistant strains and research is being carried out into the use of probiotics for their treatment. This research aimed to obtain native lactic acid bacteria (LAB) isolated from cultured shrimp and to determine their probiotic potential against antibiotic resistant *Vibrio* spp. *in vitro* and *in vivo*. Nine strains of both LAB and *Vibrio* spp. were isolated from cultured shrimps from Tumbes. Antibiotic-resistance of *Vibrio* spp. was determined; as well as the *in vitro* inhibitory power of LAB strains against these strains by agar well trial and *in vivo*, by experimental infection of shrimp with *Vibrio* spp. strains and treatment for eight days with LAB strains added to feed. The nine strains of *Vibrio* spp. isolated from cultured shrimps were resistant to fosfomicin and nalidixic acid, with a multiple antibiotic resistance index (MAR) of 0.2. In the *in vitro* trial, the C1L, F1L and F3L strains inhibited the largest number of *Vibrio* spp. strains; also *in vivo*, the C1L and F1L strains significantly ($p < 0.05$) increased survival and decreased the *Vibrio* spp. count of infected shrimp in the hepatopancreas. It is concluded that antibiotic-resistant strains of *Vibrio* spp. isolated from cultured shrimps could be inhibited by native LAB strains, C1L and F1L, demonstrating a promising probiotic potential.

KEYWORDS: shrimp culture; vibriosis; bacterial resistance; alternative to antibiotics; probiotic.

INTRODUCCIÓN

Se estima que cada año se pierde alrededor de 6000 millones de dólares por enfermedades infecciosas en cultivos acuícolas en todo el mundo (Culot *et al.*, 2021); las principales de ellas son llamadas vibriosis y son originadas por bacterias del género *Vibrio* (Chandrakala y Priya, 2017). Para tratar estas enfermedades se han usado antibióticos de manera frecuente y excesiva, por ejemplo, en Chile en 2003, por cada tonelada de salmón producido se utilizó 0,53 kg de antibióticos (Zhao *et al.*, 2020).

El langostino *Litopenaeus vannamei* sustenta la acuicultura más grande de crustáceos en el mundo, en 2018 produjo 4,97 millones de toneladas, equivalente a 52,9 % de la producción de crustáceos (FAO, 2020); esta especie se ha impuesto en el cultivo debido a su tolerancia a un amplio rango de salinidades (0 a 45 ‰), capacidad para cultivarse en altas densidades, alta tasa de crecimiento, bajo requerimiento de proteína dietaria (30 a 35 %), así como su alto rendimiento (Kumaran *et al.*, 2017).

Las enfermedades originadas por *Vibrio* son actualmente las que originan mayores pérdidas en el cultivo de langostino (Mulyadi e Iba, 2020); en particular la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), que ha afectado fuertemente los cultivos de Asia y Norteamérica, aunque no a los de Sudamérica, es la patología que más pérdidas económicas ha originado en los últimos años (Saavedra-Olivos *et al.*, 2018; Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018; Aranguren *et al.*, 2020).

Las vibriosis en los cultivos de langostinos son tratadas con antibióticos (Krishnani *et al.*, 2015; Luis-Villaseñor *et al.*, 2015; Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018), frecuentemente con oxitetraciclina, y en menor medida con enrofloxacin, florfenicol y norfloxacin (Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018). Estos antibióticos se usan a menudo de manera inadecuada, en dosis superiores a las recomendadas, como profiláctico o para tratar infecciones no bacterianas, lo que promueve el surgimiento de cepas de *Vibrio* resistentes o multiresistentes a antibióticos (Watts *et al.*, 2017; Letchumanan *et al.*, 2019; Mulyadi *et al.*, 2020), que incluyen a aquellos de uso veterinario o humano, tales como amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefazolina, ceftazidima, colistina, gentamicina, tobramicina, enrofloxacin, oxitetraciclina entre otros (Stalin y Srinivasan, 2016; Rosado, 2018; Sotomayor *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020).

INTRODUCTION

It is estimated that around 6000 million dollars are lost due to infectious diseases in aquaculture crops around the world (Culot *et al.*, 2021), the main of which are called vibriosis and are caused by bacteria from the genus *Vibrio* (Chandrakala and Priya, 2017). To treat these diseases, antibiotics have been frequently and excessively used. For example, in Chile, in 2003, 0.53 kg of antibiotics were used for every ton of salmon produced (Zhao *et al.*, 2020).

The shrimp *Litopenaeus vannamei* supports the largest crustacean aquaculture in the world. In 2018, it produced 4.97 million tons, which is equivalent to 52.9 % of crustacean production (FAO, 2020). This species has imposed itself in farming thanks to its tolerance to a wide range of salinities (0 to 45‰), its ability to be farmed at high densities, its high growth rate, its low dietary protein requirements (30 to 35 %), and its high yield (Kumaran *et al.*, 2017).

Diseases originated by *Vibrio* are currently the ones that cause the greatest losses in shrimp farming (Mulyadi and Iba, 2020). In particular, acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), which has strongly affected crops in Asia and North America, albeit not those in South America, is the disease that has caused the greatest economic losses in recent years (Saavedra-Olivos *et al.*, 2018; Varela-Mejías and Alfaro-Mora, 2018; Aranguren *et al.*, 2020).

Vibriosis in shrimp crops is treated with antibiotics (Krishnani *et al.*, 2015; Luis-Villaseñor *et al.*, 2015; Varela-Mejías and Alfaro-Mora, 2018), frequently with oxytetracycline, and with enrofloxacin, florfenicol, and norfloxacin to a lesser extent (Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018). These antibiotics are often used inadequately, in doses superior to those recommended, as a prophylactic or to treat non-bacterial infections, which fosters the emergence of *Vibrio* strains that are resistant or multi-resistant to antibiotics (Watts *et al.*, 2017; Letchumanan *et al.*, 2019; Mulyadi *et al.*, 2020), including those of veterinary or human use, such as amoxicillin, ampicillin, carbenicillin, cephalothin, cefazolin, ceftazidime, colistin, gentamicin, tobramycin, enrofloxacin, oxytetracycline, among others (Stalin and Srinivasan, 2016; Rosado, 2018; Sotomayor *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020).

Due to the increasing antibiotic resistance, the effectiveness of antibiotic therapy to treat vibriosis in shrimps is lower. Therefore, some products which can replace it have

Debido a la resistencia antibiótica creciente, la eficacia de la terapia con antibióticos para el tratamiento de la vibriosis en langostinos es menor; por ello se vienen investigando productos que puedan reemplazarla, entre ellos los probióticos (Pandiyana *et al.*, 2013; Rodríguez, 2017). Las bacterias ácido lácticas (BAL), son uno de los grupos bacterianos más utilizados como probióticos, pues son microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés) y poseedoras de una fuerte actividad antimicrobiana (Khelissa *et al.*, 2020). Las BAL son bacterias Gram positivas, de forma bacilar o cocoide, no esporulantes, sin flagelos y productoras de ácido láctico; producen péptidos antimicrobianos y pueden estimular al sistema inmunitario del huésped (Sánchez *et al.*, 2017; Khelissa *et al.*, 2020; Quispe *et al.*, 2020).

Investigaciones como las de Karthik *et al.* (2014), Kewcharoen y Srisapoom (2019) y Mahjoub *et al.* (2019) han buscado aislar bacterias con potencial probiótico, nativas del tracto digestivo del langostino, pues es su ambiente habitual, y logran proliferar en éste, compitiendo con *Vibrio* que también habita allí. En dicho sentido esta investigación tuvo como objetivo determinar el nivel de inhibición en cepas de *Vibrio* spp. logrado por cepas de BAL nativas aisladas del langostino *Litopenaeus vannamei* en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de langostinos para el aislamiento de *Vibrio* y BAL

Se obtuvieron por donación 32 langostinos de cultivo de empresas productoras de Zarumilla, Zorritos y Puerto Pizarro, en la región Tumbes (Perú) (Figura 1), éstos fueron capturados de estanques, que tuvieron problemas por vibriosis y en los que no se aplicó probióticos comerciales. Los langostinos fueron transportados vivos hasta el Laboratorio de Acuicultura II de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes en Puerto Pizarro (Tumbes, Perú).

Aislamiento de cepas de *Vibrio* spp.

Los langostinos colectados que mostraron signos externos de vibriosis fueron sacrificados siguiendo las directrices de RSPCA (2016). Se tomaron muestras de tejido del intestino, hepatopáncreas, hemolinfa y heridas superficiales.

been investigated, among them probiotics (Pandiyana *et al.*, 2013; Rodríguez, 2017). Lactic acid bacteria (LAB) are one of the bacterium groups that are most widely employed as probiotics, as they are microorganisms that are generally recognized as safe (GRAS) and exhibit strong antimicrobial activity (Khelissa *et al.*, 2020). LAB are Gram-positive bacteria, rod-shaped or coccoid, non-sporulating, with no flagella, and producers of lactic acid. They produce antimicrobial peptides and can stimulate their host's immune system (Sánchez *et al.*, 2017; Khelissa *et al.*, 2020; Quispe *et al.*, 2020).

Studies such as those by Karthik *et al.* (2014), Kewcharoen and Srisapoom (2019), Mahjoub *et al.* (2019) have sought to isolate bacteria with probiotic potential, which are native to the digestive tract of shrimps, as it is their usual environment, and they can thrive in it, competing with *Vibrio*, which also lives there. In this sense, the objective of this research was to determine the level of inhibition in *Vibrio* spp. strains, as achieved by native LAB strains isolated from the shrimp *Litopenaeus vannamei* in culture.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining shrimps for isolating *Vibrio* and LAB

32 shrimps were obtained via donations from the crops of producer companies in Zarumilla, Zorritos, and Puerto Pizarro, in the region of Tumbes (Peru) (Figure 1). These were captured in ponds that had vibriosis issues in which no commercial probiotics were applied. The shrimps were transported alive to the Aquaculture Laboratory II of the Faculty of Fisheries Engineering and Sea Sciences of Universidad Nacional de Tumbes in Puerto Pizarro (Tumbes, Peru).

Isolating *Vibrio* spp. strains

The collected shrimps that showed external signs of vibriosis were sacrificed while following RSPCA guidelines (2016). Samples were taken from tissues in the intestine, hepatopancreas, hemolymph, and surface wounds.

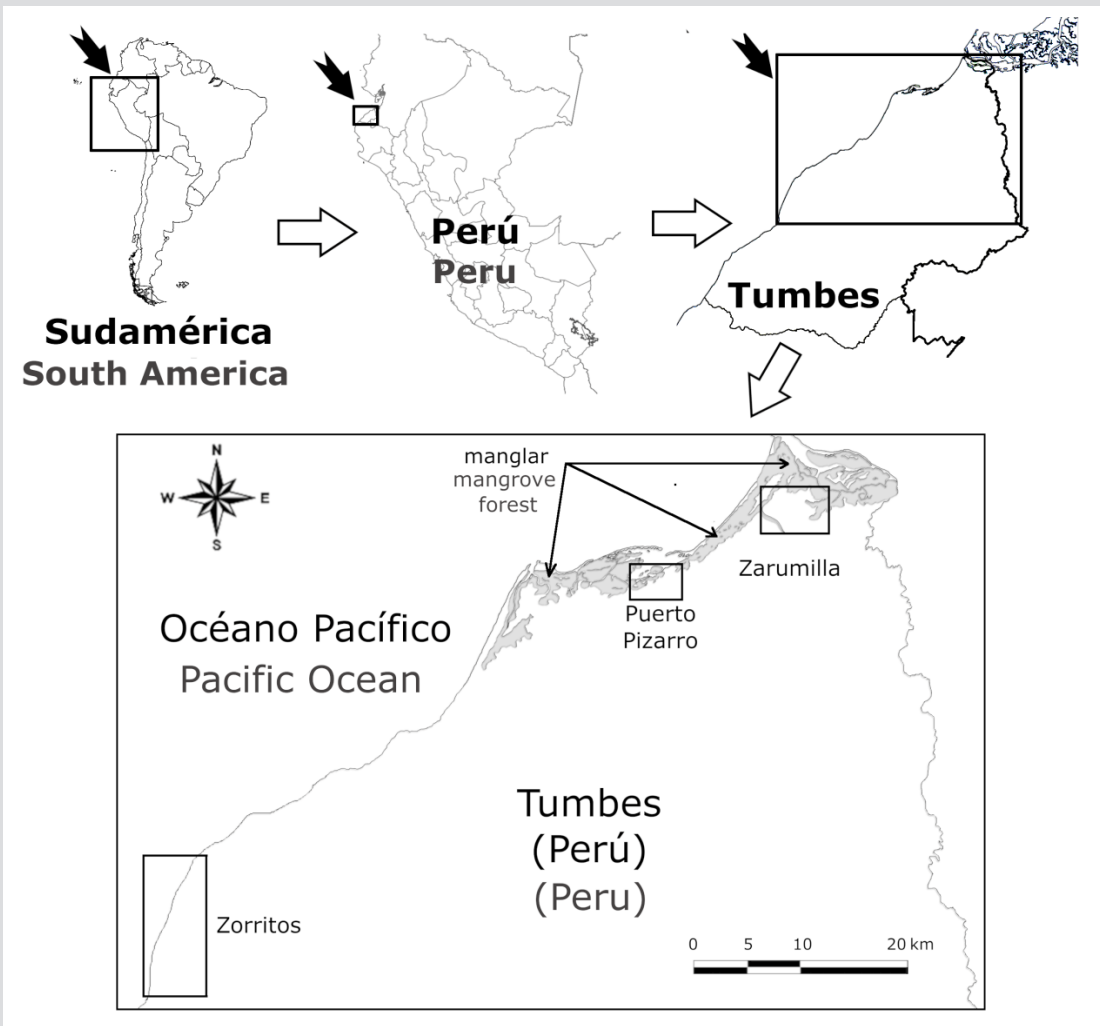


Figura 1. Áreas de donde se obtuvieron los langostinos de cultivo. La localización precisa y nombres de las empresas langostineras no se indican pues estas desean mantenerse anónimas.

Figure 1. Areas from which culture shrimps were obtained. The accurate location and the names of shrimp companies are not indicated, as they desire to maintain anonymity.

Se realizó el aislamiento y purificación de las cepas de *Vibrio* spp. según el método de Jeyasanta *et al.* (2017), que consistió en triturar las muestras de tejidos sólidos con solución de NaCl 0,85 %; y preparar diluciones sucesivas de 10^0 a 10^{-4} , para luego sembrar éstas así como la hemolinfa sin diluir en placas petri con agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) ajustado a 2,5 % de NaCl. Las placas se colocaron en incubación por 24 a 48 h a 37 °C, luego se subcultivaron hasta su purificación en agar tripticasa soya (TSA) con 2,5 % de NaCl, las cepas fueron evaluadas mediante la tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa así como respecto a su crecimiento en soluciones de NaCl.

Aislamiento de cepas de BAL

Las cepas de BAL fueron obtenidas de 16 langostinos (parte de los 32 que fueron colectados) que estuvieron

The *Vibrio* spp. strains were isolated and purified according to the method by Jeyasanta *et al.* (2017), which consisted of crushing the samples of solid tissues with a NaCl solution at 0.85 % and preparing successive dilutions from 10^0 a 10^{-4} , to later place them in petri dishes with thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar adjusted to 2.5 % NaCl. The dishes were placed in incubation for 24 to 48 h at 37 °C, and then they were sub-cultivated in trypticase soy agar (TSA) with 2.5 % NaCl until they were purified. The strains were evaluated via Gram staining and catalase and oxidase tests, as well as regarding their growth in NaCl solutions.

Isolating the LAB strains

The LAB strains were obtained from 16 shrimps (part of the 32 collected) that were apparently healthy. They were sacrificed while following the RSPCA guidelines (2016),

aparentemente sanos, el sacrificio de los mismos se hizo siguiendo las directivas de RSPCA (2016), mientras que el aislamiento se hizo con el método seguido por Quispe *et al.* (2020), con modificaciones; se tomó el tejido del intestino triturado en solución de NaCl 0,85 %, se sembró en placas petri con el agar selectivo Man Rogosa Sharpe (MRS), y se incubó a 37 °C por 24 h a 48 h, luego se subcultivaron hasta su purificación en agar tripticasa soya (TSA), las cepas fueron evaluadas mediante la tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa así como respecto a su crecimiento en soluciones de NaCl.

Ensayo de sensibilidad antibiótica de cepas de *Vibrio* spp.

Se realizó el método de difusión en agar de Kirby-Bauer; para ello se cultivaron las cepas de *Vibrio* spp. en caldo tripticasa soya (TSB) por 24 h, se llevó su densidad a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml por comparación con el estándar 0,5 de McFarland, y se sembraron en placas petri con medio Mueller Hinton. Se colocó en cada placa discos antibióticos comerciales correspondientes a seis familias antibióticas, con las designaciones y cantidades siguientes: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), enrofloxacin (5 µg), florfenicol (25 µg), fosfomicina (50 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacin (10 µg), oxitetraciclina (30 µg) y tetraciclina (30 µg). El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa de *Vibrio* spp.

La incubación se llevó a cabo a 37 °C por 24 h, luego de lo cual se midió el diámetro de los halos de inhibición que se formaron, y se compararon contra los puntos de corte que figuran en la tabla 1, para determinar su nivel de resistencia frente a cada antibiótico. A partir de ello, se determinó el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR, por sus siglas en inglés) de la cepa, con la fórmula:

$$MAR = (\text{Cantidad de antibióticos a los que es resistente la cepa}) / (\text{total de antibióticos empleados en el ensayo})$$

Asimismo, se determinó la multirresistencia de la cepa, siguiendo la definición dada por Bleichenbacher *et al.* (2020), que una cepa es multirresistente cuando resiste a uno o más antibióticos, en al menos tres familias de ellos.

and they were isolated via the method by Quispe *et al.* (2020), with some modifications: the crushed intestinal tissue in a 0.85 % NaCl solution was taken, placed in petri dishes with Man Rogosa Sharpe (MRS) selective agar, and incubated at 37 °C for 24 to 48 h. Then, they were sub-cultivated in trypticase soy agar (TSA) until they were purified. The strains were evaluated via Gram staining and catalase and oxidase tests, as well as regarding their growth in NaCl solutions.

Antibiotic sensitivity testing in *Vibrio* spp. strains

The agar diffusion Kirby-Bauer method was implemented, for which the *Vibrio* spp. strains were cultivated in trypticase soy broth (TSB) for 24 h. Their density was taken to 1.5×10^8 UFC/ml for comparison with the McFarland 0.5 standard, and they were placed in petri dishes with Mueller Hinton medium. In each dish, commercial antibiotic disks were placed, which corresponded to six antibiotic families with the following designations and amounts: nalidixic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), enrofloxacin (5 µg), florfenicol (25 µg), fosfomicin (50 µg), gentamicin (10 µg), norfloxacin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), and tetracycline (30 µg). The test was carried out in triplicate for each *Vibrio* spp. strain.

Incubation was carried out at 37 °C for 24 h, after which the diameter of the inhibition halos that formed was measured and compared against the cutoff points shown in Table 1, in order to determine their level of resistance to each antibiotic. Based on this, the multiple antibiotic resistance (MAR) index of each strain was determined by means of the following formula:

$$MAR = (\text{amount of antibiotics to which the strain is resistant}) / (\text{total antibiotics employed in the test})$$

In the same way, the multi-resistance of each strain was determined, following the definition given by Bleichenbacher *et al.* (2020), which states that a strain is multi-resistant when it can resist one or more antibiotics of at least three families.

Tabla 1. Puntos de corte usados para la evaluación de la resistencia antibiótica de *Vibrio* spp.

Producto antibiótico / Antibiotic product	Dosis / Dose (µg)	Punto de corte (diámetro del halo en mm) / Cutoff point (halo diameter in mm)			Fuente / Source
		Resistente / Resistant	Intermedio / Intermediate	Sensible / Sensitive	
Acido nalidíxico / Nalidixic acid	30	≤ 13	14-18	≥ 19	(CLSI, 2019)
Ampicilina / Ampicillin	10	≤ 13	14-16	≥ 17	(NCCLS, 1999; Cayul, 2003)
Cloranfenicol / Chloramphenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	(CLSI, 2019)
Enrofloxacin / Enrofloxacin	5	≤ 15	16-20	≥ 21	(NCCLS, 1999; Cayul, 2003)
Florfenicol / Florfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	(NCCLS, 1999; Cayul, 2003)
Fosfomicina / Fosfomicin	50	≤ 16	17-19	≥ 20	(Seguel, 2009)
Gentamicina / Gentamicin	10	≤ 12	13-14	≥ 15	(NCCLS, 1999; Cayul, 2003)
Norfloxacin / Norfloxacin	10	≤ 12	13-16	≥ 17	(CLSI, 2019)
Oxitetraciclina / Oxytetracycline	30	≤ 14	15-18	≥ 19	(NCCLS, 1999; Cayul, 2003)
Tetraciclina / Tetracycline	30	≤ 14	15-18	≥ 19	(CLSI, 2019)

Table 1. Cutoff points used for evaluating the antibiotic resistance of *Vibrio* spp.

Ensayo de inhibición *in vitro* de las cepas de *Vibrio* spp. por cepas de BAL

Se realizó mediante la técnica difusión en pozo de agar empleada por Lamari *et al.* (2014), como se indica: las cepas de BAL se hicieron crecer en caldo MRS, y se procedió de manera similar a la usada para las cepas de *Vibrio* spp., igualando su turbidez con la del estándar 0,5 de McFarland para obtener una concentración celular equivalente a $1,5 \times 10^8$ cél./ml. A continuación cada cepa fue dispensada en dos tubos de 1,5 ml. El primero de ellos se etiquetó como cultivo (C), el segundo fue centrifugado por 3 min a 10 000 rpm para obtener el sobrenadante (S) y desechar el *pellet* bacteriano.

Cada cepa aislada de *Vibrio* spp. se cultivó en medio TSB por 24 a 48 h hasta que su turbidez superó la del estándar 0,5 de McFarland, a continuación se diluyó hasta alcanzar la turbidez de dicho estándar, lo cual indicó una concentración celular equivalente a $1,5 \times 10^8$ cél./ml. Las cepas fueron entonces sembradas en placas petri con agar Mueller Hinton, se hicieron pozos de 6 mm en el agar distanciados al menos 25 mm uno de otro.

En cada pozo se colocó 45 µl de la suspensión bacteriana (C) o del sobrenadante (S) de cada cepa de BAL. Se utilizaron tres placas petri por cada cepa de BAL. Luego las placas petri se incubaron a 37 °C por 24 h, se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición producidos por las BAL alrededor de los pozos.

In vitro testing of the inhibition of *Vibrio* spp. strains by LAB strains

This was carried out via the agar well diffusion technique employed by Lamari *et al.* (2014), as indicated below. The LAB strains were grown in an MRS broth, and a similar procedure was implemented for the *Vibrio* spp. strains, matching their turbidity with that of the McFarland 0.5 standard in order to obtain a cell concentration equivalent to 1.5×10^8 cells/ml. Next, each strain was stored in two 1.5 ml tubes. The first of them was labeled as culture (C), and the second one was centrifuged for 3 min at 10 000 rpm to obtain the supernatant (S) and discard the bacterial pellet.

Each isolated *Vibrio* spp. strain was grown in a TSB medium for 24 to 48 h until its turbidity surpassed that of the McFarland 0.5 standard. Afterwards, it was diluted until it reached said standard's turbidity, which indicated a cell concentration equivalent to 1.5×10^8 cell/ml. The strains were then placed in petri dishes with Mueller Hinton agar. 6 mm wells were made in the agar, separated by at least 25 mm from each other.

45 µl of each LAB strain's bacterial suspension (C) or the supernatant (S) were placed in each well. Three petri dishes were used for every LAB strain. Then, the petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h. Next, the diameter of the inhibition halos produced by the LAB around the wells was measured.



Ensayo de inhibición *in vivo* de las cepas de *Vibrio* spp. por cepas de BAL

Para este ensayo se obtuvo por donación de una empresa langostinera de la área de Zarumilla, 130 langostinos juveniles aparentemente sanos, de los cuales 117 fueron incluidos en el experimento. Se tuvieron dos tratamientos experimentales, para lo cual se aplicó al alimento balanceado las cepas de BAL que inhibieron mayor número de cepas de *Vibrio* spp. *in vitro* que fueron: C1L y F1L (la cepa F3L no se utilizó pues dejó de ser viable, ver sección de resultados). En el tratamiento control no se aplicó ninguna cepa al alimento.

Cada tratamiento tuvo tres repeticiones siendo cada una de ellas un acuario de 70 l conteniendo 13 langostinos de 1,3 g de peso promedio. Antes de iniciar el experimento se tomaron dos langostinos por acuario, éstos fueron sacrificados para determinar su carga inicial de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas, a través del recuento de colonias en agar TCBS. Las cepas de BAL (C1L y F1L) se aplicaron al alimento balanceado según el método de Esguerra (2012) con modificaciones, en breve se cultivó las cepas BAL en agar TSA por 48 h, luego en caldo TSB por 24 h adicionales, se diluyeron con caldo TSB estéril hasta obtener una concentración de 10^6 UFC/ml.

El medio TSB con las cepas BAL, se agregó al alimento balanceado humedeciéndolo uniformemente y se dejó secar por unos minutos. Se agregó aceite de pescado para mantener adheridas las cepas al alimento, así como para atraer al langostino para que lo consuma. La proporción aplicada fue de 1 g de cultivo de BAL y 5 ml de aceite de pescado, por cada 100 g de alimento. La preparación del alimento se hizo a diario, momentos antes de ser ofrecido a los langostinos en experimentación. Al alimento usado en el tratamiento control, sólo se le adicionó aceite de pescado (0,05 ml/g), mas no cepas de BAL.

La infección experimental, se llevó a cabo con una mezcla de cuatro cepas de *Vibrio* spp. no fermentadoras de sucrosa: E1V, E2V, C1V y C2V (concentración final de la mezcla de cepas: $1,5 \times 10^8$ UFC/ml); las mismas que se agregaron a un balde con 16 l de agua de los acuarios, aplicándose en cantidad suficiente para alcanzar una concentración en agua de 10^6 UFC/ml. Los langostinos de cada acuario fueron colocados por 10 min en dicho balde y luego regresados a sus acuarios. Se asignó aleatoriamente a cada acuario uno de los tratamientos (F1L, C1L o control).

In vivo testing of the inhibition of *Vibrio* spp. strains by LAB strains

For this test, 130 apparently healthy juvenile shrimps were donated by a shrimp company in the area of Zarumilla, out of which 117 were included in the experiment. Two experimental treatments were implemented, for which the LAB strains that inhibited the highest number of *Vibrio* spp. strains *in vitro* were applied to the balanced food. These strains were C1L and F1L (the F3L strain was not used, as it stopped being viable – see Results section). No strain was applied to the food in the control treatment.

Each treatment had three repetitions, each of which took place in a 70 l aquarium containing 13 shrimps weighing 1.3 g on average. Before beginning with the experiment, two shrimps per aquarium were taken, which were sacrificed in order to determine their initial *Vibrio* spp. load in the hepatopancreas, by means of a colony count in TCBS agar. The LAB strains (C1L and F1L) were applied to the balanced food by following the method by Esguerra (2012), with some modifications. The LAB strains were briefly cultivated in TSA agar for 48 h, and then in TSB for an additional 24 h. They were diluted with sterile TSB until a concentration of 10^6 UFC/ml was obtained.

The TSB medium with the LAB strains was added to the balanced food, uniformly humidifying it and letting it dry for some minutes. Fish oil was added to keep the strains adhered to the food, as well as to attract the shrimps to consume it. The applied proportion was 1 g of LAB culture and 5 ml of fish oil for every 100 g of food. Food preparation was carried out daily, moments before it was offered to the shrimps under experimentation. Only fish oil (0.05 ml/g) was added to the food used in the control treatment, as well as no LAB strains.

The experimental infection was performed with a mix of four non-sucrose-fermenting *Vibrio* spp. strains: E1V, E2V, C1V, and C2V (final concentration of the strain mix: 1.5×10^8 UFC/ml). These strains were added to a bucket with 16 l of water from the aquariums, with a sufficient amount being applied to reach a concentration of 10^6 UFC/ml in water. The shrimps from each aquarium were placed for 10 min in said bucket and then returned to their aquariums. One of the treatments was randomly assigned to each aquarium (F1L, C1L, or control).

El día de la infección, los langostinos de todos los tratamientos recibieron solo alimento balanceado. Los siguientes ocho días, se les alimentó según el tratamiento que les correspondió.

El experimento tomó ocho días; al quinto día se retiraron dos langostinos por acuario para realizar recuento de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas; y al finalizar el experimento se hizo conteo similar para todos los langostinos sobrevivientes. Diariamente se evaluó la supervivencia y el consumo de alimento, mientras que cada cuatro días se evaluó el crecimiento en peso de los langostinos en cada acuario.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el ensayo *in vitro* e *in vivo*, fueron procesados con análisis de varianza de una vía y la prueba de Duncan, ambas con un nivel de significancia de 0,05 procesados en el software R 3.5.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de langostinos para el aislamiento de *Vibrio* y BAL

Los 32 langostinos colectados tuvieron pesos entre 3,1 y 10,2 g con tallas entre 4,5 y 14,4 cm. Los signos de vibriosis observados en los langostinos incluyeron: cromatóforos expandidos, erosiones cuticulares con melanización, antenas rotas, intestino vacío, músculo opaco y necrosis, los cuales han sido descritos como parte de la sintomatología de las vibriosis en langostinos por Gómez-Gil *et al.* (2015), Chandrakala y Priya (2017) y de Souza y Wan (2021).

Aislamiento de cepas de *Vibrio* spp.

Las colonias que se formaron en TCBS (medio selectivo para *Vibrio*), tuvieron características compatibles con cepas de *Vibrio* spp. según lo indicado por Sabir *et al.* (2013), a saber: color verde o amarillo, circulares, con bordes enteros y con elevación convexa. Las colonias purificadas en agar tripticasa soya (TSA) con 2,5 % de NaCl mostraron características compatibles con cepas de *Vibrio* spp. respecto a su tinción de Gram, siendo Gram negativas, así como siendo positivas a las pruebas de catalasa y oxidasa, logrando crecimiento en soluciones de hasta 6 % de NaCl, conforme lo señalado por Rosado (2018). Se lograron aislar y purificar nueve cepas de *Vibrio* spp. que fueron designadas como C1V, C2V, F1V, E1V, E2V, E3V, E4V, E5V y E6V.

Aislamiento de cepas de BAL

Las colonias crecidas en el agar MRS mostraron morfología y coloración compatibles con BAL (forma circular,

On the day of infection, the shrimps corresponding to all treatments received only balanced food. During the next eight days, they were fed according to their respective treatments.

The experiment lasted for eight days. On the fifth day, two shrimps per aquarium were taken in order to perform a count of *Vibrio* spp. in the hepatopancreas. At the end of the experiment, a similar count was carried out for all surviving shrimps. Survival and food consumption were evaluated daily, while the weight increase of the shrimps in each aquarium was evaluated every four days.

Statistical analysis

The data obtained during *in vitro* and *in vivo* testing were processed via a one-way analysis of variance and a Duncan test, both with a significance level of 0.05, using the R 3.5.2 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Obtaining shrimps for isolating *Vibrio* and LAB

The 32 collected shrimps weighed between 3.1 and 10.2 g, with sizes between 4.5 and 14.4 cm. The signs of vibriosis observed in the shrimps included expanded chromatophores, cuticular erosions with melanization, broken antennae, empty bowels, opaque muscles, and necrosis, which have been described as part of the symptoms of vibriosis in shrimps by Gómez-Gil *et al.* (2015), Chandrakala and Priya (2017), and de Souza and Wan (2021).

Isolating *Vibrio* spp. strains

The colonies that formed in TCBS (selective medium for *Vibrio*) had compatible characteristics with *Vibrio* spp. strains, according to that indicated by Sabir *et al.* (2013): green- or yellow-colored, circular, with entire margins, and with convex elevation. The colonies purified in trypticase soy (TSA) with 2.5 % NaCl showed compatible characteristics with *Vibrio* spp. strains. They were Gram-negative, and they were positive to the catalase and oxidase tests, managing to grow in solutions of up to 6 % NaCl, according to that pointed out by Rosado (2018). Nine *Vibrio* spp. strains could be isolated and purified, which were labeled as: C1V, C2V, F1V, E1V, E2V, E3V, E4V, E5V, and E6V.

Isolating LAB strains

The colonies that were grown in MRS agar showed a morphology and coloration compatible with LAB (circular

color blanco o beige, elevación convexa, superficie lisa y borde entero) según lo señalan Sánchez *et al.* (2017) y Quispe *et al.* (2020). Las cepas purificadas en TSA mostraron resultados para las pruebas de tinción de Gram, oxidasa y catalasa, que fueron compatibles con las esperadas para cepas de BAL siendo Gram positivas y resultando negativas a las pruebas de oxidasa y catalasa como lo señaló Churqui (2017). Se pudieron aislar nuevas cepas de BAL que fueron denominadas: C1L, C2L, C3L, C4L, F1L, F2L, F3L, F4L y F5L.

Resistencia antibiótica de *Vibrio* spp.

Entre los antibióticos empleados en el antibiograma realizado a las cepas de *Vibrio* spp., la fosfomicina y el ácido nalidixico fueron los que produjeron los halos más reducidos, con diámetros de $0,3 \pm 0,6$ mm y $1,6 \pm 1,7$ mm respectivamente; mientras que los halos más amplios fueron producidos por oxitetraciclina, ampicilina, florfenicol, cloranfenicol y tetraciclina con diámetros promedio que fluctuaron entre $32,2 \pm 0,9$ mm y $38,3 \pm 1,7$ mm (Tabla 2).

Tabla 2. Diámetro (mm) de halos de inhibición producidos por 10 antibióticos en *Vibrio* spp.

Cepa / Strain	Penicilinas / Penicillins	Fosfonatos / Phosphonates	Fenicoles / Amphenicols		Tetracilinas / Tetracyclines		Aminoglucósidos / Aminoglycosides	Quinolonas / Quinolones		
	Ampicilina / Ampicillin (10 µg)	Fosfomicina / Fosfomycin (50 µg)	Cloranfenicol / Chloramphenicol (30 µg)	Florfenicol / Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina / Oxytetracycline (30 µg)	Tetraciclina / Tetracycline (30 µg)	Gentamicina / Gentamicin (10 µg)	Acido nalidixico / Nalidixic acid (30 µg)	Enrofloxacin / Enrofloxacin (5 µg)	Norfloxacina / 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
Media / Mean	33.0	0.3	32.2	33.0	38.3	32.2	31.7	1.6	31.9	19.6
Desviación estándar / Standard deviation	3.9	0.6	2.0	2.3	1.7	0.9	2.3	1.7	2.1	1.6

shape, white or beige coloration, convex elevation, flat surface, and entire margins), as pointed out by Sánchez *et al.* (2017) and Quispe *et al.* (2020). The strains purified in TSA yielded the results expected for LAB with respect to the Gram staining, oxidase, and catalase tests, *i.e.*, they were Gram-positive and negative regarding the oxidase and catalase tests, as pointed out by Churqui (2017). Nine LAB strains could be isolated, which were dubbed C1L, C2L, C3L, C4L, F1L, F2L, F3L, F4L, and F5L.

Antibiotic resistance of *Vibrio* spp.

Among the antibiotics employed in the antibiogram elaborated for the *Vibrio* spp. strains, fosfomicin and nalidixic acid were the ones which produced the smallest halos, with diameters of 0.3 ± 0.6 mm and 1.6 ± 1.7 mm, respectively; whereas the widest halos were produced by oxytetracycline, ampicillin, florfenicol, chloramphenicol, and tetracycline, with average diameters that fluctuated between 32.2 ± 0.9 mm and 38.3 ± 1.7 mm (Table 2).

Table 2. Diameter (mm) of inhibition halos produced by 10 antibiotics in *Vibrio* spp.

Las cepas evaluadas tuvieron un MAR de 0,2 y mostraron resistencia solo a la fosfomicina como al ácido nalidíxico, con la única excepción de C2V, que frente a la norfloxacina mostró una sensibilidad intermedia (Tabla 3).

The evaluated strains had a MAR of 0.2 and exhibited resistance only to fosfomicin and nalidixic acid, with C2V being the only exception, which showed an intermediate sensitivity to norfloxacin (Table 3).

Tabla 3. Resistencia y sensibilidad a antibióticos en cepas de *Vibrio* spp. (R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible).

Table 3. Resistance and sensitivity to antibiotics in *Vibrio* spp. strains (R = resistant, I = intermediate, S = sensitive).

Cepa / Strain	Penicilinas / Penicillins	Fosfonatos / Phosphonates	Fenicoles / Amphenicols		Tetracilinas / Tetracyclines		Aminoglucósidos / Aminoglycosides	Quinolonas / Quinolones		
	Ampicilina / Ampicillin (10 µg)	Fosfomicina / Fosfomycin (50 µg)	Cloranfenicol / Chloramphenicol (30 µg)	Florfenicol / Florfenicol (30 µg)	Oxitetraciclina / Oxytetracycline (30 µg)	Tetraciclina / Tetracycline (30 µg)	Gentamicina / Gentamicine (10 µg)	Acido nalidíxico / Nalidixic acid (30 µg)	Enrofloxacin / Enrofloxacin (5 µg)	Norfloxacin / Norfloxacin (10 µg)
C1V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
C2V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	I
F1V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E1V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E2V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E3V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E4V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E5V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E6V	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S

El hecho que las cepas de *Vibrio* spp. mostraran resistencia al menos a un antibiótico, es común en estas bacterias. Varias investigaciones lo han reportado; así Banerjee *et al.* (2012), lo encontraron en 97,6 % de cepas aisladas de langostinos cultivados en Malasia; en Brasil, Rebouças *et al.* (2011) lo halló en 75 % de sus cepas y Albuquerque *et al.* (2015) en 61 % de las suyas.

Las cepas *Vibrio* spp. evaluadas en este estudio fueron resistentes a la fosfomicina y el ácido nalidíxico, este hecho no es algo aislado; pues resistencias similares ya se han verificado anteriormente. Así, cepas de *V. cholerae*, aisladas por Uppal *et al.* (2017) fueron resistentes a fosfomicina; mientras que cepas de *Vibrio* spp. aisladas por Aguirre (2019), mostraron resistencia al ácido nalidíxico aunque en menor grado de lo encontrado aquí.

The fact that the *Vibrio* spp. strains showed resistance to at least one antibiotic is common in these bacteria. Several studies have reported this. Banerjee *et al.* (2012) found it in 97.6 % of strains isolated from shrimps grown in Malaysia; in Brazil, Rebouças *et al.* (2011) found it in 75 % of their strains, and Albuquerque *et al.* (2015) in 61 % of theirs.

The *Vibrio* spp. strains evaluated in this study were resistant to fosfomicin and nalidixic acid, which is not an isolated fact, given that similar resistances have already been verified. Thus, *V. cholerae* strains isolated by Uppal *et al.* (2017) were resistant to fosfomicin, while *Vibrio* spp. strains isolated by Aguirre (2019) showed resistance to nalidixic acid, albeit to a lesser extent regarding the findings of this study.

Sin embargo la resistencia a ambos antibióticos no es constante en cepas de *Vibrio*, como lo indica Sotomayor *et al.* (2019) quienes encontraron, sensibilidad al ácido nalidíxico en 100 % de sus cepas y a la fosfomicina en 95 % de ellas; sin embargo, encontrar resistencia a diferentes antibióticos en *Vibrio* spp. es posible dado que según Zhao *et al.* (2018) en estas cepas se encuentra una gran cantidad de genes de resistencia a diversos antibióticos. Todas las cepas de *Vibrio* spp. evaluadas mostraron un MAR de 0,2; indicando un bajo índice de resistencia a antibióticos (Devi *et al.*, 2009); este valor se encuentra dentro de los rangos registrados para *Vibrio* en los estudios de Tan *et al.* (2020) (0,04 a 0,71), Kurdi *et al.* (2019) (0,2 a 0,7) y Letchumanan *et al.* (2019) (0,21 a 0,79), siendo además similar al hallado por Sotomayor *et al.* (2019) en una *hatchery* de langostinos en Ecuador que fue de 0,23.

Las cepas de *Vibrio* spp. aisladas en esta investigación fueron resistentes a la fosfomicina y al ácido nalidíxico; pertenecientes a solo dos familias antibióticas (fosfonatos y quinolonas), por ello ninguna fue clasificada como multiresistente según el criterio de Bleichenbacher *et al.* (2020). La resistencia antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp. puede ser explicada por la existencia de múltiples mecanismos de resistencia en las bacterias de dicha especie, así se ha demostrado que la resistencia a fosfomicina es bastante frecuente pues, este antibiótico ingresa a la célula bacteriana a través de un transportador glicerofosfato no esencial, por lo que la mutación de tal transportador podría bloquear su ingreso sin alterar la viabilidad celular, por otro lado también se ha observado que cepas de *Vibrio* spp. pueden inactivar enzimáticamente al antibiótico (Dutta *et al.* 2021). En el caso de la resistencia al ácido nalidíxico que se ha observado en las cepas investigadas, se ha verificado que las bacterias pueden sufrir una mutación que altere el blanco de acción del ácido nalidíxico en la enzima DNA girasa haciendo que el antibiótico no tenga actividad (Dutta *et al.* 2021).

Inhibición *in vitro* de *Vibrio* spp. por cepas de BAL nativas

De las nueve cepas de BAL que se emplearon en el ensayo *in vitro*, tres inhibieron el mayor número de cepas de *Vibrio* spp. al aplicarse como sobrenadante o cultivo (C1L, F1L y F3L), dos tuvieron un menor efecto (C3L y F4L) inhibiendo tres y cinco cepas respectivamente y las restantes (C2L, C4L y F2L) no tuvieron poder inhibitorio (Tabla 4). En el caso de la cepa F5L, el cultivo no tuvo poder inhibitorio (diámetro del halo de 0 ± 0 mm) pero el

However, resistance to both antibiotics is not constant in *Vibrio* strains, as indicated by Sotomayor *et al.* (2019), who found sensitivity to nalidixic acid in 100 % of their strains, as well as to fosfomicin in 95 % of them. Nevertheless, finding a resistance to different antibiotics in *Vibrio* spp. is possible because, according to Zhao *et al.* (2018), in these strains, there is a large amount of genes involving resistance to diverse antibiotics. All of the evaluated *Vibrio* spp. strains showed a MAR of 0.2, indicating a low antibiotic resistance index (Devi *et al.*, 2009). This value is within the ranges reported for *Vibrio* in the studies conducted by Tan *et al.* (2020) (0.04 to 0.71), Kurdi *et al.* (2019) (0.2 to 0.7), and Letchumanan *et al.* (2019) (0.21 to 0.79), and it is also similar to that found by Sotomayor *et al.* (2019) in a shrimp hatchery in Ecuador (0.23).

The *Vibrio* spp. strains isolated in this research were resistant to fosfomicin and nalidixic acid, which belong to only two families of antibiotics (phosphonates and quinolones), which is why none of them was classified as multi-resistant according to the criteria by Bleichenbacher *et al.* (2020). The antibiotic resistance of the *Vibrio* spp. strains can be explained by the existence of multiple resistance mechanisms in the bacteria of this species. Thus, it has been demonstrated that a resistance to fosfomicin is very frequent, given that this antibiotic enters the bacterial cell through a non-essential glycerophosphate transporter, which is why a mutation in said transporter may block its entrance without altering cellular viability. On the other hand, it has also been observed that *Vibrio* spp. strains can enzymatically inactivate the antibiotic (Dutta *et al.* 2021). As for the resistance to nalidixic acid observed in the studied strains, it has been confirmed that the bacteria can undergo a mutation that alters nalidixic acid's target of action in the DNA-gyrase enzyme, causing the antibiotic to show no activity (Dutta *et al.* 2021).

***In vitro* inhibition of *Vibrio* spp. by native LAB strains**

Out of the nine LAB strains employed in *in vitro* testing, three of them inhibited the largest number of *Vibrio* spp. strains when applied as supernatant or culture (C1L, F1L, and F3L); two of them had a lesser effect (C3L and F4L), inhibiting three and five strains, respectively; and the remaining strains (C2L, C4L, and F2L) had no inhibitory power (Table 4). In the case of the F5L strain, the culture had no inhibitory power (halo diameter: 0 ± 0 mm), but the supernatant could slightly inhibit (halo diameter: 2.5 ± 6.1 mm) the C2V *Vibrio* spp. strain. The fact that

sobrenadante pudo inhibir ligeramente (diámetro del halo de $2,5 \pm 6,1$ mm) a la cepa C2V de *Vibrio* spp.; el hecho que los sobrenadantes en forma consistente tuvieran frecuentemente un poder inhibitor similar al cultivo bacteriano, indica que la actividad inhibitora se da posiblemente a través de la producción de metabolitos que son excretados por las BAL, tales como péptidos antimicrobianos o bacteriocinas, ácidos orgánicos, etanol, y peróxido de hidrógeno (Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

Las cepas de BAL que produjeron mayores halos de inhibición fueron las cepas F3L (tanto sobrenadante como cultivo), F4L y F1L (ambas como cultivo) ($p < 0,05$), ellas ocasionaron halos con diámetros entre $8,0 \pm 5,9$ mm y $11,7 \pm 3,9$ mm; que fueron similares a los reportados por Le y Yang (2018) para *Lactobacillus* spp., aislados de langostinos fermentados, al inhibir a *Vibrio parahaemolyticus*, cuyos diámetros fueron superiores a 8 mm. Los resultados muestran que las cepas C1L, F1L y F3L tuvieron un prometedor poder probiótico contra *Vibrio* spp. a nivel *in vitro*.

supernatants consistently had an inhibitory power similar to that of the bacterial culture indicates that inhibitory activity may occur by means of the production of metabolites that are excreted by the LAB, such as antimicrobial peptides or bacteriocins, organic acids, ethanol, and hydrogen peroxide (Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

The LAB strains that produced the largest inhibition halos were the F3L strains (both supernatant and culture) and F4L and F1L (both as culture) ($p < 0.05$). These caused halos with diameters between 8.0 ± 5.9 mm and 11.7 ± 3.9 mm, which were similar to those reported by Le and Yang (2018) for *Lactobacillus* spp. isolated from fermented shrimps, inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*, whose diameters were greater than 8 mm. The results show that the strains C1L, F1L, and F3L exhibited a promising probiotic power against *Vibrio* spp. at the *in vitro* level.

Tabla 4. Diámetro de halos de inhibición producidos por cepas BAL en *Vibrio* spp.

Cepa de BAL / LAB strain	Componente utilizado / Component employed	Diámetro del halo de inhibición / Inhibition halo diameter (mm) ($\bar{x} \pm \sigma$)*	Número de cepas inhibidas / Number of inhibited strains	Cepa de <i>Vibrio</i> spp. inhibida / Inhibited <i>Vibrio</i> spp. strain
C1L	Sobrenadante / Supernatant	5.5 ± 4.6^{bc}	6	C1V, C2V, E2V, E3V, E5V, E6V
	Cultivo / Culture	6.0 ± 3.3^{bc}	6	
C2L	Sobrenadante / Supernatant	0.0 ± 0.0^d	0	
	Cultivo / Culture	0.0 ± 0.0^d	0	
C3L	Sobrenadante / Supernatant	5.2 ± 5.7^{bc}	3	E3V, E5V, E6V
	Cultivo / Culture	4.3 ± 5.0^{bcd}	3	
C4L	Sobrenadante / Supernatant	0.0 ± 0.0^d	0	
	Cultivo / Culture	0.0 ± 0.0^d	0	
F1L	Sobrenadante / Supernatant	6.2 ± 2.9^{bc}	6	C1V, E1V, E2V, E4V, E5V, F1V
	Cultivo	10.8 ± 3.8^a	6	
F2L	Sobrenadante / Supernatant	0.0 ± 0.0^d	0	
	Cultivo / Culture	0.0 ± 0.0^d	0	
F3L	Sobrenadante / Supernatant	8.7 ± 4.3^{ab}	6	C2V, E1V, E3V, E4V, E6V, F1V
	Cultivo / Culture	11.7 ± 3.9^a	6	
F4L	Sobrenadante / Supernatant	5.5 ± 4.3^{bc}	5	E1V, E3V, E4V, E6V, F1V
	Cultivo / Culture	8.0 ± 5.9^{ab}	5	
F5L	Sobrenadante / Supernatant	2.5 ± 6.1^{cd}	1	C2V
	Cultivo / Culture	0.0 ± 0.0^d	0	

* Letras diferentes indican diferencia estadística significativa según la prueba post-hoc de Duncan ($p < 0,05$).

Table 4. Diameter of inhibition halos produced by LAB strains in *Vibrio* spp.

* Different letters indicate a significant statistical difference according to the post-hoc Duncan test ($p < 0.05$).

Supervivencia en langostinos infectados experimentalmente con *Vibrio* spp. y tratados con BAL

Los langostinos infectados experimentalmente con *Vibrio* spp., que recibieron alimento balanceado con las cepas BAL ensayadas (C1L o F1L), mantuvieron una supervivencia significativamente superior a aquellos que recibieron sólo alimento balanceado, desde el segundo día post-infección hasta el fin del ensayo. En cuanto al crecimiento en peso, no se tuvo diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos en ninguno de los días del experimento, el peso promedio varió entre 1,4 a 1,6 g, así como el consumo de alimento, medido como tasa de alimentación (peso de alimento/biomasa), también fue similar entre todos los tratamientos, no existiendo diferencia estadística significativa ($p > 0,05$), la tasa de alimentación varió de 8 % en los primeros cuatro días del experimento a 6 % en los últimos cuatro días.

Desde el tercer día post-infección, en los tratamientos con las BAL, no se produjo muertes de langostinos y se mantuvo la misma supervivencia ($92,3 \pm 0,0$ %) hasta el octavo día (fin del experimento); sin embargo los langostinos que no recibieron tratamiento con las BAL (tratamiento control), redujeron permanentemente su supervivencia hasta llegar al fin del experimento con $51,3 \pm 4,4$ %. Al final del experimento, los tratamientos en que se aplicó las cepas BAL (C1L y F1L) tuvieron la misma supervivencia, que fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) a la correspondiente al tratamiento control (Figura 2).

Survival in shrimps that were experimentally infected with *Vibrio* spp. and treated with LAB

The shrimps that were experimentally infected with *Vibrio* spp. and received balanced food with the LAB strains under testing (C1L or F1L) maintained a significantly superior survival to those that only received balanced food, *i.e.*, from the second post-infection day to the end of the test. As for the weight increase, there was no significant statistical difference ($p > 0.05$) between the treatments regarding any day of the experiment. The average weight varied between 1.4 and 1.6 g, and food consumption, measured as a feed rate (food weight/biomass), was also similar in all treatments, there was no significant statistical difference ($p > 0.05$). The feed rate varied from 8 % in the first four days of the experiment to 6 % in the last four days.

From the third post-infection day, in the treatments with LAB, no shrimp deaths occurred, and the same survival was maintained (92.3 ± 0.0 %) until the eighth day (end of the experiment). However, the survival of the shrimps that did not receive LAB treatment (control) was permanently reduced until the end of the experiment, which showed values of 51.3 ± 4.4 %. At the end of the experiment, the treatments on which the LAB strains were applied (C1L and F1L) showed the same survival, which was statistically superior ($p < 0.05$) to that of the control treatment (Figure 2).

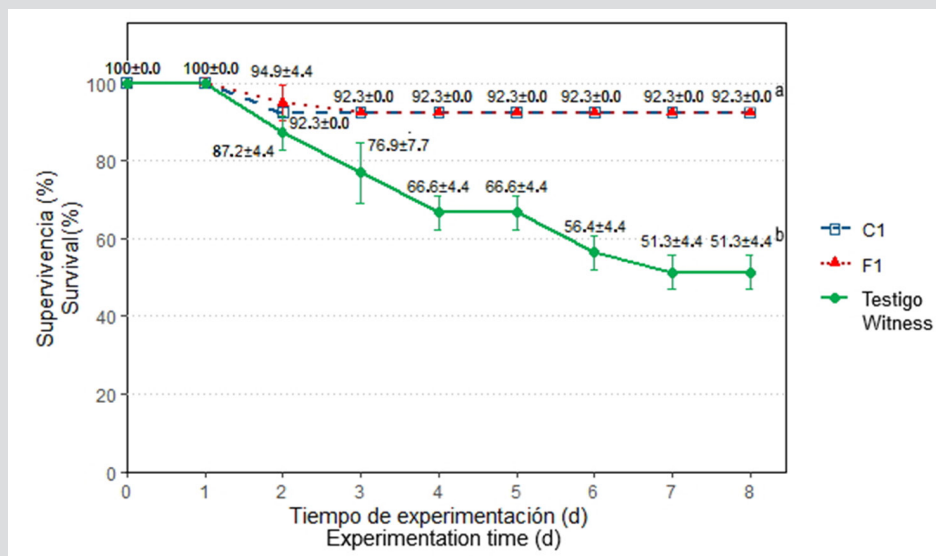


Figura 2. Supervivencia en langostinos infectados experimentalmente y tratados con alimento con cepas de BAL en el ensayo *in vivo*. Las letras que aparecen como superíndice indican diferencia estadísticamente significativa según la prueba post-hoc de Duncan.

Figure 2. Survival in shrimps experimentally infected and treated with food including LAB strains during *in vivo* testing. Superscript letters indicate a significant statistical difference according to the *post-hoc* Duncan test.

Los datos de la supervivencia de este ensayo son similares a los observados por Karthik *et al.* (2014) en un ensayo con *Penaeus monodon* y *L. vannamei* infectados con *Vibrio harveyi* y tratados con una cepa de *Lactobacillus* sp., en el que encontraron, a los 10 días post-infección, que las supervivencias de *P. monodon* y *L. vannamei* fueron de 94 % y 88 %, en tanto que en los tratamientos control, solo se tuvieron supervivencias de 20 % y 12 % respectivamente. Este tipo de comportamiento es indicador de un efecto inhibitorio *in vivo* de las cepas de BAL sobre las cepas de *Vibrio* spp. en langostinos. El poder inhibitorio mostrado por las cepas de BAL ensayadas (C1L y F1L) *in vivo*, aunado al hecho que dichas cepas fueron aisladas de langostinos de la zona, permiten inferir que aparte del poder bactericida demostrado *in vitro* e *in vivo*, las cepas son capaces de establecerse en el intestino del langostino protegiendo al langostino de la mortalidad generada por las cepas de *Vibrio* spp.

Recuento de colonias de *Vibrio* spp. en langostinos infectados

Del primer al quinto día del ensayo, el recuento de colonias de *Vibrio* spp. en hepatopáncreas de los langostinos infectados experimentalmente, fue estadísticamente similar en todos los tratamientos. Sin embargo al final del ensayo, en el octavo día post-infección, el recuento de *Vibrio* spp. fue significativamente menor ($p < 0,05$), en los tratamientos que utilizaron cepas de BAL ($9,64 \times 10^4$ y $9,33 \times 10^4$ UFC/g para las cepas F1L y C1L respectivamente) que en el tratamiento control ($1,02 \times 10^6$ UFC/g) (Tabla 5).

Una tendencia similar se ha reportado en las investigaciones de Huynh *et al.* (2018, 2019) y Karthik *et al.* (2014), en las que se encontró que al aplicar *Lactobacillus* sp. en el alimento balanceado, se alteró la composición de la comunidad intestinal de *L. vannamei*, disminuyendo marcadamente las poblaciones de bacterias patógenas de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*. En vista de los resultados observados con la aplicación de las cepas BAL en el alimento balanceado, sobre la supervivencia y en el recuento de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas del langostino se puede afirmar que las cepas C1L y F1L son capaces de inhibir a *Vibrio* spp. en langostinos infectados experimentalmente, siendo cepas con potencial para desarrollar un probiótico comercial que pueda ser aplicado en los cultivos de langostino de la región.

In this test, the survival data are similar to those observed by Karthik *et al.* (2014) in a test with *Penaeus monodon* and *L. vannamei* infected with *Vibrio harveyi* and treated with a strain of *Lactobacillus* sp., in which they found that the survival rates of *P. monodon* and *L. vannamei* were 94 % and 88 % ten days after the infection, whereas the control treatment only showed values of 20 % and 12 %, respectively. This type of behavior is an indicator of an *in vivo* inhibitory effect of LAB strains on *Vibrio* spp. strains in shrimps. The *in vivo* inhibitory power shown by the tested LAB strains (C1L and F1L), in addition to the fact that said strains were isolated from shrimps in the area, allow inferring that, apart from the bactericidal effect demonstrated both *in vitro* and *in vivo*, the strains can establish themselves in the shrimps' intestine, protecting them from the mortality caused by *Vibrio* spp. strains.

Vibrio spp. colony count in infected shrimps

From the first to the fifth day of testing, the *Vibrio* spp. colony count of the experimentally infected shrimps was statistically similar in all treatments. However, at the end of the test, on the eighth post-infection day, the *Vibrio* spp. count was significantly lower ($p < 0.05$) in the treatments using LAB strains (9.64×10^4 and 9.33×10^4 UFC/g for the F1L and C1L strains, respectively) than in the control treatment (1.02×10^6 UFC/g) (Table 5).

A similar trend has been reported in the studies conducted by Huynh *et al.* (2018), Huynh *et al.* (2019), and Karthik *et al.* (2014), where it was found that, by applying *Lactobacillus* sp. to the balanced food, the composition of the intestinal community of *L. vannamei* was altered, strongly reducing the populations of pathogenic bacteria of the genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In light of the results observed with the application of LAB strains to the balanced food, regarding the survival and *Vibrio* spp. count in shrimp hepatopáncreas, it can be stated that the C1L and F1L strains can inhibit *Vibrio* spp. in experimentally infected shrimps. These strains show potential for developing a commercial probiotic that can be implemented in shrimp crops in the region.



Tabla 5. Recuento de cepas de *Vibrio* spp. (UFC/g) en hepatopáncreas de langostinos según tratamiento en ensayo *in vivo*

Día de experimentación / Experimentation day	Tratamientos / Treatments		
	Control / Control	C1L / C1L	F1L / F1L
1	$1.50 \times 10^1 \pm 1.76 \times 10^1$ ^a	$6.67 \times 10^0 \pm 1.15 \times 10^0$ ^a	$1.23 \times 10^1 \pm 4.04 \times 10^0$ ^a
5	$5.05 \times 10^5 \pm 2.14 \times 10^5$ ^a	$3.80 \times 10^5 \pm 1.39 \times 10^5$ ^a	$3.64 \times 10^5 \pm 1.96 \times 10^5$ ^a
8	$1.02 \times 10^6 \pm 4.97 \times 10^5$ ^a	$9.33 \times 10^4 \pm 4.50 \times 10^4$ ^b	$9.64 \times 10^4 \pm 3.59 \times 10^4$ ^b

* Letras diferentes indican resultados estadísticamente diferentes.

Table 5. *Vibrio* spp. strain count (UFC/g) in shrimp hepatopancreas according to the treatment applied during *in vivo* testing

* Different letters indicate statistically different results.

CONCLUSIONES

Las nueve cepas de *Vibrio* spp. aisladas de langostinos de cultivo en Tumbes, tuvieron baja resistencia a antibióticos con índice MAR de 0,2, siendo resistentes a fosfomicina y ácido nalidíxico; no existiendo ninguna multirresistente.

Tres de las cepas de BAL nativas (F1L, C1L y F3L) aisladas de langostinos de cultivo, al ser aplicadas como sobrenadante o como cultivo pudieron inhibir *in vitro* a la mayoría de cepas de *Vibrio* spp, demostrando poder probiótico *in vitro*.

En el ensayo *in vivo*, las cepas F1L y C1L, incrementaron significativamente ($p < 0,05$) la supervivencia de langostinos infectados experimentalmente con cepas de *Vibrio* spp., así como redujeron significativamente ($p < 0,05$) el recuento de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los mismos, luego de ocho días post-infección.

Se concluye que las cepas de bacterias ácido lácticas F1L y C1L poseen potencial probiótico, demostrado a nivel *in vitro* e *in vivo*, frente a cepas de *Vibrio* spp. que afectan a langostinos de cultivo. Dichas cepas potencialmente podrían ser empleadas para desarrollar un probiótico comercial para combatir la vibriosis en cultivos de la región Tumbes y zonas aledañas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tumbes, por ayudar a financiar parte de esta investigación mediante el Proyecto de Investigación Avanzada: Desarrollo de alternativas terapéuticas para tratamiento de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos en *Litopenaeus vannamei*, autorizado mediante Resolución 0904-2018/UNTUMBES-CU.

CONCLUSIONS

The nine *Vibrio* spp. strains isolated from cultured shrimps in Tumbes showed a low resistance to antibiotics, with an MAR index of 0.2 and being resistant to fosfomicin and nalidixic acid. There is no multi-resistant strain.

Three out of the native LAB strains (F1L, C1L, and F3L) isolated from cultured shrimps, when applied as supernatant or as culture, could inhibit most *Vibrio* spp. strains *in vitro*, thus exhibiting *in vitro* probiotic power.

In the *in vivo* test, the F1L and C1L strains significantly increased ($p < 0.05$) the survival of shrimps that were experimentally infected with *Vibrio* spp. strains, and they significantly reduced ($p < 0.05$) the *Vibrio* spp. count in their hepatopancreas eight days after infection.

It is concluded that the lactic acid bacteria strains F1L and C1L have probiotic potential, which was demonstrated both *in vitro* and *in vivo*, against *Vibrio* spp. strains that affect cultured shrimps. Said strains could potentially be employed to develop a commercial probiotic to tackle vibriosis in crops in the region of Tumbes and its neighboring areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Universidad Nacional de Tumbes for helping us to fund part of this research via the Advanced Research Project titled Development of therapeutical alternatives for treating antibiotic-resistant *Vibrio* spp. in *Litopenaeus vannamei*, authorized through Resolution 0904-2018/UNTUMBES-CU.

BIBLIOGRAFÍA/LITERATURE CITED

- Aguirre, L.E. 2019. Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos, aislados de *Litopenaeus vannamei*. Tesis Ing. Pesq., Univ. Nacional de Tumbes, Tumbes. 62 p.
- Albuquerque, R., R.L. Araújo, O.V. Souza and R.H.S. Vieira. 2015. Antibiotic-resistant vibrios in farmed shrimp. Biomed. Res. Int., 2015:1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/505914>
- Aranguren, L.F., H.N. Mai, B. Noble and A.K. Dhar. 2020. Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in Latin America. J. Invertebr. Pathol., 174:107424. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>
- Banerjee, S., M.C. Ooi, M. Shariff and H. Khatoun. 2012. Antibiotic resistant *Salmonella* and *Vibrio* associated with farmed *Litopenaeus vannamei*. Sci. World. J., 2012:1–6. <https://doi.org/10.1100/2012/130136>
- Bermúdez-Almada, M.D.C., A. Espinosa-Plascencia, M.L. Santiago-Hernández, C.J. Barajas-Borgo and E. Acedo-Félix. 2014. Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. Biotecnia, 16(3):29. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/138>
- Bleichenbacher, S., M.J.A. Stevens, K. Zurfluh, V. Perreten, A. Endimiani, R. Stephan and M. Nüesch-Inderbinen. 2020. Environmental dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rivers in Switzerland. Environ. Pollut., 265: 115081. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115081>
- 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 Med. Vet., Universidad Austral de Chile, Valdivia. 95 p.
- Chandrakala, N. and S. Priya. 2017. Vibriosis in shrimp aquaculture a review. Int. J. Sci. Eng., 3(2):27–33.
- Churqui, J.M. 2020. Bacterias ácido lácticas aisladas con capacidad antagonica de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de Puno-2017. Tesis Biol., Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 58 p.
- CLSI. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Supplement M100. 29th ed. CLSI, Wayne. 282 p.
- Culot, A., N. Grosset, Q. Bruey, M. Auzou, J.-C. Giard, B. Favard, A. Wakatsuki, S. Baron, S. Frouel, C. Techer and M. Gautier. 2021. Isolation of Harveyi clade *Vibrio* spp. collected in aquaculture farms: How can the identification issue be addressed?. J. Microbiol. Meth., 180:106106. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106106>
- de Souza, C. and A.H.L. Wan. 2021. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. J. Invertebr. Pathol., 181: 107527. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>
- Devi, R., P.K. Surendran and K. Chakraborty. 2009. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the southwest coast of India. World J. Microbiol. Biotechnol., 25(11):2005–2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0101-8>
- Dutta, D., A. Kaushik, D. Kumar and S. Bag. 2021. Foodborne pathogenic vibrios: Antimicrobial resistance. Front. Microbiol., 12: 638331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638331>
- Esguerra, D.A. 2012. Evaluación en un sistema cerrado de cuatro aislados bacterianos con potencial probiótico en la dieta de tilapia *Oreochromis niloticus*. Tesis Biol. Mar., Univ. Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta. 48 p.
- FAO. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020. FAO, Rome. 224 p.
- Gómez-Gil, B., A. Roque and S. Soto-Rodríguez. 2015. Vibriosis en camarones y su diagnóstico: 137–150. En: Ruiz-Luna, A., C.A. Berlanga-Robles y M. Betancourt (Eds.). Avances en acuicultura y manejo ambiental. Trillas: CIAD, Hermosillo. 150 p.
- Huynh, T.-G., C.-C. Chi, T.-P. Nguyen, T.-T.-T.H. Tran, A.-C. Cheng and C.-H. Liu. 2018. Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Res., 49(7):2416–2428. <https://doi.org/10.1111/are.13701>
- Huynh, T.-G., S.-Y. Hu, C.-S. Chiu, Q.-P. Truong and C.-H. Liu. 2019. Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. Aquac. Res., 50(3):807–817. <https://doi.org/10.1111/are.13951>
- Jeyasanta, K.I., T. Lilly and J. Patterson. 2017. Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistants. Asian J. Appl. Sci., 1(8):100–111.
- Karthik, R., A.J. Hussain and R. Mutheszilan. 2014. Effectiveness of *Lactobacillus* sp (AMET1506) as probiotic against vibriosis in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp aquaculture. Biosci. Biotechnol. Res. Asia, 11(SE):297–305. <https://doi.org/10.13005/bbra/1423>
- Kewcharoen, W. and P. Srisapoom. 2019. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). Fish Shellfish Immunol., 94: 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.013>
- Khelissa, S., N.-E. Chihib and A. Gharsallaoui. 2020. Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. Arch. Microbiol., 203(2):465–480. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>



- Krishnani, K.K., V. Kathiravan, N.A. Shakil, M.K. Singh, M.P. Brahmane, K.K. Meena, B. Sarkar, K. Choudhary, M.K. Singh and J. Kumar. 2015. Bactericidal activity of nanopolymers against shrimp pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*. Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci., 85(4):1079–1086. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0517-x>
- Kumaran, M., P.R. Anand, J.A. Kumar, T. Ravisankar, J. Paul, K.P.K. Vasagam, D.D. Vimala and K.A. Raja. 2017. Is Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming in India is technically efficient? — A comprehensive study. Aquaculture, 468: 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.019>
- Kurdi, M.M., S. Mutalib, M. Ghani, N.A.M. Zaini and A.A. Ariffin. 2019. Multiple antibiotic resistance (MAR), plasmid profiles, and DNA polymorphisms among *Vibrio vulnificus* isolates. Antibiotics, 8(2):68. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020068>
- Lamari, F., K. Sadok, A. Bakhrouf and F.-J. Gatesoupe. 2014. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia nauplii*. Aquac. Int., 22(2):699–709. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9699-5>
- Le, B. and S.H. Yang. 2018. Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus*. J. Microbiol., 56(2):138–144
- Letchumanan, V., N.-S. Ab Mutalib, S.H. Wong, K.-G. Chan and L.-H. Lee. 2019. Determination of antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp and shellfish in Selangor, Malaysia. Prog. Microbes Mol. Biol., 2(1):a0000019.
- Luis-Villaseñor, I.E., D. Voltolina, B. Gomez-Gil, F. Ascencio, Á.I. Campa-Córdova, J.M. Audelo-Naranjo and O.O. Zamudio-Armenta. 2015. Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(4):766–775. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue4-fulltext-15>
- Mahjoub, M., M. Mirbakhsh, M. Afsharnasab, S. Kakoolaki and S. Hosseinzadeh. 2019. Inhibitory activity of native probiotic *Bacillus vallismortis* IS03 against pathogenic *Vibrio harveyi* under *in vitro* and *in vivo* conditions in *Litopenaeus vannamei*. Iran. J. Aquat. Anim. Health, 5(2): 54–66. <https://doi.org/10.29252/ijaah.5.2.54>
- Mulyadi, N.I. and W. Iba. 2020. Efficacy of seaweed (*Sargassum* sp.) extract to prevent vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juvenile. Int. J. Zool. Res., 16(1):1–11. <https://doi.org/10.3923/ijzr.2020.1.11>
- NCCLS. 1999. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. NCCLS Document M7-A3. 3rd Edition. NCCLS, Wayne. 282 p.
- Pandiyan, P., D. Balaraman, R. Thirunavukkarasu, E.G.J. George, K. Subramaniyan, S. Manikkam and B. Sadayappan. 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Invent. Today, 5(1):55–59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>
- Quispe, G.W., M.B. Mantilla, A. Cama., Y. Ortega y N. Sandoval. 2020. Aislamiento de bacterias nativas de *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri*. Rev. Investig. Vet. Perú, 31(4):e19024. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19024>
- Rebouças, R.H., O.V. de Sousa, A. Sousa, F.R. Vasconcelos, P. Barroso and R.H. Silva. 2011. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. Environ. Res., 111(1):21–24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.09.012>
- Rodríguez, A. 2017. Probióticos en la producción piscícola. Tesis Biotec. Agr., Univ. Nal. Abierta Distancia, Neiva, Colombia. 35 p.
- Rosado, A.A. 2018. Resistencia antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* en langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) en centros de cultivo de la región Tumbes. Tesis Med. Vet., Univ. Ricardo Palma, Lima. 91 p.
- RSPCA. 2016. Humane killing and processing of crustaceans for human consumption. RSPCA Australia, Victoria. 9 p.
- Saavedra-Olivos, K.Y., T. Peralta-Ortiz, A. Ordínola-Zapata, J.E. Sandoval-Ramayoni, E.G. Vieyra-Peña, M.A. Zapata-Cruz, A. Hidalgo-Mogollón, B. Morán, O. A. Mendoza-Neyra, M.E. Mendoza-Dioses y S.Y. Campoverde-Peña. 2018. Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. Rev. Investig. Vet. Perú, 29(1):328. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>
- Sabir, M., M.M. Ennaji y N. Cohen. 2013. *Vibrio alginolyticus*: An emerging pathogen of foodborne diseases. Int. J. Sci. Technol., 2(4):302–309.
- Sánchez, H., G. Ochoa, C. Rojas, T. Peralta y A. Ordínola. 2017. Aislamiento de péptidos inhibidores de bacterias a partir de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo del lechón e identificación mediante prueba proteómica. Sci. Agropecu., 8(4):437–443. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.04.15>
- 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 Med. Vet., Univ. Austral de Chile, Valdivia. 95 p.
- Sotomayor, M.A., J.K. Reyes, L. Restrepo, C. Domínguez-Borbor, M. Maldonado and B. Bayot. 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. and P. Srinivasan. 2016. Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. Microb. Pathol., 97:110–118. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.021>

- Tan, C.W., Y. Rukayadi, H. Hasan T.Y. Thung, E. Lee, W.D. Rollon, H. Hara, A.Y. Kayal, M. Nishibuchi and S. Radu. 2020. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. Saudi J. Biol. Sci., S1319562X20300036. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.002>
- Uppal, B., B. Mehra, P.S. Panda and S.K. Kumar. 2017. Antimicrobial susceptibility profile of *Vibrio cholerae* strains isolated at a tertiary care medical centre in New Delhi, India. Int. J. Com. Med. Publ. Health, 4(3):868. <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20170775>
- Varela-Mejías, A. y R. Alfaro-Mora. 2018. Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. Rev. Investig. Vet. Perú, 29(1):1–14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Vieco-Saiz, N., Y. Belguesmia, R. Raspoet, E. Auclair, F. Gancel, I. Kempf and D. Drider. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Front. Microbiol., 10:57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Watts, J., H. Schreier, L. Lanska and M. Hale. 2017. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. Mar. Drugs, 15(6):158. <https://doi.org/10.3390/md15060158>
- Zhao, Y., X. Zhang, Z. Zhao, C. Duan, H. Chen, M. Wang, H. Ren, Y. Yin and L. Ye. 2018. Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp. J. Hazard Mater., 350: 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.004>
- Zhao, Y., Q.E. Yang, X. Zhou, F.-H. Wang, J. Muurinen, M.P. Virta, K.K. Brandt and Y.-G. Zhu. 2020. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 2020: 1–38. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>

RECIBIDO/RECEIVED: 06/02/2021

ACEPTADO/ACCEPTED: 02/05/2022