

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), mayo-junio 2025,
Volumen 9, Número 3.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i1

CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DE CEPAS RESISTENTES A AGENTES QUÍMICOS Y SU UTILIDAD PROBIÓTICA CONTRA VIBRIOS PARAHAEMOLYTICUS

**METAGENOMIC CHARACTERIZATION OF STRAINS
RESISTANT TO CHEMICAL AGENTS AND THEIR PROBIOTIC
UTILITY AGAINST VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS**

Angela María Reyes Lainez

Universidad estatal Península de Santa Elena

Maria Belén Castillo Narea

Universidad Católica de Cuenca

David Israel Bravo Crespo

Universidad Católica de Cuenca

Milton Senen Barcos Arias

Universidad de Guayaquil

Julian Calderon

TIBALLOSA

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i3.18045

Caracterización metagenómica de cepas resistentes a agentes químicos y su utilidad probiótica contra vibrios parahaemolyticus

Angela María Reyes Lainez¹anmaria.reyes@hotmail.com<https://orcid.org/0009-0005-8283-1194>Universidad estatal Península de Santa Elena
Ecuador**Maria Belén Castillo Narea**mabelpio0706@gmail.com<https://orcid.org/0009-0003-8486-0605>Universidad Católica de Cuenca
Ecuador**David Israel Bravo Crespo**davidisraelbc@hotmail.com<https://orcid.org/0000-0001-5131-4120>Universidad Católica de Cuenca
Ecuador**Milton Senen Barcos Arias**milton.barcosa@ug.edu.ec<https://orcid.org/0000-0003-0863-6778>Universidad de Guayaquil
Ecuador**Julian Calderon**tiballosalrval@gmail.cim<https://orcid.org/0009-0002-5409-5669>TIBALLOSA
Ecuador

RESUMEN

La acuicultura sufre importantes pérdidas económicas en los cultivos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) debido a enfermedades de origen microbiano y viral, actualmente las enfermedades provocadas por bacterias del género *Vibrio* han tomado impulso en los sistemas de cultivo de camarón, y para combatirlo el uso de fármacos ha generado resistencia y enfermedades. El objetivo de esta investigación fue estudiar la caracterización metagenómica del microbiota expuesto a agentes químicos y comprobar la sensibilidad y utilidad probiótica contra vibrios parahaemolyticus en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Las muestras se recolectaron de reservorios de agua de mar tratada con ozono, las cuales fueron sembradas en agares generales y específicos, como agar Trypticase soya (TSA); Chromagar bacillus (CB) y Man Rugosa Shamr (MRS) para luego iniciar el proceso de selección incubándose por 24 horas a 32°C. Se obtuvieron 2 consorcios bacterianos denominándolos CN5, RS3 y una colonia formadora de biopelícula denominándola CINV. Para el análisis de las muestras, se utilizó el protocolo otorgado por Illumina para la preparación de librerías en la secuenciación metagenómica 16S, seguidamente realizando la evaluación de la actividad antagónica por la técnica de Kirby - Bauer. Los resultados que se obtuvieron en este estudio indican que se identificaron una microbiota rica y compleja identificándose solo el 8,7% a nivel de especie con una abundancia del 100% de *Bacillus sp.*, mientras que para la muestra CINV hubo una abundancia de 99% de vibrios no presentes en la base de datos de secuenciación. Las pruebas de inhibición in vitro muestran que la combinación de ambos consorcios microbianos tuvo un 99% de porcentaje de inhibición contra *V. parahaemolyticus* y CINV. Esta investigación servirá como línea base de estudio de bacterias salvajes con capacidad antimicrobiana, siendo una ventaja a diferencia de varios estudios en los que se realizan investigaciones a partir de esponjas marinas, corales donde se presentan limitaciones en cuanto a la disponibilidad de estos organismos.

Palabras clave: probióticos, metagenómica, microbiota, sinergia

¹ Autor principal.

Correspondencia: mabelpio0706@gmail.com

Metagenomic characterization of strains resistant to chemical agents and their probiotic utility against *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

Aquaculture suffers significant economic losses in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) crops due to diseases of microbial and viral origin. Currently, diseases caused by bacteria of the *Vibrio* genus have gained momentum in shrimp farming systems, and to combat it the use of drugs has generated resistance and diseases. The objective of this research was to study the metagenomic characterization of the microbiota exposed to chemical agents and to verify the sensitivity and probiotic usefulness against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Samples were collected from ozone-treated seawater reservoirs, which were plated on general and specific agars, such as Trypticase soy agar (TSA); Chromagar bacillus (CB) and Man Rogosa Sharpe (MRS) and then begin the selection process by incubating for 24 hours at 32°C. Two bacterial consortia were obtained, calling them CN5, RS3, and a biofilm-forming colony, calling it CINV. For the analysis of the samples, the protocol granted by Illumina for the preparation of libraries in 16S metagenomic sequencing was used, followed by the evaluation of the antagonistic activity by the Kirby-Bauer technique. The results obtained in this study indicate that A rich and complex microbiota was identified, with only 8.7% identified at the species level with a 100% abundance of *Bacillus* sp, while for the CINV sample there was a 99% abundance of *Vibrio* not present in the database of sequencing. In vitro inhibition tests show that the combination of both microbial consortia had a 99% inhibition rate against *V. parahaemolyticus* and CINV. This research will serve as a baseline for the study of wild bacteria with antimicrobial capacity, being an advantage unlike several studies in which research is carried out using marine sponges and corals where there are limitations regarding the availability of these organisms.

Keywords: probiotics, metagenomics, microbiota, synergy

Artículo recibido 15 mayo 2025

Aceptado para publicación: 19 junio 2025



INTRODUCCIÓN

Hace cuatro décadas Ecuador dio inicio a la práctica comercial del cultivo de camarones en estanques, su progreso y evolución en la economía local con mayor incidencia en la provincia del Guayas ha sido de suma importancia, destacándose en los mercados mundiales y logrando que el camarón ecuatoriano sea bien recibido a nivel mundial esto implica que el peso de las exportaciones no petroleras se incrementó con la participación de las exportaciones de dos productos camarón y banano ¹. La producción de larvas de camarón con sus altas densidades de siembra ha ocasionado que frecuentemente se lidien con enfermedades microbianas como vibriosis, causada por bacterias patógenas del género *Vibrio* afectando etapas críticas del desarrollo ontogénico, a esta problemática se une el empleo de antibióticos los mismos que deben ser excluidos por los múltiples problemas que causan en la acuicultura como son la resistencia antibacteriana y la contaminación por el desecho inseguro de aguas con estas sustancias ².

Sin duda, los avances tecnológicos han contribuido significativamente a estos resultados y las exportaciones de camarón lo reflejan, así pues, una serie de eventos, en su mayoría patológicas, tuvieron diversos grados de impacto en la dinámica productiva, el impacto de white spot syndrome virus (WSSV) en la acuicultura de Ecuador fue devastador, causando pérdidas económicas de millones de dólares y la muerte de millones de peces ³. Las investigaciones sobre enfermedades infecciosas permiten desarrollar terapias antimicrobianas eficaces, que podrán implementarse para mitigar los eventos futuros de enfermedades infecciosas ⁴.

En la mayoría de las investigaciones donde se incluye información sobre el análisis de microorganismos en la acuicultura, se utilizan metodologías basadas en la microscopía óptica, bioquímica o electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización⁵. Sin embargo, hoy en día existen técnicas de mayor resolución; por ejemplo, técnica de secuenciación masiva o secuenciación de última generación del gen 16S ARNr⁶.

En este sentido, la metagenómica puede proporcionar una visión más profunda de estas relaciones mediante la interpretación de la información revelada por el ADN extraído directamente del consorcio de microorganismos presentes en los ambientes de cultivos acuícolas⁷.



Los probióticos, prebióticos y simbióticos son aditivos empleados para controlar enfermedades bacterianas en camarón entre ellos destacan los probióticos, por ser una alternativa eficiente a los antibióticos. La administración se realiza directa por vía oral a través del alimento, administrado de manera indirecta al agua de cultivo, utilizando un medio fermentado⁸.

Una estrategia para combatir vibriosis es mediante cepas probióticas de origen marino⁹. *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) es una bacteria ubicua de importancia acuícola, la cual ha sido aislada en muestras de agua de mar, sedimento; inclusive organismos marinos de interés comercial como peces, crustáceos y moluscos¹⁰. *V. parahaemolyticus* es una bacteria autóctona del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*, por lo que éste tiende a estar vulnerable ante las colonizaciones masivas de esta bacteria¹¹.

La biodiversidad de cepas probióticas que existen en el mercado para acuicultura pertenece al género *Bacillus*, las mismas que pueden ser aisladas de suelo agua y en muchas ocasiones de ambientes terrestres¹². En ocasiones su éxito en los cultivos marinos es cuestionable, debido en parte a los factores ambientales (bacterias terrestres en medio marino) y al poco éxito de estos probióticos compitiendo contra *Vibrios sp.* en los cultivos¹³. Estudios recientes utilizando metagenómica muestran que *V. parahaemolyticus* (perteneciente al clado de *V. harveyi*) modifica la microbiota de los cultivos disminuyendo la diversidad bacteriana en favor de los vibrios¹⁴.

Actualmente existen disponibles en el mercado varias marcas de Probióticos, en presentación líquida y sólida, que contienen una variedad de *bacilos*, *lactobacilos* y enzimas con diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC), la gran mayoría son activados en agua, fuente de carbono, fuente de nitrógeno mientras que otros solo necesitan ser hidratados y aplicados directamente¹⁵.

Existe poca literatura acerca de la identificación metagenómica de consorcios microbianos salvajes que entran al sistema de producción de larvas de camarón, por tal motivo resulta relevante la identificación y su potencial uso como probiótico en la industria del camarón.

Con el fin de abordar esta problemática, resulta imperativo identificar y analizar a nivel molecular con técnicas de última generación, como son la genómica desde la extracción del ADN, el estudio de cepas probióticas nativas como agentes antimicrobianos mediante su evaluación in vitro contra *vibrios sp.*, este

enfoque permitirá la implementación inmediata de un protocolo de control, con la finalidad de aplicar medidas preventivas y mitigar posibles pérdidas en el desarrollo del ciclo de cultivo de camarón¹⁶.

Con estos antecedentes se seleccionó las cepas bacterianas con características morfológicas típicas para la clasificación de las bacterias en los grupos deseados para el aislamiento (*Bacillus*, *Lactobacillus*) la forma de la colonia, la presencia de colonias con tonalidades cremosas, blancas y amarillas, bordes completos, forma convexa, disposición redonda o irregular¹⁷.

En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo principal contribuir con la caracterización metagenómica de la microbiota expuesta a agentes químicos y comprobar la sensibilidad y utilidad probiótica contra vibrios parahaemolyticus en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

METODOLOGÍA

Recolección de las muestras de agua

El experimento se realizó en el laboratorio de producción de larvas de camarón TIBALLOSA en Anconcito sector La Diablica, se recolecto muestras de agua de reservorio que tiene una capacidad de 400 toneladas la cual fue recolectada para la siembra de los nauplios de camarón, estas muestras de agua fueron sometidos a tratamiento químico con ozono y fueron pasadas por bolsos filtrantes de 0,5 µm, luego se mezclaron entre sí y se obtuvo una muestra patrón, posterior se colocó en un tubo falcón de 50 ml y se conservó la muestra 4°C hasta su respectivo análisis¹⁸.

Diseño del experimento

Para el estudio las muestras de agua de mar tratada con ozono fueron sembradas en agar Trypicasa soya (TSA), agar Thiosulfato-Citrate-Bilis Sucrose (TCBS), agar Cetrimide; Chromagar Bacillus; Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Se aislaron e identificaron los distintos morfotipos de las colonias en TSA al 2% de NaCl y se incubaron a 32°C por 48 horas para seleccionar la microbiota marina para otorgar un periodo adicional destinado a la posible proliferación de nuevas colonias, ya que el tiempo podría ser un factor crítico en el desarrollo bacteriano.

Se obtuvieron 2 consorcios bacterianos a los que se los denomino como RS3 y CN5 ambos fueron puestos a crecer en medio de cultivo Trypticase soya broth (TSB). Con el fin de determinar el efecto probiótico de las cepas aisladas como son: CN5 y RS3 ambos aislados por triplicado se los sometió a

pruebas de desafío por separado y una mezcla de ambas, se emplearon tres técnicas *in vitro*, (a) Técnica de difusión con bacterias vivas, (b) difusión en agar, y (c) método de estría cruzada. Para todos los casos de pruebas de desafío se utilizó la cepa viva de *V. parahaemolyticus* como agente patógeno y una colonia oportunista invasiva (CINV) que se identificó a nivel de metagenómica de la región 16S rRNA con el fin de identificar la especie correspondiente. igualmente, la mezcla de consorcios bacterianos.

Análisis de datos

Todos los análisis fueron realizados en el programa Minitab 19.0. Se analizó la normalidad de los datos a través de un test de Anderson - Darling, luego se realizó un test de Levene (homocedasticidad). Después, se trabajó con Anova de una vía y test a posteriori de Tukey con valor de significancia del 95 % de confiabilidad ($p < 0.05$)

Evaluación de la actividad antagónica *in vitro*

Técnica de difusión con bacterias vivas o Inhibición simultánea

La preparación consistió en sembrar 100 ul de las bacterias patógenas crecidas en 30 ml de agar TSB al 2% con cloruro de sodio (NaCl), por 24 hrs luego se ajustó la concentración mediante un patrón de turbidez aproximadamente a 0,5 de la escala de Mac Farland del *V. parahaemolyticus* a una concentración de 1.7×10^6 ufc/ml. con la ayuda de un hisopo de algodón esterilizado se distribuyó la muestra por toda la superficie del agar, esto con el fin de obtener un crecimiento uniforme a manera de césped de desarrollo bacteriano. Se dejó secar de 10 a 20 min en la cámara de flujo laminar. Finalmente, de manera masiva con la ayuda de una micropipeta se colocaron de manera radial gotas con 30 ul (microlitros) de las cepas antagónicas. Se dejó incubar durante 24 horas a 32°C. Las muestras se trabajaron por triplicado^{19,20}.

Técnica de difusión en agar.

Se sembró *V. parahaemolyticus* en medio TSA a una dosis de 1.7×10^6 ufc/ml, posteriormente a cada una de las placas se le hicieron 5 pocillos de 6mm de diámetro por 1mm de alto, sin que estos tocan por completo el fondo de la placa, pero igualmente se les selló el fondo con agar agar aproximadamente 10 ul en los cuales se vertieron 30 ul de las bacterias antagónicas. Finalmente, las placas se incubaron a 32°C por 24 horas^{20,25}. Las muestras se trabajaron por triplicado.



Método de estría cruzada.

Se realizó a partir de un cultivo líquido de TSB de 24 hrs en tubos de ensayo con (2% NaCl) donde anteriormente se sembró posibles colonias probióticas (CN5; RS3) se tomó una muestra con un hisopo estéril y se sembró una estría central o en forma de T con la cepa a evaluar y se incubó por 24 h a 32°C. Del mismo modo se preparó una suspensión con la cepa patógena (*V. parahaemolyticus*) y se sembraron por separado en un ángulo de 90° atravesando la zona de las bacterias candidatas cuando la estría presentaba un buen crecimiento (3 a 5 mm de ancho). Posteriormente se observó la presencia o ausencia de zona de inhibición a las 24-48 h de incubación y se realizaron mediciones^{21,22,28}.

Identificación de las cepas con potencial antagonico por medio de biología molecular

Las cepas de bacterias de RS3 y CINV fueron enviadas a la empresa Biosequence, para su secuenciación de la región 16S rRNA e identificación de especie de todo el material genético, lo que permite identificar las funciones y características de las bacterias individuales^{22,29,32}.

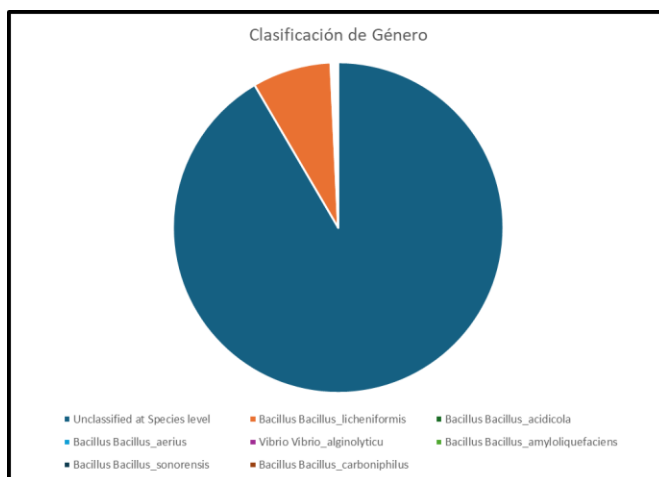
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis metagenómico de cepas aisladas muestra#1 (RS3)

Nivel taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico.	% Total de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Reino	157,897	99,20
Filo	157,882	99,19
Clase	157,876	99,19
Orden	157,864	99,18
Familia	157,752	99,11
Género	157,702	99,08
Especie	13,945	8,76

La tabla 1 representa datos estadísticos expresados en porcentajes de lecturas que fueron identificadas y clasificadas a nivel taxonómico de muestra 231212 AR-001-16S (RS3), donde el 99.08 % de géneros no ha sido reconocido, siendo solo el 8.76 % clasificado a nivel de especie es decir de 13.945 pares de bases de lecturas clasificadas a nivel taxonómico. (3)





Se identificaron 113 categorías taxonómicas totales a nivel de género, en la figura 1 se muestra los 8 principales resultados tales como un 87,64% pertenece a *Bacillus_licheniformis*, con 1.77% *Bacillus_aerius*, 1,66% *Vibrio_alginolyticus*, 1,34% *Bacillus_amyloliquefaciens*, 0,90% *Bacillus_sonorensis*, 0,75% *Bacillus_carboniphilus*, 0,66% *Vibrio_xuui*, 0,62% *Vibrio_jasicida*, 0,49% *Bacillus_vienamensis*, 0,15% *Bacillus_crescens* 0,22% *Bacillus_mojavensis* y 1.04% pertenece a otras especies.

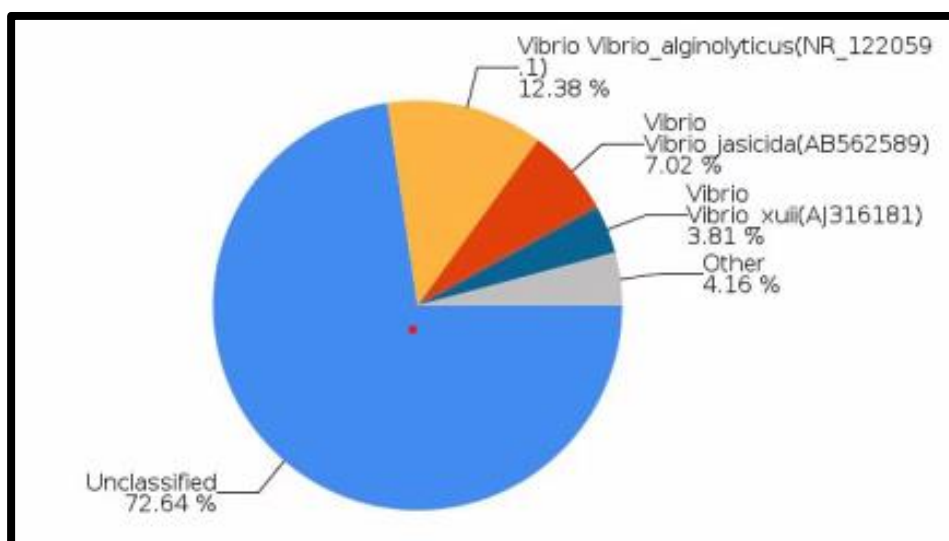
Según ^{42,43}, en su estudio del sedimento de manglares mediante metagenómica, un 35% de las lecturas no se pudo identificar a nivel de phylum. Esto sugiere que algunas bacterias presentes en la muestra podrían no estar descritas previamente y, por lo tanto, no estar presentes en la base de datos de referencia utilizada. En nuestro estudio, si bien la mayoría de las lecturas no se identificaron a nivel de género (99.08%), la clasificación a nivel de phylum (24.38%) puede proporcionar información útil sobre la composición general de la microbiota. Esto se debe a que el porcentaje de lecturas clasificadas aumenta a medida que se asciende en el nivel taxonómico, siendo el phylum el nivel con mayor porcentaje de lecturas clasificadas ^{51,52}

Análisis metagenómico de cepas aisladas muestra #2 (CINV).

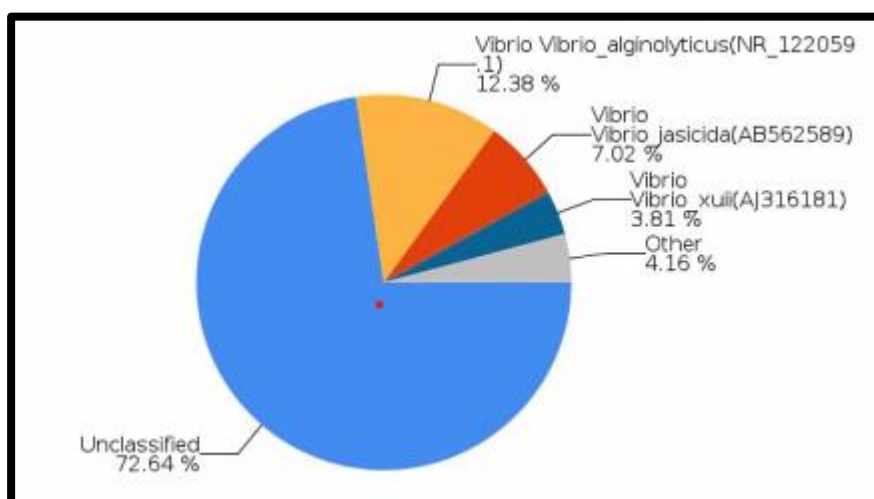
La tabla 2 representa datos estadísticos expresados en porcentajes de lecturas que fueron identificadas y clasificadas a nivel taxonómico de muestra 231212 AR-002-16S (CINV), donde el 99.34 % de géneros no ha sido reconocido, siendo solo el 8.76 % clasificado a nivel de especie, es decir 45.140 pares de bases de lecturas clasificadas a nivel taxonómico.

Nivel taxonómico	Lecturas clasificadas a nivel taxonómico.	% Total de lecturas clasificadas a nivel taxonómico
Reino	164,127	99,50
Filo	164,119	99,49
Clase	164,116	99,49
Orden	164,077	99,47
Familia	164,072	99,46
Género	163,865	99,34
Especie	45,140	27,36

Resultados de clasificación a nivel de especie



Resultados de clasificación a nivel de especie

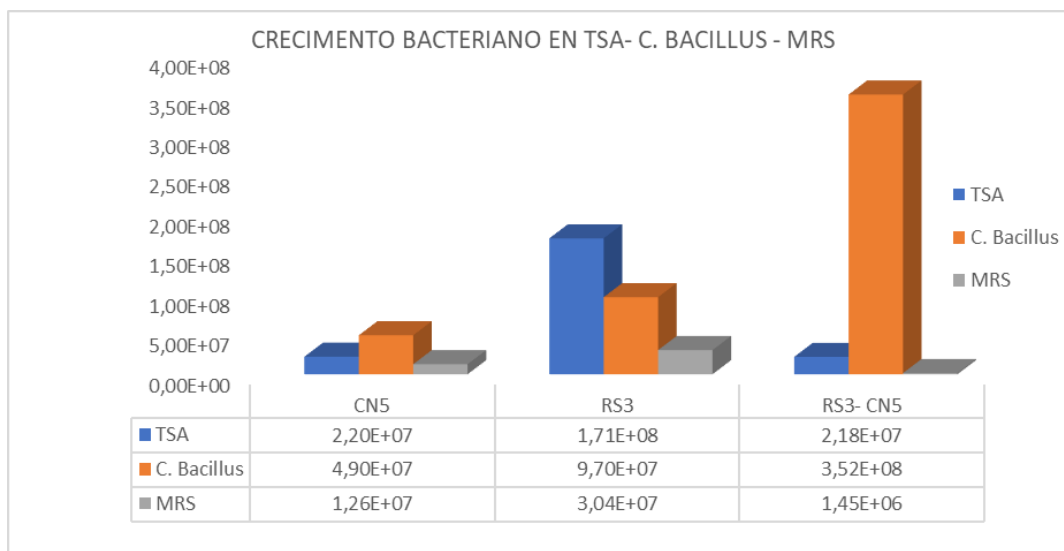


En la figura se presentan las especies pertenecientes al reino: bacteria, división: proteobacteria, clase: Gammaproteobacteria, orden: vibrionales, familia: vibrionaceae y género: *Vibrio* en donde los resultados arrojan que un 45,25% pertenece a *Vibrio_alginolyticus*, con 25,64% *Vibrio_jasicida*, 13,91% *Vibrio_xuui*, 12,12% *Vibrio_alginolyticus*, 0,78% *Vibrio_agarivorans*, con 0,43% pertenece a otras especies, 0,42% *Vibrio_paraahaemolyticus*, 0,15% *Vibrio_alfacsensis*. Estos resultados estadísticos corroboran la presencia de varias especies de *Vibrios* dentro del consorcio C. INV.

Un dato relevante en el estudio de^{16,46}, utilizando NGS muestra que los grupos dominantes en camarón se clasificaron en seis géneros de Proteobacteria (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium* common y *Undibacterium*), dos géneros de Firmicutes (*Fusibacter* y *Lactobacillus*) y un género de Bacteroidetes (*Cloacibacterium*).

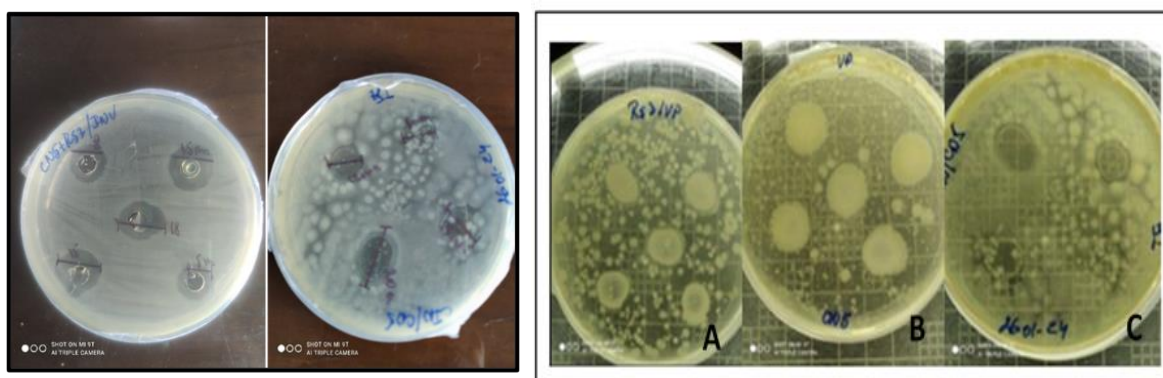
Evaluación de la potencialidad de cepas probióticas identificadas mediante metagenómica capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrio paraahaemolyticus* mediante la técnica de Kirby Bauer.

Se cuantificó el crecimiento bacteriano de los consorcios CN5, RS3 y mezcla de ambos cultivados en medio líquido TSB. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 seleccionando las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y 10^{-6} de cada uno de los consorcios bacterianos y se los procedió a sembrar en agar TSA, chromagar bacillus y MRS para posterior conteo a las 24 hrs



Evaluación de la actividad antagonica *in vitro*

Todas las cepas aisladas presentaron algún grado de capacidad competitiva, en la prueba de antagonismo *in vitro* sobre una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* y colonia invasiva (CINV). La combinación de aislados de cepas CN5 y RS3 mostraron una capacidad de inhibición significativamente superior pues se observó una formación de halo de crecimiento mayor en la superficie del agar, mientras que las cepas por separado presentaron halos de inhibición menores. Para la prueba de inhibición simultánea se observó que el 100% de los casos ambas cepas crecieron, sugiriendo así un efecto sinérgico entre ellas.



DISCUSIÓN

Todas las cepas aisladas presentaron algún grado de capacidad competitiva, en la prueba de antagonismo *in vitro* sobre una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* y colonia invasiva (CINV). La combinación de aislados de cepas CN5 y RS3 mostraron una capacidad de inhibición significativamente superior pues se observó una formación de halo de crecimiento mayor en la superficie del agar, mientras

que las cepas por separado presentaron halos de inhibición menores. Para la prueba de inhibición simultánea se observó que el 100% de los casos ambas cepas crecieron, sugiriendo así un efecto sinérgico entre ellas.

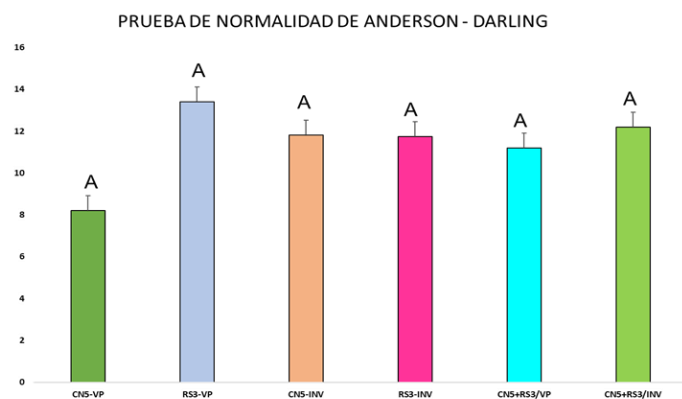
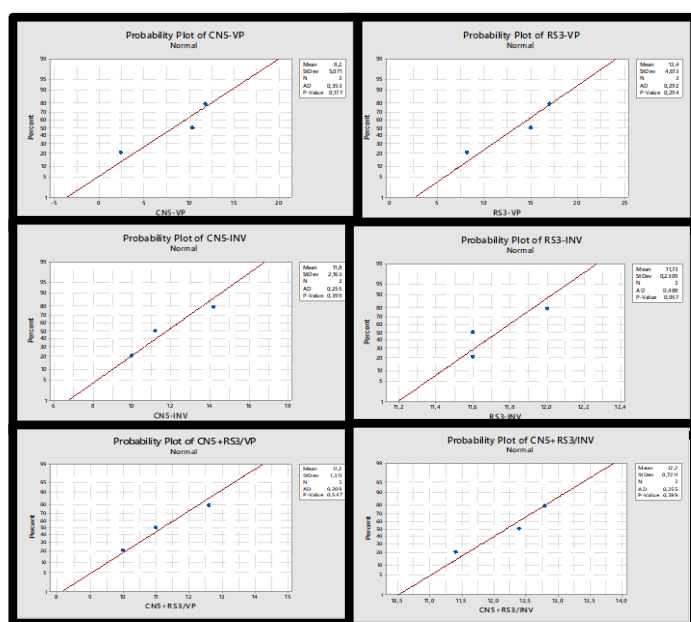
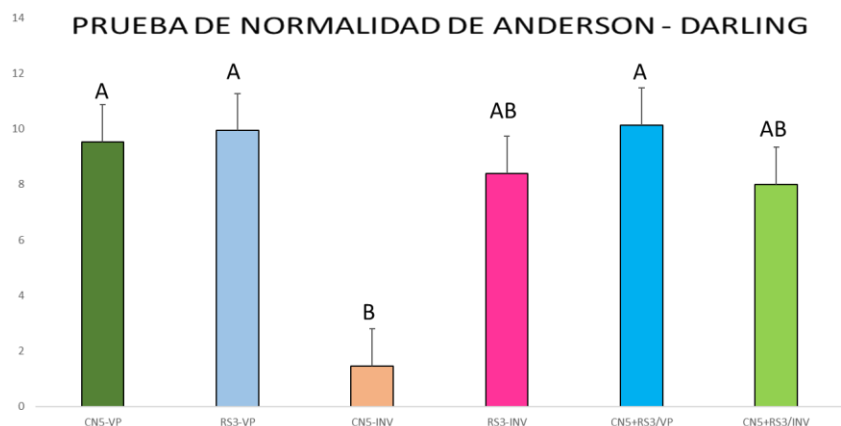


Figura 1. Promedio de tratamientos de consorcios bacterianos contra *V. parahaemolyticus* y CINV. Las barras representan Media $\pm$ Ds. Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los tratamientos según Anova de 1 vía - test posterior de Tukey ($p > 0.05$)

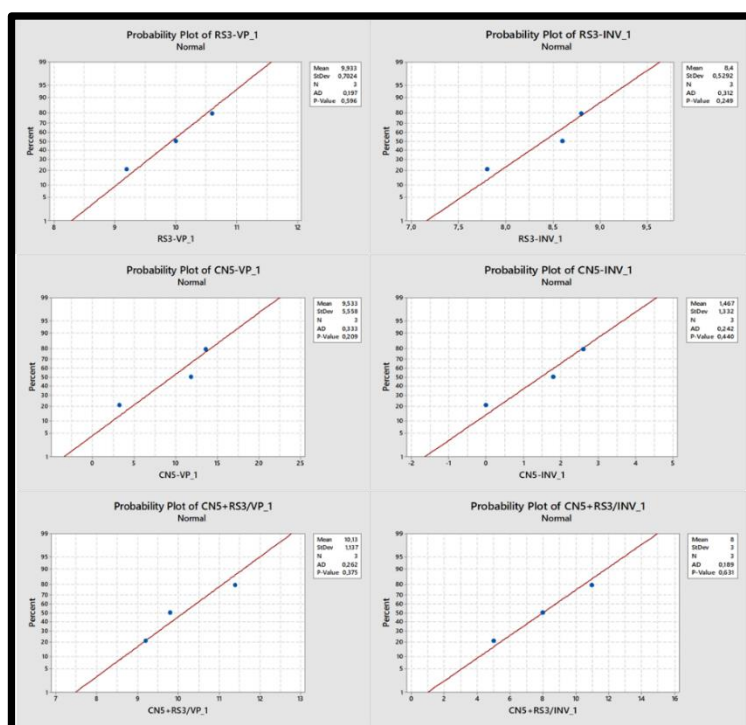


Pruebas de normalidad para cada uno de los consorcios bacterianos CN5 y RS3 por separado y combinados contra *Vibrio parahaemolyticus* y CINV demostrando los valores de $p > 0,05$ con un 95% de confiabilidad es decir no hay diferencia significativa entre tratamientos.

TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR



Promedio de tratamientos de consorcios bacterianos contra *V.parahaemolyticus* y CINV. Las barras representan Media $\pm$ Ds. Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los tratamientos según Anova de 1 vía - test posterior de Tukey ($p > 0.05$), pero consorcio CN5 -INV es diferente con un porcentaje de inhibición bajo.



Pruebas de normalidad para cada uno de los consorcios bacterianos CN5 y RS3 por separado y combinados contra *Vibrio parahaemolyticus* y CINV demostrando los valores de $p > 0,05$ con un 95% de confiabilidad es decir no hay diferencia significativa entre tratamientos. Sin embargo, el tratamiento del consorcio CN5 contra INV es diferente^{47,48,49}.

CONCLUSIONES

Se logro aislar un conjunto de cepas bacterianas de agua de mar mediante cultivos in vitro con características probióticas potenciales.

El análisis metagenómico reveló la diversidad genética de bacterias probióticas y sus posibles interacciones con otros microorganismos, incluyendo *Vibrio* sp y proporciono información detallada de la clasificación taxonómica, encontrando 113 categorías a nivel de género en RS3 y 85 categorías en CINV.

Las categorías taxonómicas a nivel de especie de la muestra RS3, destacan 87,64% perteneciente a *Bacillus_licheniformes*, con 1,77% *Bacillus_aerius*, 1,66% *Vibrio_alginolyticus*, 1,34% *Bacillus_amyloliquefaciens*, 0,90% *Bacillus_sonorensis*, 0,75% *Bacillus_carboniphilus*, 0,66% *Vibrio_xiii*, 0,62% *Vibrio_jasicida*, 0,49% *Bacillus_vienamensis*, 0,15% *Bacillus_crescens* 0,22% *Bacillus_mojavensis* y 1,04% pertenece a otras especies.

Las categorías taxonómicas a nivel de especie de la muestra CINV, destacan 45,25% pertenece a *Vibrio_alginolyticus*, con 25,64% *Vibrio_jasicida*, 13,91% *Vibrio_xiii*, 12,12%, *Vibrio_alginolyticus*, 0,78% *Vibrio_agarivorans*, con 0,43% pertenece a otras especies, 0,42% *Vibrio_paraahaemolyticus*, 0,15% *Vibrio_alfacsensis*.

Mediante cultivos in vitro se demostró que todas las mezclas de cepas probióticas nativas mostraron una alta potencialidad del 99% para inhibir el crecimiento de *Vibrio* sp y la bacteria denominada CINV. En los estudios realizados mediante ANOVA no se encontró significancia entre los consorcios ya que fueron valores superiores a 0,05. Los resultados sugieren que las cepas probióticas podrían ser utilizadas para prevenir o controlar infecciones por *Vibrio paraahaemolyticus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abasolo Pacheco, F. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha nácar (*Pteria sterna*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos.
<http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/469>



2. Babic, A., Berkmen, M. B., Lee, C. A., & Grossman, A. D. (2011). Efficient Gene Transfer in Bacterial Cell Chains. *mBio*, 2(2), e00027-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00027-11>
- Barer, M. R., & Harwood, C. R. (1999). Bacterial Viability and Culturability. En R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 41, pp. 93-137). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60166-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60166-6)
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, 164(6), 620-639. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
5. Bourne, D. G., Young, N., Webster, N., Payne, M., Salmon, M., Demel, S., & Hall, M. (2004). Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*, 242(1), 31-51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.047>
6. Chen, W.-Y., Ng, T. H., Wu, J.-H., Chen, J.-W., & Wang, H.-C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09923-6>
- Civera-Cerecedo, R., Alvarez-González, C. A., & Moyano-López, F. J. (2004). Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. *Avances en Nutrición Acuicola*. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/187>
- Cona T., E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*, 19, 77-81. <https://doi.org/10.4067/S0716-1018200201920000169>
- Cruz, M. A. Z., & Monzon, K. P. (2015). Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo sobre geotextil asociados a las raíces de manglares (canal de marea Puerto Rico, Tumbes, Perú) y aislamiento de cepas de diatomeas caracterizadas molecularmente. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 28(3), Article 3. <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/401>



- Escobar-Briones, L., Olvera-Novoa, M. A., & Puerto-Castillo, C. (2006). Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones. *Avances en Nutrición Acuicola*. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/164>
- Gram, S., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Torben F., & Nielsen. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 969-973. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.969-973.1999>
- Grasso, D. (2006). Metagenómica: Un viaje a las estrellas. *Revista argentina de microbiología*, 38(4), 189-189.
- Guevara Castro, J. J., Martínez Novoa, L. A., & Ríos Castillo, Y. B. (2022). *Evaluación de buenas prácticas acuícolas de granjas camaroneras Bolívar y Cidaco, en el departamento de Chinandega, en el periodo de Julio-Diciembre del año 2022*. [Bachelor, Universidad de Ciencias Comerciales]. <http://repositorio.ucc.edu.ni/1126/>
- Guilemany, J. M., Cinca, N., Dosta, S., & Benedetti, A. V. (2009). Corrosion behaviour of thermal sprayed nitinol coatings. *Corrosion Science*, 51(1), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.10.022>
- Gyles, C., & Boerlin, P. (2014). Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Veterinary Pathology*, 51(2), 328-340. <https://doi.org/10.1177/0300985813511131>
- Kampelmacher, E. H., van Noorle Jansen, L. M., Mossel, D. A., & Groen, F. J. (1972). A survey of the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* on mussels and oysters and in estuarine waters in the Netherlands. *The Journal of Applied Bacteriology*, 35(3), 431-438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03719>
- Kidane, D., Ayora, S., Sweasy, J. B., Graumann, P. L., & Alonso, J. C. (2012). The cell pole: The site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(6), 531-555. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.729562>



- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019a). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Lombal, A. C. (2021). *Acuariofilia. Peces ornamentales*. RUTH.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez Porchas, M., & Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(3), 181-196.
- Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albores, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: A potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1), 42-56. <https://doi.org/10.1111/raq.12102>
- McVey, J. P. (1993). *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture, Second Edition*. CRC Press.
- Méndez, M. (1981). Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. *Boletín Instituto del Mar del Perú*, 5(1), Article 1.71
23. Noss, R. F. (1990). Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology*, 4(4), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1990.tb00309.x>
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015a). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015b). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pérez-Chabela, M. de L., Álvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., Pérez-Hernández, M. A., Pérez-Chabela, M. de L., Álvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/perez>



- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Ribera, I., Melic, A., & Torralba-Burrial, A. (2015). Introducción y guía visual de los artrópodos. *Revista IDE@-SEA*, 2, 1-30.
- Rivera Arreaga, A. J. (2021). *Análisis de la situación del sector camaronero ecuatoriano antes y durante la pandemia del COVID-19, período 2016-2020*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58622>
- Santur Rivera, S. (2022). Macrobenos en sustrato artificial en el estuario del Río Chira, distrito de Vichayal—Paíta — Piura. *Universidad Nacional de Piura*. <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/20.500.12676/3821>
- Schryver, P. D., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLOS Pathogens*, 10(4), e1003919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>
- Suárez, J. E. (2013). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 38-41.
33. Suttle, C. A. (2007). Marine viruses—Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Aguilera Mero.pdf. (s. f.). Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52739/1/T-76761%20Aguilera%20Mero.pdf>
- Tomalá Beltrán.pdf. (s. f.). Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/54691/1/T-76788%20Tomal%c3%a1%20Beltr%c3%a1n.pdf>
- Tomalá Beltrán, C., & Rodríguez León, J. (2020). *Bacteria simbiótica marina Pseudovibrio denitrificans excluye vibrios patógenos y modifica la microbiota en camarón* [Thesis, ESPOL. FIMCM: Maestría en Ciencias de la Acuicultura Marina]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/54691>



- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
38. Varela Mejías, A., Peña, N., & Aranguren Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: Una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>
- Varela, Z. S., Lavalle, L. P., & Alvarado, D. E. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
40. Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., Olsen, R. E., Ringø, E., Bindelle, J., & Zhou, Z. (2019). Use of probiotics in aquaculture of China—A review of the past decade. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 734-755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.026> 73
- Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>
- Pereira, F., Souza, R. C., & Jesus, E. C. (2018). Metagenomic analysis of the microbial diversity in mangrove sediments from the Brazilian Amazon. *Frontiers in Microbiology*, 11, 552.
- Mullany, P. (2014). Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence*, 5(3), 443-447.
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future microbiology*, 7(1), 73-89.
- Fitzpatrick, D., & Walsh, F. (2016). Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes. *FEMS microbiology ecology*, 92(2), fiv168.
- Yuan, K. E., Yu, K. E., Yang, R., Zhang, Q., Yang, Y., Chen, E., ... & Chen, B. (2019). Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in Antarctic soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 300-308.
- Chen, H., Bai, X., Jing, L., Chen, R., & Teng, Y. (2019). Characterization of antibiotic resistance genes in the sediments of an urban river revealed by comparative metagenomics analysis. *Science of The Total Environment*, 653, 1513-1521.



- Quiroz-Guzmán, E., Lomelí-Ortega, C. O., & Martínez-Villalobos, J. M. Bacteriófagos: Herramientas de Control Biológico para una Acuicultura Sostenible. *Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola*, 71.
- Correa Aceros, D. F. (2022). Aislamiento, caracterización y análisis de microbiota presente en la leche del manatí antillano (*Trichechus manatus*).
- Stenotrophomonas, P. V. A., Loncheado, R. P., & Loncheado, R. C. P. (2018). METAGENÓMICA APLICADA A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Nuevas tendencias en microbiología de alimentos*, 150.
- Teso Pérez, C. (2023). Bases biológicas de los patrones de producción y resistencia de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas).
- RUVALCABA GÓMEZ, J. O. S. É. (2020). Estudio de la microbiota asociado a la producción de queso adobera artesanal y sus perspectivas biotecnológicas

