



EFFECTO SINÉRGICO DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO Y COMPUESTOS ORGÁNICOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA DEL LANGOSTINO *Penaeus vannamei*

SYNERGISTIC EFFECTS OF PROBIOTIC MICROORGANISMS AND ORGANIC COMPOUNDS ON THE GROWTH AND SURVIVAL OF *Penaeus vannamei*

Katherine Saavedra^{1,*}  Beder Ramírez¹  Mervin Guevara¹ 

¹Instituto del Mar del Perú, Laboratorio Costero de Tumbes, Perú.

*Correspondencia. E-mail: ksaavedra@imarpe.gob.pe

Recibido: 19-05-2025, Aceptado: 12-05-2026, Publicado: 19-05-2026

RESUMEN

La actividad langostinera frecuentemente se ha visto enfrentada por numerosas enfermedades bacterianas, entre ellas la causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, portadoras de los genes de las toxinas pirA y pirB (Vp_{AHPND}). Una práctica común para el tratamiento de estas enfermedades es la aplicación de antibióticos, sin embargo, su uso indiscriminado representa un riesgo para la salud pública, lo que ha conllevado a la búsqueda de nuevas alternativas como la suplementación de antagonistas probióticas y/o el uso de compuestos orgánicos. La presente investigación tuvo como objetivo, evaluar la capacidad probiótica de microorganismos nativos de *Penaeus vannamei* en sinergia con compuestos orgánicos. Para ello, se realizó el aislamiento y caracterización molecular de bacterias, posteriormente se evaluó su capacidad probiótica a través de ensayos de antagonismo *in vitro* mediante la técnica de discos de agar, enfrentados con cepas patógenas de *Vibrio* previamente identificadas. Los aislados que mostraron capacidad de inhibición, fueron evaluados por la PCR, para detectar los genes relacionados a los péptidos antimicrobianos (AMP) logrando seleccionar una cepa (45) positiva para el gen surfactin y dos cepas (47 y 59) positivas para surfactin, bacylisin, bacylomycin y fengycin. La cepa 45 mejoró la supervivencia del *P. vannamei* retado con vibrios (AHPND+) cuando fue inoculada, de forma individual y en combinación con el ácido orgánico "ProtAcid". El uso combinado de la bacteria y el ácido orgánico se propone como una estrategia profiláctica para disminuir el impacto por las infecciones de vibrios en el cultivo de langostino.

PALABRAS CLAVE: probióticos, *Penaeus vannamei*, sinergia

ABSTRACT

Shrimp aquaculture is continually threatened by bacterial diseases, particularly those caused by *Vibrio parahaemolyticus* strains harboring the pirA and pirB toxin genes (Vp_{AHPND}). Although antibiotics are widely used to control these infections, their excessive and indiscriminate application has raised major concerns regarding antimicrobial resistance and public health, highlighting the need for sustainable alternative strategies such as probiotics and organic compounds. This study evaluated the probiotic potential of native bacterial isolates associated with *Penaeus vannamei* and their synergistic interaction with organic compounds. Bacterial strains were isolated and molecularly characterized, and their antagonistic activity against pathogenic *Vibrio* strains was assessed *in vitro* using agar diffusion assays. Isolates showing inhibitory effects were further analyzed by PCR to detect genes encoding antimicrobial peptides (AMPs). One isolate (strain 45) was positive for the *surfactin* gene, whereas two additional isolates (strains 47 and 59) carried genes associated with surfactin, bacylisin, bacillomycin, and fengycin. Among the evaluated isolates, strain 45 significantly enhanced the survival of *P. vannamei* experimentally challenged with AHPND-positive *Vibrio* strains, both when administered alone and in combination with the organic acid formulation ProtAcid. These findings suggest that the synergistic application of probiotic bacteria and organic acids represents a promising prophylactic strategy to reduce the impact of *Vibrio*-associated diseases in *P. vannamei* aquaculture.

KEYWORDS: probiotics, *Penaeus vannamei*, synergistic effect

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha consolidado como una actividad estratégica para la economía peruana, no solo por su contribución a la generación de divisas y empleos, sino también por su papel fundamental en la seguridad alimentaria nacional y global. Este sector exhibe la tasa de crecimiento más alta entre todas las industrias productoras de alimentos, constituyéndose en un pilar clave para afrontar la creciente demanda mundial de proteínas de origen acuático (FAO, 2024).

En este contexto, la producción del langostino blanco *Penaeus vannamei* representa uno de los principales rubros de la acuicultura en Perú, concentrándose cerca del 90 % de su producción nacional en el departamento de Tumbes (PROMPERÚ, 2022). Sin embargo, este sector enfrenta desafíos significativos, como la caída de los precios internacionales y la recurrencia de enfermedades infecciosas, que comprometen su sostenibilidad (OANNES, 2024).

Entre las enfermedades más relevantes se encuentra la causada por el Virus de la Mancha Blanca (VSMB) cuya aparición en 1999 ocasionó graves pérdidas económicas y motivó la implementación de políticas sanitarias más estrictas (SERRANO-MARTÍNEZ *et al.*, 2022). Actualmente, la amenaza persiste debido a brotes emergentes, como la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) provocada por cepas patógenas de *Vibrio*, capaces de generar mortalidades masivas en etapas tempranas de cultivo (HONG *et al.*, 2016; OMSA, 2023; SOTO-MARFILEÑO *et al.*, 2024).

Frente a estas enfermedades, el uso de antimicrobianos ha sido una práctica común. No obstante, su aplicación indiscriminada conlleva riesgos para la salud pública, como reacciones adversas, disbiosis intestinal y el desarrollo de resistencia antimicrobiana (RAM) lo que compromete la eficacia de los tratamientos terapéuticos (HUANAMBAL SOVERO, 2020; REVERTER *et al.*, 2020). Esta problemática ha generado una creciente preocupación por parte de organismos internacionales como FDA, OMS, OMSA y FAO, impulsando regulaciones más estrictas para el uso de antibióticos en la producción acuícola (WHO & FAO, 2001; RESOLU-

1. INTRODUCTION

Aquaculture has emerged as one of the fastest-growing food-production sectors worldwide and plays a critical role in global food security, employment generation, and economic development. In Peru, the industry has become strategically important due to its contribution to foreign exchange earnings and its capacity to meet the increasing global demand for aquatic protein resources (FAO, 2024).

Within the Peruvian aquaculture sector, the farming of *Penaeus vannamei* represents one of the most economically important activities, with nearly 90% of national production concentrated in the Tumbes region (PROMPERÚ, 2022). Despite its relevance, the industry faces persistent challenges, including fluctuations in international market prices and the emergence of infectious diseases that compromise productivity and sustainability (OANNES, 2024).

Among the diseases affecting *P. vannamei* culture, White Spot Syndrome Virus (WSSV) has historically caused severe economic losses since its emergence in Peru in 1999, leading to the implementation of stricter sanitary and biosecurity measures (SERRANO-MARTÍNEZ *et al.*, 2022). More recently, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), caused by pathogenic *Vibrio* strains, has become one of the most serious threats to shrimp aquaculture due to its ability to induce massive mortalities during the early stages of cultivation (HONG *et al.*, 2016; OMSA, 2023; SOTO-MARFILEÑO *et al.*, 2024).

The extensive use of antimicrobial agents to control bacterial outbreaks has raised increasing concern because of their potential adverse effects on public health and the environment. Indiscriminate antibiotic application may promote intestinal dysbiosis, generate adverse physiological effects, and accelerate the development of antimicrobial resistance (AMR), thereby reducing the effectiveness of therapeutic treatments (HUANAMBAL SOVERO, 2020; REVERTER *et al.*, 2020). Consequently, international organizations such as the FDA, WHO, OMSA, and FAO have promoted stricter regulations regarding antibiotic use in aquaculture systems (WHO & FAO, 2001; RESOLUCIÓN DE DIRECCIÓN EJECUTIVA N° 057-2016-SANIPES-DE, 2016).

CIÓN DE DIRECCIÓN EJECUTIVA N° 057-2016-SANIPES-DE, 2016).

En este escenario, los probióticos emergen como alternativa biotecnológica prometedora. Se trata de microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedador, promoviendo el equilibrio microbiano intestinal y estimulando la respuesta inmune (VERSCHUERE *et al.*, 2000; WHO & FAO, 2001). Diversos estudios han demostrado que cepas de *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. y *Pediococcus* spp. producen compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, lisozimas, sideróforos y peróxidos, capaces de inhibir patógenos acuáticos (NAYAK, 2010; HAI, 2015; MIDHUN *et al.*, 2017; EL-SAADONY *et al.*, 2021).

Por ejemplo, *Bacillus subtilis* ha sido identificado como portador de genes que codifican péptidos antimicrobianos como la fengicina, surfactina, bacilisina y subtilisina A, efectivos contra cepas de *Vibrio* causantes de AHPND (WANG *et al.*, 2020). Asimismo, cepas que contienen genes como *srfAA* y *bacA* han mostrado alta eficacia en la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VPAHPND) con tasas de supervivencia superiores al 80 % en langostinos desafiados experimentalmente (FERIA *et al.*, 2019; PROESPRAIWONG *et al.*, 2023; SOTO-MARFILEÑO *et al.*, 2024).

Paralelamente, los ácidos orgánicos de cadena corta también han demostrado propiedades antimicrobianas. Estudios *in vitro* han evidenciado que compuestos como el ácido fórmico y el ácido acético inhiben efectivamente el crecimiento de *Vibrio harveyi*, mientras que mezclas de ácidos orgánicos y aceites esenciales han mejorado la composición microbiana intestinal de *P. vannamei* y la expresión de genes inmunológicos como la lisozima y la catalasa (MINE & BOOPATHY, 2011; HE *et al.*, 2017).

En este marco, la presente investigación tuvo como objetivo identificar cepas bacterianas con potencial probiótico aisladas de langostinos provenientes de sistemas de cultivo y ambientes naturales y, evaluar su efecto individualmente y en sinergia con compuestos orgánicos seleccionados, sobre el crecimiento y la supervivencia de *P. vannamei*.

In response to these challenges, probiotics have gained considerable attention as sustainable biotechnological alternatives for disease prevention and health management in aquaculture. Probiotics are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, provide beneficial effects to the host by improving intestinal microbial balance and enhancing immune responses (VERSCHUERE *et al.*, 2000; WHO & FAO, 2001). Several bacterial genera, including *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, and *Pediococcus*, have demonstrated the ability to produce antimicrobial compounds such as bacteriocins, lysozymes, siderophores, and peroxides that inhibit aquatic pathogens (NAYAK, 2010; HAI, 2015; MIDHUN *et al.*, 2017; EL-SAADONY *et al.*, 2021).

Particularly, *Bacillus subtilis* has been reported to harbor genes encoding antimicrobial peptides such as fengycin, surfactin, bacilysin, and subtilisin A, which exhibit strong antagonistic activity against AHPND-associated *Vibrio* strains (WANG, *et al.*, 2020). Likewise, bacterial strains carrying genes such as *srfAA* and *bacA* have demonstrated high inhibitory activity against AHPND-positive *Vibrio parahaemolyticus*, achieving survival rates above 80 % in experimentally challenged *P. vannamei* (FERIA *et al.*, 2019; PROESPRAIWONG *et al.*, 2023; SOTO-MARFILEÑO *et al.*, 2024).

In addition to probiotics, short-chain organic acids have shown promising antimicrobial properties in aquaculture applications. *In vitro* studies have demonstrated that compounds such as formic acid and acetic acid effectively suppress the growth of *Vibrio harveyi*. Furthermore, dietary supplementation with mixtures of organic acids and essential oils has been shown to improve the intestinal microbiota of *P. vannamei* and stimulate the expression of immune-related genes, including lysozyme and catalase (MINE & BOOPATHY, 2011; HE *et al.*, 2017).

In this context, the present study aimed to identify bacterial strains with probiotic potential isolated from *P. vannamei* collected from aquaculture systems and natural environments, and to evaluate their individual and synergistic effects, in combination with selected organic compounds, on the growth performance and survival of the species.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se realizaron tres muestreos en cuatro centros de cultivo localizados en las provincias de Tumbes y Zarumilla, así como en tres canales de marea: El Algarrobo (3°28'12"S, 80°17'53"W), El Bendito (3°27'00"S, 80°19'02"W) y boca del río Tumbes (3°29'1"S, 80°27'15"W).

Los ejemplares fueron capturados manualmente y colocados en contenedores térmicos (*coolers*) provistos con *gelpacks* para mantener la cadena de frío durante el transporte hacia el Laboratorio de Sanidad Acuícola (LSA) del Instituto del Mar del Perú, sede Tumbes, para el procesamiento respectivo.

El primer muestreo se realizó en abril en la provincia de Zarumilla, en el que se obtuvieron cinco langostinos de cultivo, con longitud y peso promedio de 11,66 cm y 11,18 g, respectivamente, con características externas anormales tales como: cromatóforos expandidos, pleópodos y urópodos rojos (Fig. 1), además de hepatopáncreas pálido y de consistencia dura, y diez langostinos silvestres a partir del canal de marea El Algarrobo con talla y peso promedio de 6,64 cm y 1,96 g, respectivamente y, del canal de marea El Bendito con talla y peso promedio de 7,26 cm y 2,74 g, respectivamente; los cuales no mostraron externamente sintomatología de enfermedad.

2. MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

Three sampling surveys were conducted at four aquaculture farms located in the provinces of Tumbes and Zarumilla, as well as at three tidal channels: El Algarrobo (3°28'12"S, 80°17'53"W), El Bendito (3°27'00"S, 80°19'02"W), and the mouth of the Tumbes River (3°29'01"S, 80°27'15"W).

Specimens were manually collected and transported under refrigerated conditions in insulated containers containing gel ice packs to the Aquaculture Health Laboratory (AHL) of the *Instituto del Mar del Perú* - IMARPE, Tumbes, where all subsequent analyses were performed.

The first survey was carried out in April in Zarumilla Province. Five cultured *Penaeus vannamei* were collected, with a mean total length and body weight of 11.66 cm and 11.18 g, respectively. These individuals displayed abnormal external features, including expanded chromatophores and reddish pleopods and uropods (Fig. 1), in addition to pale and hardened hepatopancreas tissue. Ten wild specimens were also obtained from El Algarrobo tidal channel, with average length and weight of 6.64 cm and 1.96 g, respectively, and from El Bendito tidal channel, with average length and weight of 7.26 cm and 2.74 g, respectively. Wild specimens did not exhibit visible signs of disease.



Figura 1.- Langostinos con cromatóforos expandidos, pleópodos y urópodos rojos

Figure 1. *P. vannamei* specimens exhibiting expanded chromatophores and reddish pleópodos and uropods

El segundo muestreo se realizó en mayo, en el que se recolectaron doce langostinos de cultivo a partir de dos centros de cultivo de la provincia de Tumbes, con tallas y pesos promedios de 3,22 cm y 0,22 g a 13,91 cm y 18,46 g, respectivamente. Así mismo, se recolectaron seis langostinos silvestres entre *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris*, del canal de marea El Algarrobo, de 9,70 cm y 6,53 g, respectivamente.

El tercer muestreo se realizó en julio en la provincia de Tumbes, en el que se obtuvieron cinco langostinos de cultivo de un centro ubicado en la margen izquierda del río Tumbes, con talla y peso promedio de 4,16 cm y 0,50 g, respectivamente, y cinco silvestres del canal de marea boca del río Tumbes de 8,88 cm y 4,35 g.

Aislamiento y cultivo bacteriano

A partir de cada langostino, se extrajeron de forma independiente los órganos diana: intestino y hepatopáncreas, empleando instrumental estéril. Los tejidos fueron depositados en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL que contenían solución salina estéril al 2 % de NaCl. La homogenización se realizó con un macerador estéril para obtener la solución madre, a partir de la cual se prepararon diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-3} .

Posteriormente, se sembraron 100 μ L de cada dilución sobre placas Petri con los siguientes medios de cultivo: MRS (para bacterias ácido-lácticas; solución madre 10^0 y dilución 10^{-1}), CHROMagar™ Vibrio (10^0 y 10^{-1}), TSA (tryptic soy agar; 10^{-2} y 10^{-3}) y cetrimide (selectivo para *Pseudomonas*; 10^0), todos ajustados con NaCl al 2 %. Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 h.

Ensayos moleculares mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Extracción de ADN bacteriano

El ADN genómico se extrajo a partir de cultivos bacterianos mediante un protocolo de lisis térmica. Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a $14,000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 300 μ L de agua ultrapura (AUP) ajustada a pH 8. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a $14,000 \times g$ durante 5 min, eliminando nuevamente el sobrenadante.

The second survey was conducted in May and included twelve cultured *P. vannamei* collected from two aquaculture facilities in Tumbes Province. Mean total length and body weight ranged from 3.22 cm and 0.22 g to 13.91 cm and 18.46 g, respectively. Additionally, six wild specimens, including *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*, were collected from the El Algarrobo tidal channel, with a mean total length and body weight of 9.70 cm and 6.53 g, respectively.

The third survey was conducted in July in Tumbes Province. Five cultured *P. vannamei* were collected from a farm located on the left bank of the Tumbes River, with a mean total length and body weight of 4.16 cm and 0.50 g, respectively. Five wild specimens were also collected from the mouth of the Tumbes River tidal channel, with a mean total length and body weight of 8.88 cm and 4.35 g, respectively.

Bacterial Isolation and Culture

The intestine and hepatopancreas were aseptically dissected from each specimen and processed separately. Tissue samples were placed into 1.5 mL microcentrifuge tubes containing sterile saline solution supplemented with 2% NaCl. Samples were homogenized using a sterile tissue grinder to obtain the stock suspension, from which serial decimal dilutions were prepared up to 10^{-3} .

Aliquots of 100 μ L from each dilution were inoculated onto Petri dishes containing the following culture media: MRS agar (for lactic acid bacteria; stock suspension 10^0 and dilution 10^{-1}), CHROMagar™ Vibrio (10^0 and 10^{-1}), TSA (tryptic soy agar; 10^{-2} and 10^{-3}), and cetrimide agar (selective for *Pseudomonas*; 10^0), all supplemented with 2% NaCl. Plates were incubated at 35 °C for 24 h.

Molecular Analyses by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bacterial DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from bacterial cultures using a thermal lysis protocol. Briefly, 1 mL of bacterial culture was centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 300 μ L of ultrapure water adjusted to pH 8. A second centrifugation was then performed at $14,000 \times g$ for 5 min, after which the supernatant was removed again.

El sedimento fue resuspendido en 200 μL de AUP y sometido a ebullición a 98 ± 2 °C durante 10 min. Inmediatamente después, las muestras fueron colocadas en hielo por 5 min y centrifugadas a $14,000 \times g$ durante 5 min. Se recuperaron 50 μL del sobrenadante, correspondiente al ADN crudo, del cual se tomó un alícuota de 2 μL para determinar su concentración y pureza mediante espectrofotometría (*Nanodrop One, Thermo Scientific*). Una alícuota de 1 μL fue reservada para su uso en las reacciones de PCR.

Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el kit comercial GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega). Cada mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 μL , compuesto por: 12,5 μL de Master Mix 2X, 9,5 μL de AUP, 1 μL de cada cebador (forward y reverse) y 1 μL de ADN molde.

Para la detección de genes relacionados con la producción de péptidos antimicrobianos (AMP) se emplearon iniciadores específicos dirigidos a los genes: *bmyB* (bacillomycin L synthetase B), *fenD* (fengycin synthetase), *ituC* (iturin A synthetase C), *srfAA* (surfactin synthetase subunit 1), *bacA* (bacilysin biosynthesis protein) y *spaS* (subtilin), de acuerdo con los reportes de MORA *et al.* (2011) y PROESPRAIWONG *et al.* (2023). Asimismo, para la detección del agente causal del síndrome de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), se utilizaron iniciadores TUMSATVp3 y PirAB-2020 basados en los estudios de TINWONGGER *et al.* (2014) y PHIWSAIYA *et al.* (2017), respectivamente.

El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a la temperatura específica para cada par de iniciadores (Tabla 1) durante 30 s, y extensión a 72 °C por un min. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con SyBr Safe DNA gel stain (*Thermo fisher scientific*) y observado bajo luz ultravioleta.

The pellet was resuspended in 200 μL of ultrapure water and subjected to boiling at 98 ± 2 °C for 10 min. Samples were immediately cooled on ice for 5 min and centrifuged at $14,000 \times g$ for 5 min. Subsequently, 50 μL of the supernatant containing crude DNA extract were recovered. DNA concentration and purity were determined spectrophotometrically using a NanoDrop One system (Thermo Scientific), employing a 2 μL aliquot. An additional 1 μL aliquot was reserved for PCR assays.

PCR Amplification

PCR assays were carried out using the commercial GoTaq® Colorless Master Mix 2X kit (Promega). Each reaction had a final volume of 25 μL , consisting of 12.5 μL of 2X Master Mix, 9.5 μL of ultrapure water, 1 μL of each primer (forward and reverse), and 1 μL of template DNA.

Specific primers targeting genes associated with antimicrobial peptide (AMP) production were used to detect the following genes: *bmyB* (bacillomycin L synthetase B), *fenD* (fengycin synthetase), *ituC* (iturin A synthetase C), *srfAA* (surfactin synthetase subunit 1), *bacA* (bacilysin biosynthesis protein), and *spaS* (subtilin), following the protocols described by MORA *et al.* (2011) and PROESPRAIWONG *et al.* (2023). To detect the etiological agent associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), primer sets TUMSATVp3 and PirAB-2020 were employed according to TINWONGGER *et al.* (2014) and PHIWSAIYA *et al.* (2017), respectively.

PCR amplification consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at the specific temperature for each primer pair (Table 1) for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min. A final extension step was performed at 72 °C for 5 min.

Amplified products were visualized by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) and observed under ultraviolet illumination.

Tabla 1.- Lista de Iniciadores utilizados en la presente investigación
Table 1. List of primers used in the present study

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño del producto (pb)
pVA1	TUMSATVp3F	GTGTTGCATAATTTTGTGCA	56	360
	TUMSATVp3R	TTGTACAGAAACCACGACTA		
PirABvp	PirAB-2020F	GCACCGTAAATTTTCAGGTT	50	2020
	PirAB-2020R	CGTTGCAATCTAAGACATAG		
fenD	fenD_F	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT	58	269
	fenD_R	GTCATGCTGACGAGAGCAAA		
bmyB	bmyB_F	GAATCCCGTTGTTCTCCTAAA	55	370
	bmyB_R	GCGGGTATTGAATGCTTGTT		
ituC	ituC_F	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT	58	423
	ituC_R	TCGCAGATAATCGCAGTGAG		
srfAA	srfAA_F	TCGGGACAGGAAGACATCAT	58	201
	srfAA_R	CCACTCAAACGGATAATCCTGA		
bacA	bacA_F	CAGCTCATGGGAATGCTTTT	58	498
	bacA_R	CTCGGTCCTGAAGGGACAAG		
spaS	spaS_F	GGTTTGTGGATGGAGCTGT	58	375
	spaS_R	GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT		

Desarrollo de ensayos *in vitro*

Se evaluaron tres técnicas para determinar la inhibición bacteriana de las cepas aisladas: disco de agar, difusión en pozos y antagonismo con discos de papel.

Disco de agar: se sembraron las cepas aisladas sobre agar MRS, se obtuvieron discos de agar de estas cepas y se colocaron sobre placas con agar Müller Hinton inoculadas previamente con la cepa patógena de *Vibrio*.

Difusión en pozos: se realizaron 4 pozos por placa sobre agar Müller Hinton inoculado con la cepa patógena, depositando 5 µL de las cepas en medio MRS suspendidas en TSB al 2 % de NaCl.

Antagonismo con discos de papel: se colocaron discos de papel Whatman impregnados con las cepas bacterianas sobre placas de Müller Hinton inoculadas con *Vibrio*.

Todas las placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 h para evaluar la formación de halos de inhibición.

Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos en milímetros, registrándose el promedio de tres repeticiones.

In Vitro Antagonism Assays

Three methodologies were evaluated to determine the inhibitory activity of the bacterial isolates: agar plug diffusion, well diffusion, and paper disk antagonism assays.

Agar plug diffusion assay: bacterial isolates were cultured on MRS agar, and agar plugs containing bacterial growth were transferred onto Müller–Hinton agar plates previously inoculated with pathogenic *Vibrio* strains.

Well diffusion assay: four wells were prepared in Müller–Hinton agar plates previously inoculated with the pathogenic strain. Each well received 5 µL of bacterial culture grown in MRS medium and suspended in TSB supplemented with 2% NaCl.

Paper disk antagonism assay: sterile Whatman paper disks impregnated with bacterial cultures were placed onto Müller–Hinton agar plates inoculated with pathogenic *Vibrio*.

All plates were incubated at 35 °C for 24 h, after which inhibition halos were evaluated.

Halo diameters were measured in millimeters, and mean values from three replicates were recorded.

Evaluación de compuestos orgánicos contra cepas de vibrios

Se evaluó la capacidad inhibitoria de diez compuestos orgánicos comúnmente empleados en la acuicultura de la Región de Tumbes: ProtAcid, Liverin, Spart Trox líquido, SFF IG PREMIX, Citruspart Gel, Ácidos Orgánicos Plus, Citruspart líquido, Orevitól, Rossysil y AcidStar. Se examinó su efecto antagonista frente a cepas patógenas de *Vibrio* aisladas en esta investigación y aquellas pertenecientes al cepario del LSA.

Desarrollo de ensayos *in vivo*

Se realizaron tres bioensayos experimentales en acuarios de vidrio de 50 L con agua marina tratada con luz UV y aireación constante. La capacidad inhibitoria de los compuestos se evaluó mediante la medición del diámetro de halos de inhibición (mm), considerando tres repeticiones por tratamiento.

Primer bioensayo – Evaluación de patogenicidad de *Vibrio*

Se utilizaron seis cepas de *Vibrio*, los cuales fueron cultivados en medio TSB al 2 % de NaCl, alcanzando una concentración promedio de 2×10^5 UFC/mL en cada acuario, determinada mediante cultivos de diluciones seriadas. Se emplearon 7 tratamientos (6 experimentales y uno control), con tres repeticiones por tratamiento. En cada acuario, que contenía 20 langostinos previamente aclimatados durante 24 h, se inocularon 45 mL del cultivo bacteriano. El tratamiento control contenía únicamente medio de cultivo, sin la adición de bacterias.

Segundo bioensayo – Evaluación de cepas probióticas

Se utilizaron seis cepas aisladas (41, 45, 46, 47, 59 y 146), seleccionadas por su capacidad inhibitoria. Se preparó alimento con cada cepa a una concentración promedio de 1×10^7 UFC/g, suministrado durante los primeros siete días. En el día siete, se adicionaron 45 mL de cultivo de la cepa patógena (*Vibrio* AHPND+) a una concentración promedio de $6,4 \times 10^7$ UFC/mL, determinada mediante cultivos de diluciones seriadas. Al final, se recolectaron los langostinos supervivientes para su análisis por PCR e histopatología.

Evaluation of Organic Compounds Against *Vibrio* Strains

The inhibitory activity of ten organic compounds commonly used in aquaculture in the Tumbes Region was assessed: ProtAcid, Liverin, Spart Trox Liquid, SFF IG PREMIX, Citruspart Gel, Organic Acids Plus, Citruspart Liquid, Orevitól, Rossysil, and AcidStar. Their antagonistic activity was evaluated against pathogenic *Vibrio* strains isolated during this study as well as strains maintained in the AHL bacterial collection.

In Vivo Bioassays

Three experimental bioassays were conducted in 50 L glass aquaria containing UV-treated seawater under continuous aeration. Inhibitory activity was evaluated based on survival and histopathological responses, with three replicates per treatment.

First Bioassay – Pathogenicity Assessment of *Vibrio*

Six *Vibrio* strains were cultured in TSB supplemented with 2% NaCl until reaching an average concentration of 2×10^5 CFU/mL in each aquarium, determined through serial dilution plating. Seven treatments were established (six experimental and one control), each with three replicates. Twenty acclimated *P. vannamei* were stocked per aquarium, and 45 mL of bacterial culture were inoculated into each experimental unit. Control aquaria received only sterile culture medium without bacterial inoculation.

Second Bioassay – Evaluation of Probiotic Strains

Six bacterial isolates (41, 45, 46, 47, 59, and 146), selected based on their inhibitory capacity, were evaluated. Experimental diets were prepared with each isolate at an average concentration of 1×10^7 CFU/g feed and administered during the first seven days. On day seven, 45 mL of pathogenic *Vibrio* culture (AHPND+) were added at an average concentration of 6.4×10^7 CFU/mL, determined through serial dilution plating. At the conclusion of the assay, surviving *P. vannamei* were collected for PCR and histopathological analyses.

Tercer bioensayo – Evaluación combinada de cepas probióticas y compuestos orgánicos

Se establecieron ocho tratamientos, con tres repeticiones por tratamiento, consistentes en combinaciones de la cepa 45 (1×10^7 UFC/g alimento) con los compuestos ProtAcid y Orevitol, además de los respectivos controles. Tras los siete días de administración de los tratamientos, se realizó el desafío con la cepa patógena, evaluándose dos concentraciones en el acuario: $1,67 \times 10^5$ UFC/mL (alta) y $3,72 \times 10^3$ UFC/mL (baja). Durante y al final del bioensayo, se tomaron muestras para análisis histológico.

Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se realizó en muestras de langostinos obtenidas en todos los bioensayos, siguiendo el protocolo de LIGHTNER (1996) con modificaciones adaptadas al presente estudio. Las muestras se fijaron en solución Davidson (330 mL de etanol al 95%, 220 mL de formol al 37%, 115 mL de ácido acético glacial y 335 mL de agua destilada) por un máximo de 48 h. Posteriormente, se procesaron en un equipo automatizado de tejidos marca Leica.

El protocolo incluyó deshidratación progresiva en alcohol (70 %, 80 %, 95 %, absoluto), clarificación con xilol e inclusión en parafina. Los cortes se realizaron con micrótopo semi-automático Leica, se montaron en láminas portaobjetos y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina Y/Floxina B de Harris para su observación microscópica.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar, según correspondiera al tipo de variable evaluada.

Previamente al análisis inferencial, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Cuando los datos cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey para la comparación múltiple de medias. En aquellos casos en los que los datos no cumplieron dichos supuestos, se empleó la prueba

Third Bioassay – Combined Evaluation of Probiotic Strains and Organic Compounds

Eight treatments were established, each with three replicates, consisting of combinations of strain 45 (1×10^7 CFU/g feed) with ProtAcid and Orevitol, in addition to the corresponding controls. After seven days of treatment administration, organisms were challenged with the pathogenic strain at two concentrations: 1.67×10^5 CFU/mL (high dose) and 3.72×10^3 CFU/mL (low dose). Samples were collected during and after the bioassay for histological examination.

Histopathological Analysis

Histopathological analyses were performed on specimens collected from all bioassays following the methodology proposed by LIGHTNER (1996), with modifications adapted for the present study. Samples were fixed in Davidson's solution (330 mL 95% ethanol, 220 mL 37% formaldehyde, 115 mL glacial acetic acid, and 335 mL distilled water) for up to 48 h and subsequently processed using an automated Leica tissue processor.

The protocol included progressive dehydration in graded ethanol solutions (70%, 80%, 95%, and absolute ethanol), xylene clarification, and paraffin embedding. Tissue sections were obtained using a Leica semi-automatic microtome, mounted on glass slides, and stained with Harris hematoxylin and eosin Y/phloxine B for microscopic examination.

Statistical Analysis

Data obtained from *in vitro* and *in vivo* assays were analyzed using descriptive and inferential statistics. Results are expressed as mean \pm standard deviation according to the type of variable evaluated.

Prior to inferential analyses, data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test, whereas homogeneity of variances was evaluated using Levene's test. When assumptions of normality and homoscedasticity were satisfied, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test was applied for multiple comparisons. When assumptions were not met, the non-parametric Kruskal–Wallis test

ba no paramétrica de Kruskal–Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Para el análisis de los ensayos de supervivencia en los bioensayos, se compararon los porcentajes finales de supervivencia entre tratamientos utilizando ANOVA o Kruskal–Wallis, según correspondiera. En todos los análisis, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de p fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Ensayos microbiológicos

A partir de las muestras recolectadas en los tres muestreos se aislaron 180 colonias bacterianas. La mayor proporción de aislados se obtuvo en CHROMagar™ *Vibrio*, con 72 colonias (40,0 %), seguido del medio MRS, con 61 colonias (33,9 %), Cetrimide, con 25 colonias (13,9 %) y TSA, con 22 colonias (12,2 %). Estos resultados reflejan la elevada diversidad bacteriana presente tanto en organismos cultivados como silvestres (Fig. 2).

Identificación molecular de genes antibacterianos

Las 61 colonias aisladas en medio MRS fueron analizadas mediante PCR para detectar genes codificantes de péptidos antimicrobianos. Se identificó que las cepas 47 y 59 amplificaron los genes surfactin, bacilysin, bacylomycin y fengycin, mientras que la cepa 45 fue positiva únicamente para el gen surfactin. El resto de los aislados no mostró amplificación específica o presentó bandas inespecíficas. La distribución de los genes detectados se detalla en la Tabla 2.

followed by Dunn’s multiple comparison test was used.

For survival analyses in the bioassays, final survival percentages among treatments were compared using either ANOVA or Kruskal–Wallis tests, depending on data distribution. Statistical significance was established at $p < 0.05$ for all analyses.

3. RESULTS

Microbiological tests

A total of 180 bacterial isolates were recovered from samples collected during the three sampling campaigns. The highest number of isolates was obtained on CHROMagar™ *Vibrio*, which accounted for 72 colonies (40.0 %), followed by MRS medium with 61 colonies (33.9 %), Cetrimide agar with 25 colonies (13.9 %), and TSA with 22 colonies (12.2 %). These results demonstrate the considerable bacterial diversity associated with both cultured and wild *Penaeus vannamei* populations (Fig. 2).

Molecular detection of antibacterial genes

The 61 isolates recovered on MRS medium were screened by PCR for genes encoding antimicrobial peptides (AMPs). Strains 47 and 59 were positive for the genes encoding surfactin, bacilysin, bacillomycin, and fengycin, whereas strain 45 amplified only the surfactin gene. The remaining isolates either failed to amplify or produced nonspecific PCR products. The distribution of detected AMP-related genes is presented in Table 2.

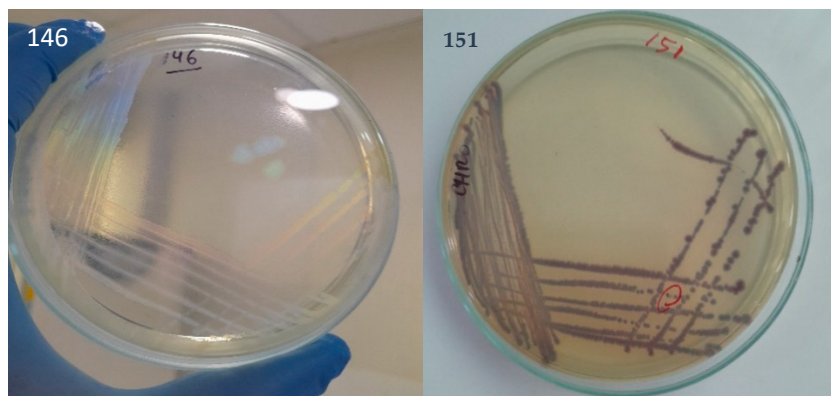


Figura 2.- Crecimiento bacteriano en medios específicos, Cetrimide (izquierda) y ChromAgar Vibrio (derecha)

Figure 2. Bacterial growth on selective media: Cetrimide agar (left) and ChromAgar Vibrio (right)

Tabla 2.- Detección de genes antimicrobianos por cepa bacteriana
Table 2. Detection of antimicrobial peptide genes in bacterial isolates

Gen	Cepas bacterianas/ Bacterial strains		
	45	47	59
surfactin	+	+	+
bacylisin		+	+
bacyllomicin		+	+
fengycin		+	+

Detección de cepas de *Vibrio* asociadas a AHPND

De las 72 colonias aisladas en CHROMagar *Vibrio*, tres cepas (4,17 %) fueron analizadas por PCR utilizando iniciadores TUMSATVp3 para detectar la región de ADN, relacionada con la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Tres cepas (4,17 %) resultaron positivas para ambos genes (Fig. 3).

Con iniciadores PirAB2020, la cepa 5 mostró productos del mismo tamaño que las cepas control positivas Psty1A y Psty3. Las cepas 22 y 14 presentaron productos de mayor y menor tamaño, respectivamente (Fig. 4).

Detection of *Vibrio* strains associated with AHPND

Among the 72 colonies isolated on CHROMagar™ *Vibrio*, three strains (4.17%) were analyzed by PCR using TUMSATVp3 primers targeting the DNA region associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). Three isolates (4.17%) tested positive for both target genes (Fig. 3).

Using PirAB-2020 primers, strain 5 generated amplification products of similar size to those obtained for the positive control strains Psty1A and Psty3. In contrast, strains 22 and 14 produced larger and smaller amplicons, respectively (Fig. 4).

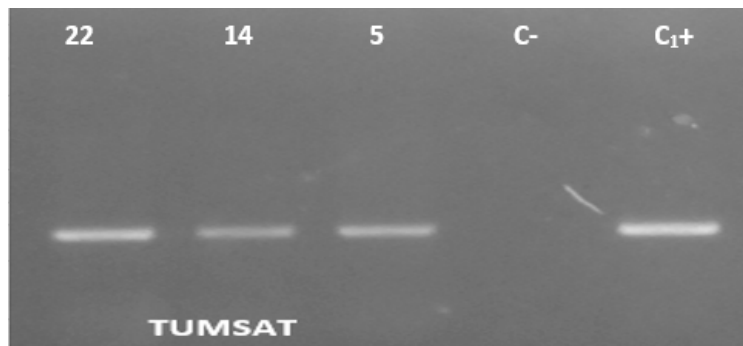


Figura 3.- Migración de productos de ADN, de cepas relacionadas al AHPND
Figure 3. Migration of DNA products from strains associated with AHPND

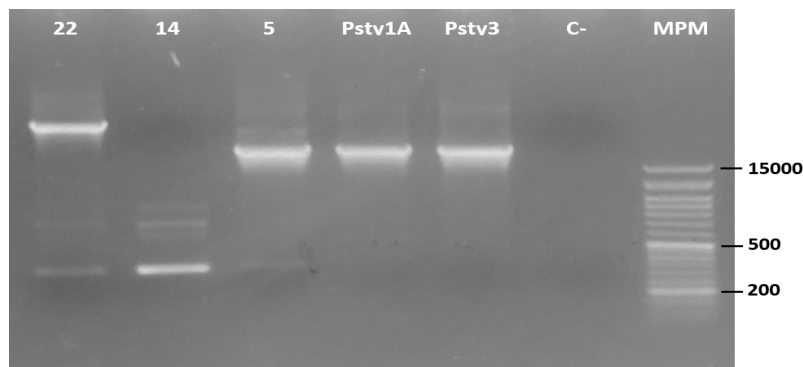


Figura 4.- Migración de productos de PCR dirigidos a la amplificación de los genes pirAB, con los iniciadores pirAB2020. Carril 1, 2 y 3, cepas bacterianas con diferentes tamaños de amplificación
Figure 4.- Migration of PCR products targeting amplification of the pirAB genes using the pirAB2020 primers. Lanes 1, 2 and 3 show bacterial strains with different amplification sizes

Ensayos *in vitro* de antagonismo bacteriano

Las pruebas de antagonismo bacteriano en placas, revelaron que seis cepas aisladas del medio MRS (cepas 41, 45, 46, 59, 125 y 131) presentaron actividad inhibitoria frente a las cepas patógenas de *Vibrio* 5, 14 y 22, evidenciada por la formación de halos de inhibición.

El análisis estadístico del diámetro de los halos mostró diferencias significativas entre las cepas evaluadas ($p < 0,05$), destacándose la cepa 45, que presentó los mayores valores promedio de inhibición frente a las tres cepas patógenas (Fig. 5).

Evaluación de compuestos orgánicos frente a *Vibrio*

Entre los compuestos orgánicos evaluados, Orevitol, ProtAcid y Spart generaron halos de inhibición significativamente mayores frente a las cepas de *Vibrio* 5 y Psty1A con valores promedio de 36,0 mm y 30,3 mm, respectivamente, en comparación con los demás compuestos evaluados cuyo promedio fue de 17,8 mm (ANOVA, $p < 0,05$). De ellos, ProtAcid y Orevitol presentaron el mayor efecto antagonista, mientras que compuestos como Rossysil, Liverin y AcidStar presentaron una actividad inhibitoria significativamente menor (Fig. 6).

In vitro bacterial antagonism assays

Plate antagonism assays demonstrated that six isolates recovered on MRS medium (strains 41, 45, 46, 59, 125, and 131) exhibited inhibitory activity against pathogenic *Vibrio* strains 5, 14, and 22, as evidenced by the formation of clear inhibition halos.

Statistical analysis of inhibition halo diameters revealed significant differences among the evaluated strains ($p < 0.05$). Among them, strain 45 exhibited the strongest antagonistic activity, producing the largest mean inhibition halos against all three pathogenic strains (Fig. 5).

Evaluation of organic compounds against *Vibrio*

Among the evaluated organic compounds, Orevitol, ProtAcid, and Spart produced significantly larger inhibition halos against *Vibrio* strains 5 and Psty1A, with mean diameters of 36.0 mm and 30.3 mm, respectively, compared with the remaining compounds, which averaged 17.8 mm (ANOVA, $p < 0.05$). ProtAcid and Orevitol exhibited the greatest antagonistic activity, whereas Rossysil, Liverin, and AcidStar showed significantly lower inhibitory effects (Fig. 6).

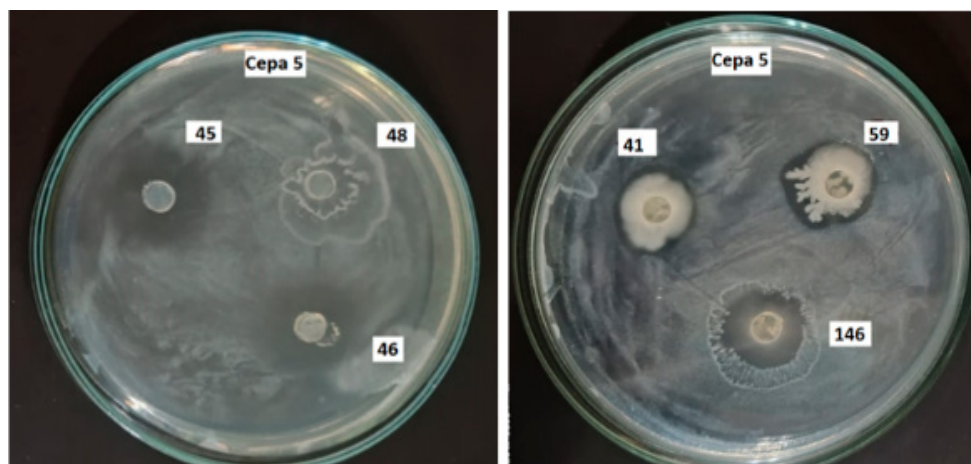


Figura 5.- Ensayo de antagonismo *in vitro*. Se aprecia halo de inhibición de las cepas antagonistas a cepa de *Vibrio* 5

Figure 5. *In vitro* antagonism assay. An inhibition halo is observed from antagonistic strains against the *Vibrio* strain 5

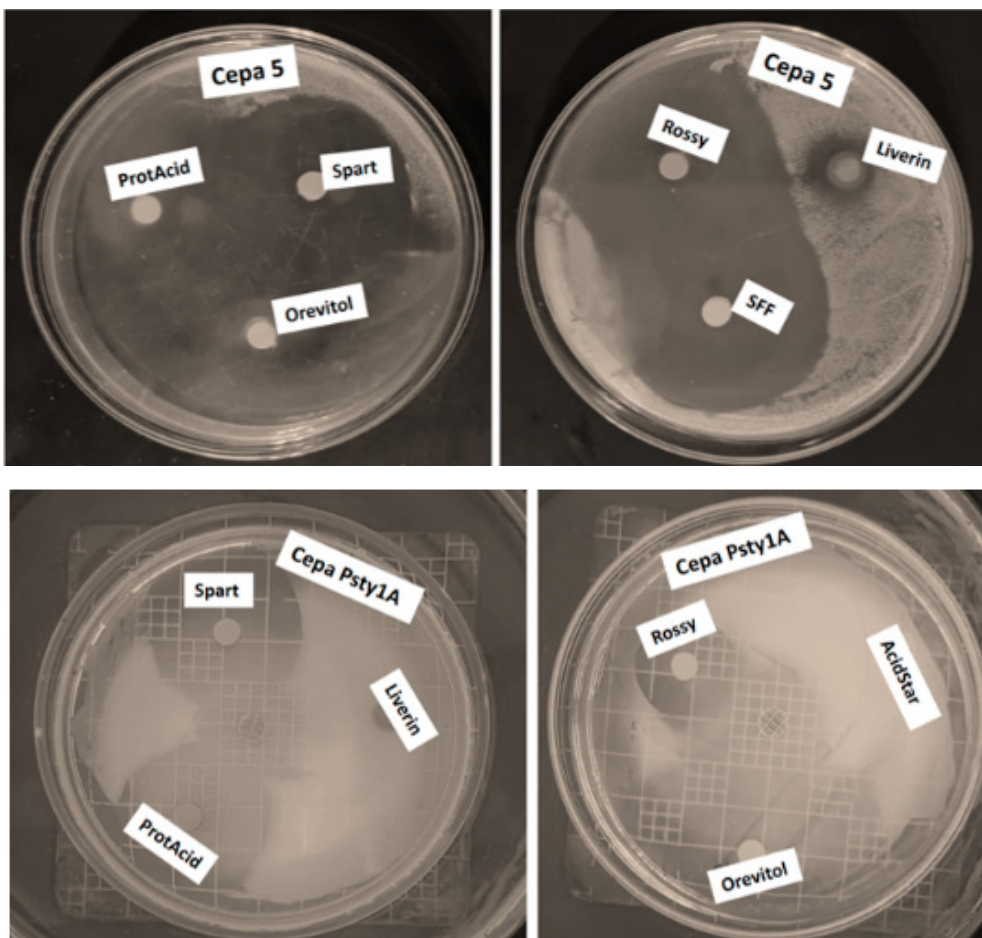


Figura 6.- Antibiogramas. Presencia de halos de inhibición de los compuestos orgánicos (Spart, ProtAcid, Rossysil, Liverin, AcidStar, SFF y Orevitol) frente a las cepas de *Vibrio* 5 y Psty1A

Figure 6.- Antibiograms. Presence of inhibition halos produced by organic compounds (Spart, ProtAcid, Rossysil, Liverin, AcidStar, SFF, and Orevitol) against *Vibrio* strain 5 and Psty1A strain

Bioensayo 1: Evaluación de patogenicidad de *Vibrio*

En el bioensayo de patogenicidad, realizado en langostinos con un peso promedio de 2,98 g, las cepas 5, Psty1A y Psty3 ocasionaron una mortalidad elevada, registrándose supervivencias finales entre 3 y 10 %, valores significativamente menores en comparación con los controles negativos ($p < 0,05$).

Por el contrario, los tratamientos con las cepas 14 y 22 no mostraron diferencias significativas respecto a los controles sin infección y con cepa no patogénica, alcanzando supervivencias entre 98 y 100 % ($p > 0,05$) (Fig. 7).

Bioassay 1: Evaluation of *Vibrio* pathogenicity

In the pathogenicity bioassay conducted using *Penaeus vannamei* with a mean body weight of 2.98 g, strains 5, Psty1A, and Psty3 caused severe mortality, resulting in final survival rates ranging from 3 % to 10 %, significantly lower than those observed in the negative controls ($p < 0.05$).

Conversely, treatments challenged with strains 14 and 22 did not differ significantly from the uninfected and nonpathogenic controls, achieving survival rates between 98 % and 100 % ($p > 0.05$) (Fig. 7).

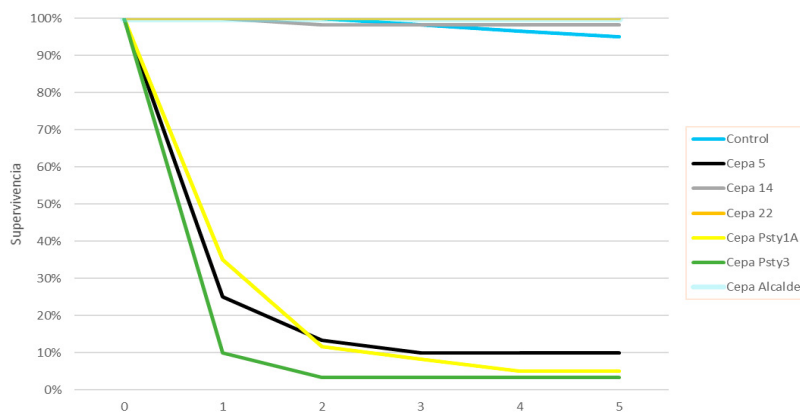


Figura 7.- Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Vibrio*
 Figure 7. Pathogenicity assessment of *Vibrio* strains

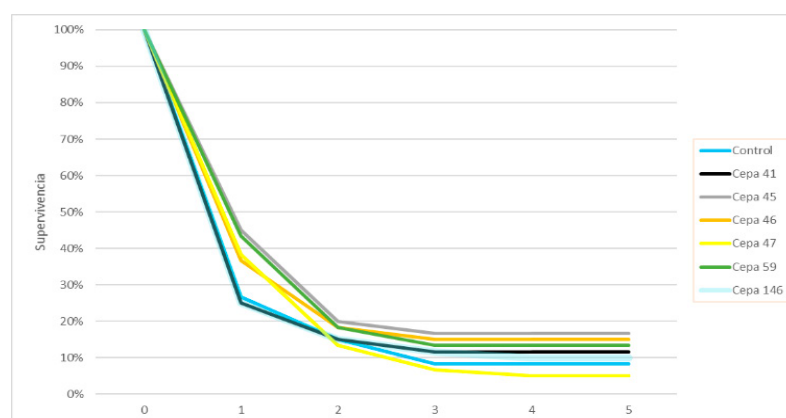


Figura 8.- Evaluación de la capacidad probiótica de las cepas bacterianas
 Figure 8. Evaluation of the probiotic potential of bacterial strains

Bioensayo 2: Evaluación de cepas probióticas

En el bioensayo destinado a evaluar la capacidad de las bacterias para proteger a langostinos expuestos a vibrios patógenos, se observó que cinco cepas lograron una supervivencia ligeramente superior a la del tratamiento control (8 %). Entre ellas, la cepa 45 presentó el mayor porcentaje de supervivencia (17 %) en comparación con las demás cepas evaluadas (Fig. 8).

Bioensayo 3: Combinación probiótico y compuesto orgánico

En los tratamientos expuestos a la concentración baja de la cepa patógena no se registró mortalidad, por lo que no fue posible evaluar diferencias estadísticas.

En los tratamientos expuestos a la concentración alta, se observaron diferencias significativas en la supervivencia ($p < 0,05$). La combinación de la cepa 45 y ProtAcid mostró la mayor supervi-

Bioassay 2: Evaluation of probiotic strains

In the bioassay designed to assess the protective effects of bacterial isolates against pathogenic *Vibrio*, five strains produced survival rates slightly higher than the control treatment (8 %). Among them, strain 45 achieved the highest survival rate (17 %), outperforming the other evaluated strains (Fig. 8).

Bioassay 3: Combined probiotic and organic compound treatment

No mortality was observed in treatments challenged with the lower concentration of the pathogenic strain, precluding statistical comparisons among treatments.

Under the high-concentration challenge, significant differences in survival were detected ($p < 0.05$). The combined treatment consisting of strain 45 and ProtAcid achieved the highest survival rate (78 %), significantly higher than

vencia (78 %), valor significativamente superior al del control (47 %) y a los demás tratamientos, los cuales no superaron el 48 % (Fig. 9).

Histología

Los análisis histopatológicos realizados en muestras de langostinos provenientes de los bioensayos, revelaron lesiones compatibles con la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). En los túbulos del hepatopáncreas se observó desprendimiento de las células epiteliales, una lesión característica de esta patología (Fig. 10).

Estas alteraciones histológicas fueron evidentes únicamente en las muestras correspondientes a los tratamientos donde se registraron altas mortalidades, lo cual refuerza la asociación entre la presencia de cepas patógenas de *Vibrio* spp. y el desarrollo del cuadro clínico de AHPND en los organismos experimentales.

the control treatment (47 %) and all remaining treatments, none of which exceeded 48 % survival (Fig. 9).

Histopathology

Histopathological analyses of *P. vannamei* specimens collected during the bioassays revealed lesions consistent with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). Hepatopancreatic tubules exhibited sloughing of epithelial cells, a hallmark lesion associated with this disease (Fig. 10).

These histological alterations were observed exclusively in treatments exhibiting high mortality, further supporting the association between pathogenic *Vibrio* spp. strains and the development of AHPND in the experimental organisms.

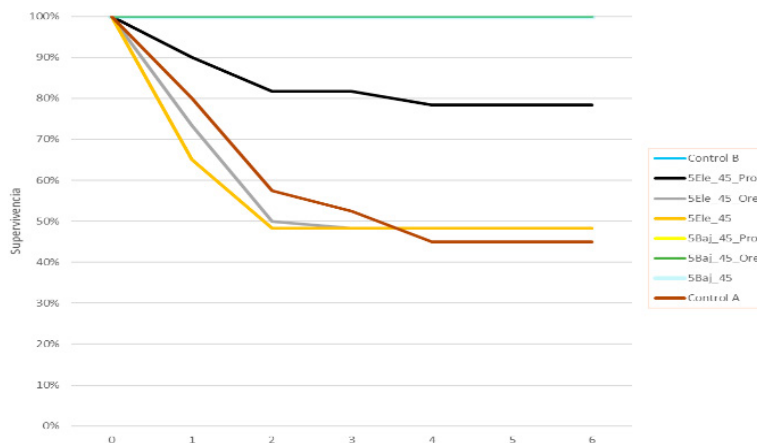


Figura 9.- Evaluación del efecto de las cepas bacterianas potencialmente probióticas en combinación con compuestos orgánicos, frente a vibrios patógenos

Figure 9. Evaluation of the effect of potentially probiotic bacterial strains in combination with organic compounds against pathogenic vibrios

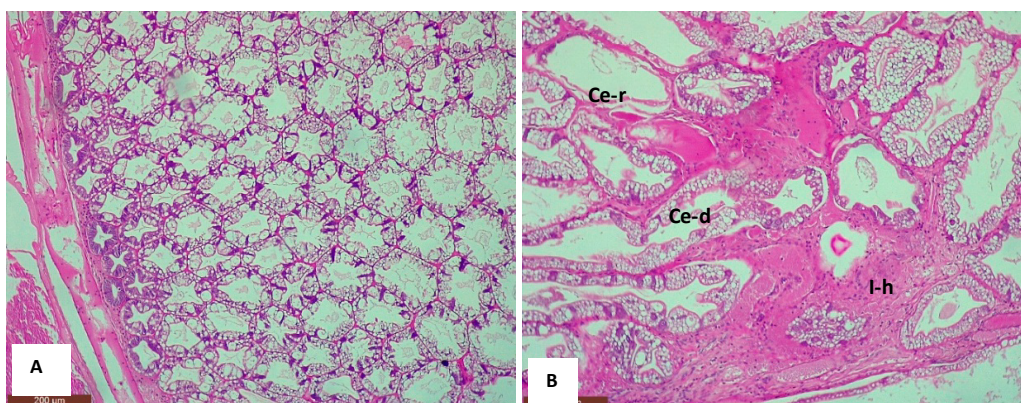


Figura 10.- Sección del hepatopáncreas de langostino, con presencia de células epiteliales desprendidas y presencia de nódulos hemocíticos

Figure 10. Section of *P. vannamei* hepatopancreas showing detached epithelial cells and the presence of hemocytic nodules

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

De los aislados bacterianos obtenidos, seis cepas cultivadas en medio MRS demostraron actividad antagonista *in vitro* frente a cepas de *Vibrio* asociadas a la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). De estas, tres presentaron amplificación por PCR de genes que codifican los péptidos antimicrobianos surfactina, bacilina, bacilomicina y fengicina, compuestos ampliamente descritos en especies del género *Bacillus* por su actividad inhibitoria frente a virus, hongos y diversas bacterias (SUMI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020; JIA *et al.*, 2024). Estos resultados sugieren que dichas cepas poseen un potencial significativo para su aplicación como probióticos en el cultivo de langostinos.

En cuanto a las cepas de *Vibrio* aisladas, tres mostraron amplificación con los iniciadores TUMSATVp3, los cuales son referenciados por la OMSA para la detección de cepas de *Vibrio* causantes de la AHPND. Sin embargo, solo una de estas cepas indujo mortalidad en los bioensayos con langostinos. Esta discrepancia entre la presencia de genes de virulencia y la expresión fenotípica de la patogenicidad podría atribuirse a variaciones en la secuencia y estructura de los genes *pir*, tales como deleciones o inserciones que alteren el marco de lectura y comprometan la expresión funcional de las toxinas (RAMÍREZ *et al.*, 2020; VICENTE *et al.*, 2020), las variaciones de las secuencias se aprecia con los iniciadores PirAB2020 los cuales amplifican completamente los genes *pir* y que resultaron diferentes entre las tres cepas aisladas. En este contexto, los resultados evidencian la necesidad de realizar análisis moleculares más exhaustivos que permitan una caracterización precisa del potencial patogénico de las cepas, incluso cuando se detecten marcadores genéticos de virulencia.

En los bioensayos, la cepa 45 mostró un efecto protector moderado, incrementando la supervivencia de *Penaeus vannamei* hasta un 17 %, en comparación con el 10 % observado en el tratamiento control. Aunque este valor es inferior a los reportados por PROESPRAIWONG *et al.* (2023) y SOTO-MARFILEÑO *et al.* (2024), quienes registraron supervivencias superiores al 89 %, estas diferencias podrían explicarse por varia-

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Among the bacterial isolates recovered in this study, six strains cultured on MRS medium displayed *in vitro* antagonistic activity against *Vibrio* strains associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). Three of these isolates showed PCR amplification of genes encoding the antimicrobial peptides surfactin, bacilysin, bacillomycin, and fengycin, metabolites commonly reported in *Bacillus* spp. for their broad-spectrum inhibitory activity against bacterial, fungal, and viral pathogens (SUMI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020; JIA *et al.*, 2024). These findings indicate that the identified strains possess promising probiotic potential for application in penaeids aquaculture.

Among the isolated *Vibrio* strains, three yielded positive amplifications with the TUMSATVp3 primers recommended by the OMSA for the detection of AHPND-associated *Vibrio*. However, only one strain produced significant mortality in the experimental bioassays. The inconsistency between the presence of virulence-associated genes and the observed pathogenic phenotype may be explained by structural and sequence variations within the *pir* genes, including insertions or deletions capable of disrupting the reading frame and impairing toxin expression (RAMÍREZ *et al.*, 2020; VICENTE *et al.*, 2020). This variability became evident with the PirAB2020 primers, which amplify the complete *pir* region and generated distinct amplification profiles among the three isolates. These results emphasize the need for more detailed molecular characterization to accurately determine the pathogenic capacity of isolates, even when virulence markers are detected by PCR.

In the *in vivo* bioassays, strain 45 exhibited a moderate protective effect, increasing the survival of *P. vannamei* to 17 %, compared with 10 % in the untreated control. Although this survival rate was lower than those reported by PROESPRAIWONG *et al.* (2023) and SOTO-MARFILEÑO *et al.* (2024), who documented survival rates above 89 %, these differences may reflect variations in experimental conditions such as bacterial concentration,

ciones en el diseño experimental, incluyendo la dosis bacteriana, la vía de administración y las condiciones ambientales. En este sentido, los resultados sugieren que la eficacia del probiótico aislado podría potenciarse mediante estrategias de formulación combinada.

El aditivo orgánico Protacid OX, compuesto por ácido fórmico y ácido lignosulfónico, ha sido previamente empleado en la industria camaronera como medida de control durante episodios de mortalidad en estanques de cultivo. En el presente estudio, su combinación con la cepa 45 incrementó significativamente la supervivencia de los langostinos hasta un 78 %, superando el 47 % registrado en el control y el 48 % observado en los demás tratamientos. La efectividad de los ácidos orgánicos en la inhibición de *Vibrio* ha sido ampliamente documentada (ADAMS & BOOPATHY, 2013; ROSSI *et al.*, 2021), y su acción sinérgica con probióticos puede favorecer la colonización intestinal y la producción de metabolitos antimicrobianos. De manera consistente, BUTUCEL *et al.* (2023) reportaron que la combinación de *Faecalibacterium prausnitzii* con ácidos orgánicos mejoró la colonización intestinal y la producción de butirato en *P. vannamei*, reduciendo significativamente la infección por *Vibrio parahaemolyticus*.

En conjunto, los resultados del presente estudio demuestran que la suplementación dietaria con la cepa bacteriana 45 en combinación con el ácido orgánico Protacid OX mejora significativamente la supervivencia de *Penaeus vannamei* expuestos a cepas patógenas de *Vibrio* causantes de AHPND. Esta estrategia representa una alternativa prometedora al uso de antibióticos en la acuicultura de langostinos, al contribuir a la mitigación de la resistencia antimicrobiana y a la reducción de impactos negativos sobre la salud pública y el medio ambiente. No obstante, se recomienda profundizar en la elucidación de los mecanismos de acción, evaluar diferentes esquemas de aplicación y validar estos resultados bajo condiciones de cultivo a escala comercial para confirmar su eficacia y reproducibilidad.

administration protocol, challenge intensity, and environmental parameters. Nevertheless, the results suggest that the probiotic performance of strain 45 may be enhanced when administered in combination with complementary bioactive compounds.

Protacid OX, an organic additive based on formic acid and lignosulfonic acid, has previously been employed in shrimp farming as a mitigation strategy during mortality outbreaks. In the present study, the combined administration of Protacid OX and strain 45 significantly increased survival to 78 %, markedly higher than the 47% recorded in the control treatment and the values below 48 % observed in the remaining treatments. The antimicrobial effects of organic acids against *Vibrio* spp. are well documented (ADAMS & BOOPATHY, 2013; ROSSI *et al.*, 2021), and their synergistic interaction with probiotics may promote intestinal colonization and stimulate the production of antimicrobial metabolites. Similarly, BUTUCEL *et al.* (2023) demonstrated that the combination of *Faecalibacterium prausnitzii* with organic acids enhanced intestinal colonization and butyrate production in *P. vannamei*, significantly reducing infection by *Vibrio parahaemolyticus*.

Taken together, the results of the present study demonstrate that dietary supplementation with bacterial strain 45 combined with Protacid OX significantly improves the survival of *Penaeus vannamei* challenged with pathogenic *Vibrio* strains associated with AHPND. This combined strategy represents a promising alternative to antibiotic use in shrimp aquaculture, with potential benefits for reducing antimicrobial resistance and minimizing negative impacts on public health and the environment. Further studies are nevertheless required to elucidate the underlying mechanisms involved, optimize application strategies, and validate these findings under commercial farming conditions to assess their long-term efficacy and reproducibility.

5. REFERENCIAS

- ADAMS, D. & BOOPATHY, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, 68(6) 1017–1021. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0251-x>
- BUTUCEL, E., BALTA, I., MCCLEERY, D., MARCU, A., STEF, D., PET, I., CALLAWAY, T., STEF, L. & CORCIONIVOSCHI, N. (2023). The Prebiotic effect of an organic acid mixture on *Faecalibacterium prausnitzii* metabolism and its anti-pathogenic role against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. *Biology*, 12, 57. <https://doi.org/10.3390/biology12010057>
- COMISIÓN DE PROMOCIÓN DEL PERÚ PARA LA EXPORTACIÓN Y EL TURISMO [PROMPERÚ]. (2022). *Informe situacional langostinos*. <https://hdl.handle.net/20.500.14152/6519>
- EL-SAADONY, M. T., ALAGAWANY, M., PATRA, A. K., KAR, I., TIWARI, R., DAWOOD, M. A. O., DHAMA, K. & ABDEL-LATIF, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36-52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>
- FERIA, M., CASTAÑEDA, A., TOLEDO, O., CASTILLO, D., CUEVA, M. & CEDEÑO, V. (2019). Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces. *Rev Inv Vet Perú*, 30(2), 908-922. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v30n2/a40v30n2.pdf>
- HAI, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- HE, W., RAHIMNEJAD, S., WANG, L., SONG, K., LU, K. & ZHANG, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 164-173. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- HONG, X. P., XU, D., ZHUO, Y., LIU, H. Q. & LU, L. Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *Journal of Fish Diseases*, 39, 1085–1097. <https://doi.org/10.1111/jfd.12441>
- HUANAMBAL SOVERO, C. (2020). *Residuos de antibióticos y resistencia antimicrobiana en acuicultura: antecedentes desde la literatura y percepción de los médicos veterinarios en el Perú* [Tesis de Maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. Repositorio UPCH. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/11827>
- JIA, J., FU, M., JI, W., XIONG, N., CHEN, P., LIN, J. & YANG, Q. (2024). Surfactin from *Bacillus subtilis* enhances immune response and contributes to the maintenance of intestinal microbial homeostasis. *Microbiology Spectrum*, 12(12), e00918-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00918-24>
- LIGHTNER, D. V. (1996). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society.
- MIDHUN, S. J., NEETHU, S., VYSAKH, A., SUNIL, M. A., RADHAKRISHNAN, E. K. & JYOTHIS, M. (2017). Antibacterial activity of autochthonous bacteria isolated from *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) and its in vitro probiotic characterization. *Microbial Pathogenesis*, 113, 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.058>
- MINE, S. & BOOPATHY, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Curr Microbiol.*, 63, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9932-2>
- MORA, I., CABREFIGA, J. & MONTESINOS, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14, 213-223. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>
- NAYAK, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553-1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- OANNES. (2024, 01 de agosto). *Perú - Una Crisis sin Precedentes en el Sector Acuícola de Langostinos Afecta el Dinamismo Económico, en Especial en la Región Tumbes*. <https://acortar.link/CIIILG>
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA [FAO]. (2024). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción*. <https://doi.org/10.4060/cd0683es>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL [OMSA]. (2023). Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda. En *Manual Acuático de la OMSA 2023* (Cap. 2.2.1). https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/2.2.01_AHPND_ESP.pdf
- PHIWSAIYA, K., CHAROENSAPSRI, W., TAENGPHU, S., DONG, H. T., SANGSURIYA, P., NGUYEN, G. T., PHAM, H. Q., AMPARYUP, P., SRITUNYALUCKSANA, K., TAENGCHAIYAPHUM, S., CHAIVISUTHANGKURA, P., LONGYANT, S., SITHIGORNGU, P. & SENAPIN, S. (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus* Δ pirA^{vp} pirB^{vp+} mutant kills shrimp but produces neither Pir^{vp} toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(16), e00680-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00680-17>
- PROESPRAIWONG, P., MAVICHAK, R., IMAIZUMI, K., HIRONO, I. & UNAJAK, S. (2023). Evaluation of *Bacillus* spp. as potent probiotics with reduction in AHPND-related mortality and facilitating growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farms. *Microorganisms*, 11, 2176. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092176>
- RAMÍREZ, B., GUEVARA, M., MONTOYA, V. & SERNA, M. (2020). Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Vibrio* sp. que contienen los genes *pirA* y *pirB* aislados de *Penaeus vannamei* de cultivo. *Bol Inst Mar Perú*, 35(2), 242–256. <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/303>
- RESOLUCIÓN DE DIRECCIÓN EJECUTIVA N°057-2016-SANIPES-DE. (2016). *Manual "Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación"*. Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). https://www.sanipes.gob.pe/normativas/15_R_DE_N_057_2016_A1.pdf
- REVERTER, M., SARTER, S., CARUSO, D., AVARRE, J. C., COMBE, M., PEPEY, E., POUYAUD, L., VEGA-HEREDÍA, S., DE VERDAL, H. & GOZLAN, R. E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature Communications*, 11, 1870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>

- ROSSI, B., ESTEBAN, M. A., GARCÍA-BELTRAN, J. M., GIOVAGNONI, G., CUESTA, A., PIVA, A. & GRILLI, E. (2021). Antimicrobial power of organic acids and nature-identical compounds against two *Vibrio* spp.: An in-vitro study. *Microorganisms*, 9, 966. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050966>
- SERRANO-MARTÍNEZ, E., CASAS, G. & CARBAJAL, J. (2022). Estado sanitario de los moluscos bivalvos y langostinos de Perú. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 10(2), 130-140. <https://doi.org/10.20453/stv.v10i2.4397>
- SOTO-MARFILEÑO, K. A., MOLINA GARZA, Z. J., GOMEZ FLORES, R., MOLINA-GARZA, V. M., IBARRA-GÁMEZ, J. C., GÓMEZ GIL, B. & GALAVIZ-SILVA, L. (2024). Genomic characterization of *Bacillus pumilus* Sonora, a strain with inhibitory activity against *Vibrio parahaemolyticus*-AHPND and probiotic candidate for shrimp aquaculture. *Microorganisms*, 12, 1623. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081623>
- SUMI, C. D., YANG, B. W., YEO, I. C. & HAHM, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.*, 61, 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
- TINWONGGER, S., PROESPRAIWONG, P., THAWONSUWAN, J., SRIWANAYOS, P., KONGKUMNERD, J., CHAWEEPCK, T., MAVICHAK, R., UNAJAK, S., NOZAKI, R., KONDO, H. & HIRONO, I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathology*, 49(4), 159–164. <https://doi.org/10.3147/jsfp.49.159>
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P. & VERSTRAE, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.64.4.655-671.2000>
- VICENTE, A., TAENGPHU, S., HUNG, A. L., MORA, C. M., DONGD, H. T. & SENAPIN, S. (2020). Detection of *Vibrio campbellii* and *V. parahaemolyticus* carrying full-length pirAB^{VP} but only *V. campbellii* produces Pir^{VP} toxins. *Aquaculture*, 519, 734708. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734708>
- WANG, D., LI, J., ZHU, G., ZHAO, K., JIANG, W., LI, H., WANG, W., KUMAR, V., DONG, S., ZHU, W. & TIAN, X. (2020). Mechanism of the Potential Therapeutic Candidate *Bacillus subtilis* BSXE-1601 Against Shrimp Pathogenic Vibrios and Multifunctional Metabolites Biosynthetic Capability of the Strain as Predicted by Genome Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581802>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO] & FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS [FAO]. (2001). *Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria* (FAO Food and Nutrition Paper 85). <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura del IMARPE por las facilidades brindadas y a las empresas langostineras que colaboraron con las muestras de langostinos.

Rol de los autores

Katherine Saavedra: Conceptualización, Metodología, Análisis formal, Redacción - borrador original, Redacción - revisión y edición. **Beder Ramírez:** Validación, Revisión y edición, Verificación del guion de análisis, Procesamiento histológico. **Mervin Guevara:** Revisión crítica, Redacción - revisión y edición, Análisis estadístico, Interpretación de resultados.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses relacionados con la presente investigación.

Declaración de uso de Inteligencia Artificial

Durante la preparación de esta investigación, se utilizó ChatGPT para verificar la gramática y la ortografía de la redacción. Después de utilizar esta herramienta, como autores editamos, revisamos y aprobamos el resultado final; asumiendo la total responsabilidad por el contenido de la publicación.

Fuentes de financiamiento

El presente estudio no contó con financiamiento externo específico. Fue desarrollado en el marco de las actividades de investigación del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).