

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Caracterización de actinomicetos de sedimento marino  
y su potencial actividad antagonista frente a *Vibrio sp.*  
aislados de *Litopenaeus vannamei***

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Ulrike Inge Tarazona Janampa

**ASESOR**

Jorge León Quispe

Lima - Perú

2017

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por toda su comprensión y por siempre brindarme todas las facilidades durante mi formación académica. A mi padre, por ser un gran ejemplo de investigador apasionado, a mi madre por comprender mis extensas horas en el laboratorio y por brindarme todo el apoyo para seguir avanzando a pesar de las adversidades que se presentaron, y a mi hermana, por sus consejos y por preocuparse porque siempre tome las mejores decisiones.

Al laboratorio de Ecología Microbiana, el cual fue mi segundo hogar durante la etapa universitaria. Al profesor Jorge León por darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo. Asimismo, a mis compañeros del laboratorio Juan José, Mirko, Nadia, Carolina, Astrid, Melisa, Junior, por todos los momentos compartidos durante estos 5 años en el laboratorio, aprendí mucho de ustedes, gracias por toda su ayuda.

A mis estimados profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, Susana Gutiérrez, Mónica Huamán, Fernando De la Cruz, Oswaldo Cornejo, Fernando Merino, por todo el apoyo y conocimientos brindados durante mi formación como microbióloga, y sobre todo por siempre tener tiempo para escucharme y aconsejarme durante la elaboración de este trabajo.

Al equipo del laboratorio de Investigación e investigación de Química Orgánica de la UNMSM, a cargo del Dr. Julio Santiago y sus colaboradores Marlene, Milan y Yuri, muchas gracias por todo el apoyo brindado, por las facilidades en cuanto al uso de equipos, y sobre todo por siempre tener la disponibilidad para ayudar.

Al Dr. Emilio Marguet y la Dra. Marisol Vallejo, y Romina, de la Universidad San Juan Bosco (Trelew, Argentina), por su apoyo en la identificación y secuenciamiento de las cepas y sobre todo por la hospitalidad brindada durante mi pasantía. Gracias por hacerme sentir como en casa.

A mis amigos. Manuel, Claudia Mateo., Claudia Avalos, Abigail, Jessica, Carmen, Paul, Joe, Jhonatan y Stefany, gracias por formar parte de esta bonita etapa universitaria y por su compañía en las buenas, en las malas y en las peores.

Al Dr. Pablo Ramírez, por su apoyo en el secuenciamiento de las cepas, al Dr. Wilbert Serrano por la ayuda brindada en el análisis del secuenciamiento y a la Dra. Sonia Valle, por todo su apoyo, consejos y amistad.

Finalmente gracias a todas las personas que siempre confiaron en mí y que participaron directa o indirectamente en la elaboración esta tesis.

## **ABREVIATURAS**

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Precisión (High performance liquid chromatography)

**ISP:** *International Streptomyces Project*

**MEB:** Microscopía Electrónica de Barrido

**mg.ml<sup>-1</sup>:** Miligramo por mililitro

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**TTC:** Trifenil tetrazolium

**WSSV:** Síndrome de la Mancha Blanca (*White Spot Syndrome Virus*)

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonia

**UPS:** Unidades Prácticas de Salinidad

## Tabla de Contenido

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
2.1	GENERALIDADES DEL LANGOSTINO BLANCO	5
2.2	GÉNERO <i>Vibrio</i>	7
2.3	VIBRIOSIS EN LA ACUICULTURA DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	8
2.3.1	SIGNOS CLÍNICOS	10
2.3.2	TRANSMISIÓN	11
2.3.3	TRATAMIENTO	11
2.4	ACTINOMICETOS	11
2.4.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES	11
2.4.2	TAXONOMÍA	15
2.4.3	ACTINOMICETOS DE ORIGEN MARINO	16
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
3.1	HIPÓTESIS	21
3.2	OBJETIVOS	21
3.2.1	OBJETIVO GENERAL	21
3.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	22
4.1.1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	22
4.1.2	CEPAS DE <i>Vibrio</i>	22
4.1.3	CEPAS DE ACTINOMICETOS	22
4.2	METODOLOGÍA	23
4.2.1	AISLAMIENTO DE <i>Vibrio</i> A PARTIR DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	23
4.2.2	PRUEBAS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>Vibrio</i>	
4.2.3	ANTIBIOGRAMA	23
4.2.4	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE ACTINOMICETOS	24
4.2.5	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA	26
4.2.6	PROCESO FERMENTATIVO PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS	27
4.2.7	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	27
4.2.8	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Vibrio</i> Y ACTINOMICETOS INHIBITORIOS	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
5.1	AISLAMIENTO DE <i>Vibrio</i> A PARTIR DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	31
5.2	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ACTINOMICETOS	37
5.3	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA	47

5.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	
	50	
5.5	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR LA CEPA M11-108 Y <i>Vibrio</i>	53
6	<i>DISCUSIÓN</i>	56
7	<i>CONCLUSIONES</i>	70
8	<i>RECOMENDACIONES</i>	71
9	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	72
10	<i>ANEXOS</i>	95

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Modificado de Rosenberry, 2009).	6
<b>Figura 2.</b> Producción mundial de la acuicultura (a partir de 1950) (FAO Fishery Statistic, 2011).	9
<b>Figura 3.</b> Cultivo de actinomicetos en agar glicerol asparagina (Tomado de Sirisha <i>et al.</i> , 2013).	13
<b>Figura 4.</b> Morfología de algunos actinomicetos aislados de sedimento marino (Tomado de Gebreyohannes <i>et al.</i> , 2013).	13
<b>Figura 5.</b> Morfología común de una colonia de actinomiceto en medio sólido. A: Micelio aéreo. B: Micelio del sustrato (Tomado de Li <i>et al.</i> , 2016).	14
<b>Figura 6.</b> Nuevas familias, géneros y cepas de Actinomicetos reportados en hábitats marinos entre 2007 y mediados del 2013 (Tomado de Subramani y Aalbersberg, 2013).	19
<b>Figura 7.</b> Colonias presuntivas del género <i>Vibrio</i> en agar TCBS aisladas partir de langostinos. A: cepa V3L; B: cepa V8P3.	32
<b>Figura 8.</b> Batería bioquímica aplicada para la identificación del género <i>Vibrio</i> de la cepa V5P3. Cit: Citrato, H-L: Prueba de óxido Fermentación de Hugh y Leifson, DEX: Dextrosa y MAN: Manosa.	32
<b>Figura 9.</b> Comportamiento de la cepa V3L de <i>Vibrio</i> a distintas concentraciones de NaCl.	34
<b>Figura 10.</b> Prueba de sensibilidad antimicrobiana de la cepa V3L (método de difusión en agar) frente a antibióticos convencionales.	35
<b>Figura 11.</b> Crecimiento de las cepas M11-108 y M10-77 de actinomicetos en los medios ISP, luego de una incubación de 20 días a 28°C.	41
<b>Figura 12.</b> Frecuencia de la actividad multienzimática de cepas de actinomicetos.	42
<b>Figura 13.</b> Pruebas de actividad enzimática de los actinomicetos frente a diferentes sustratos. (A): agar marino + yema de huevo, (B): agar marino + Tween 80 y (C): agar marino + almidón.	44
<b>Figura 14.</b> Observaciones microscópicas. (A) Coloración Gram a partir de un cultivo de 5 días; (B) Microcultivo luego de 7 días de incubación de la Cepa M11-116d.	45
<b>Figura 15.</b> Observaciones microscópicas. (A) Microcultivo de 7 días de la cepa M11-108, se observan a detalle las esporas e hifas delgadas. (B) Coloración Gram de la cepa M11-108 a partir de un cultivo de 7 días.	45
<b>Figura 16.</b> Microfotografía de la cepa M11-116d(B) obtenida de un cultivo en caldo marino.	46

<b>Figura 17.</b> Microfotografía de la cepa M11-108 obtenida de un microcultivo en agar marino.	46
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de actinomicetos antagonistas frente a cepas de <i>Vibrio</i> .	48
<b>Figura 19.</b> Frecuencia de la actividad antagonista de actinomicetos frente a las cepas de <i>Vibrio</i> .	48
<b>Figura 20.</b> Frecuencia de halos de inhibición (en mm de diámetro) de los actinomicetos frente a las cepas del género <i>Vibrio</i> .	49
<b>Figura 21.</b> Antagonismo de las cepas M11-108 y I1334C frente a <i>Vibrio</i> cepa V5P3, mediante la técnica de la “doble capa”.	49
<b>Figura 22.</b> Antagonismo de las cepas: (A) M11-116d(B) y (B) M11-108 frente a <i>Vibrio</i> cepa V3L (Método de la “doble capa”).	50
<b>Figura 23.</b> Cultivos de fermentación de la cepa M11-108 en agitación por 7 días.	51
<b>Figura 24.</b> Sobrenadante de los cultivos de la cepa M11-108, con los solventes orgánicos: Cloroformo (A), butanol (B) y diclorometano (C).	51
<b>Figura 25.</b> Prueba de CMI del extracto clorofórmico de la cepa M11-108 usando cloruro de trifeníl tetrazolium (TTC) como revelador. CP: control de crecimiento del <i>Vibrio</i> , CI: control de inhibición del <i>Vibrio</i> .	53
<b>Figura 26.</b> Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de la subunidad 16S rRNA de un cultivo puro de la cepa M11-108.	54
<b>Figura 27.</b> Árbol filogenético con base en la secuencia parcial de la subunidad 16S rRNA de cultivos puros de las cepas de <i>Vibrio</i> V8P2, V5P3 y V3L (Se observan en negrita). El árbol se construyó usando como base las secuencias de <i>Vibrio porteresiae</i> y <i>Vibrio cholerae</i> .	55



<b>Tabla 1.</b> Nuevos metabolitos producidos por actinomicetos marinos, periodo 2005-2010 (Tomado de Subramani y Aalbersberg, 2012).	20
<b>Tabla 2.</b> Caracterización fenotípica de cepas seleccionadas de <i>Vibrio</i> en el agar TCBS.	31
<b>Tabla 3.</b> Pruebas bioquímicas de las cepas presuntivas del género <i>Vibrio</i> aisladas de langostinos.	33
<b>Tabla 4.</b> Cepas seleccionadas como presuntivas del género <i>Vibrio</i> en diferentes concentraciones de NaCl.	34
<b>Tabla 5.</b> Antibiograma de las cepas del género <i>Vibrio</i> aisladas de langostinos con signos de vibriosis (Halos de inhibición en mm).	36
<b>Tabla 6.</b> Caracterización fenotípica de las 25 cepas de actinomicetos marinos utilizados en el presente estudio.	38
<b>Tabla 7.</b> Caracterización fenotípica en medios estándar ISP de 6 cepas seleccionadas de actinomicetos utilizados en el presente estudio.	40
<b>Tabla 8.</b> Actividad enzimática extra e intracelular de las 25 cepas de actinomicetos frente a distintos sustratos.	43
<b>Tabla 9.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los 3 extractos de la cepa M11-108 frente a <i>Vibrio</i> spp.	52
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la identificación de las cepas aisladas de <i>L. vannamei</i> .	54

## RESUMEN

Las expectativas futuras de utilizar bacterias marinas han permitido la búsqueda de microorganismos novedosos con capacidad de producir compuestos bioactivos como métodos alternativos en el desarrollo de técnicas terapéuticas para impedir patologías en acuicultura. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la actividad antagonista de una colección de 25 actinomicetos de origen marino. La actividad inhibitoria se determinó mediante pruebas *in vitro* sobre cepas de *Vibrio* aislados de *Litopenaeus vannamei* ("Langostino Blanco"). Los actinomicetos fueron caracterizados por su crecimiento en Agar Marino y su actividad enzimática extracelular sobre diferentes sustratos. Los actinomicetos antagonistas resultantes fueron caracterizados en medios ISP y la cepa M11-108 fue seleccionada para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y observaciones en Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Asimismo, se aislaron cepas de *Vibrio*, las que fueron evaluadas e identificadas mediante técnicas convencionales y confirmadas por PCR. Los resultados indican que el 56 % (14/25) de actinomicetos evaluados tiene actividad anti-*Vibrio*, siendo la cepa M11-108 la que produjo los halos de mayor tamaño. La totalidad muestra actividad multienzimática extracelular, predominando las cepas que hidrolizan almidón (80%). Se logró aislar y caracterizar 7 cepas de *Vibrio*. La CMI del extracto diclorometánico de la cepa M11-108 frente a los *Vibrio* silvestres alcanzaron valores entre 1,5 a 3,0 mg.ml<sup>-1</sup>. La evaluación filogenética de la cepa M11-108 indica que presuntivamente se trataría del género *Alcanivorax* del filo proteobacterias. Por su parte, entre los *Vibrio* fueron identificados *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. diabolicus*. Los actinomicetos marinos puedan tener aplicaciones biotecnológicas en acuicultura, en especial como agentes probióticos en la producción de semillas larvianas de langostinos y como biorremediantes en los "hatcheries" contaminados por materia orgánica.

**Palabras clave:** probióticos; antagonistas; acuicultura, *Vibrio*, "langostino blanco".

## ABSTRACT

Future expectations to use marine bacteria have allowed the search for novel microorganisms capable of producing bioactive compounds as alternative methods for the development of therapeutic techniques to prevent pathologies. The main objective of this study was to evaluate the antagonist activity of a collection of 25 actinomycetes from marine origin. The inhibitory activity was determined by *in vitro* tests on *Vibrio* strains isolated from *Litopenaeus vannamei* (White shrimp). Actinomycetes were characterized by their growth on marine agar and their extracellular enzymatic activity on different substrates. The resulting actinomycetes antagonists were characterized in ISP media and M11-108 strain was selected to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and observations in Scanning Electron Microscopy (SEM). Also, *Vibrio* strains were isolated, which were evaluated and identified by conventional techniques and confirmed by PCR. The results indicate that 56% (14/25) of tested actinomycetes has anti-*Vibrio* activity, being the M11-108 strain that produced larger haloes. All shows extracellular multi-enzyme activity, predominantly the strains that hydrolyze starch (80%). It was possible to isolate and characterize 7 strains of *Vibrio*. The MIC of dichloromethane extracts of M11-108 strain against wild *Vibrio* reached values between 1.5 to 3.0 mg.ml<sup>-1</sup>. Phylogenetic assessment indicates that presumptively M11-108 strain would be the genus of *Alcanivorax* of Proteobacteria fila. Meanwhile, among *Vibrio* were identified as *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. diabolicus*. Marine actinomycetes may have biotechnology applications in aquaculture, especially as probiotic and biorremediation agents in the production of larval shrimp seeds in "hatcheries" contaminated by organic matter.

**Keywords:** Probiotics; antagonists; aquaculture, *Vibrio*, "White Shrimp".

## 1 INTRODUCCIÓN

El mar es una inmensa fuente de sustancias biológicamente activas y potencialmente útiles, prácticamente sin explorar (Subramani y Aalbersberg, 2013). Dado el hecho de que los océanos cubren más de 70 % de la superficie de la Tierra, son una fuente promisoría de nuevos compuestos farmacológicamente activos (Manivasagan *et al.*, 2013). Aunque los macroorganismos del océano han demostrado ser una buena fuente de metabolitos bioactivos, los microorganismos tales como bacterias y hongos han demostrado ser una excelente fuente de nuevos compuestos antibacterianos, antifúngicos, sustancias antivirales y antitumorales (Thenmozhi y Kannabiran, 2011) y en particular se ha sugerido el uso de bacterias para combatir las epizootias en la acuicultura (Pandiyan *et al.*, 2013).

La acuicultura, posiblemente sea el sector de producción de alimentos de crecimiento más acelerado, hoy representa casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación (Das *et al.*, 2008). Actualmente, este sector representa una de las fuentes de proteína animal muy valorada por el sabor y calidad de sus productos (FAO, 2016). El desarrollo de la acuicultura en el Perú es de carácter incipiente y está orientada fundamentalmente a la producción del “langostino blanco” (*Litopenaeus vannamei*), “concha de abanico” (*Argopecten purpuratus*), “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*), “tilapia” (*Oreochromis niloticus*) y algunos peces amazónicos (FAO, 2015).

*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) “langostino blanco”, es una de las especies más importantes en la actividad acuícola, representando más de un tercio de la producción mundial de langostinos (FAO, 2016). El cultivo intensivo de esta especie crea condiciones artificiales en el ambiente que favorecen la selección, adaptación y crecimiento de comunidades bacterianas que son parte de la flora normal de los organismos acuáticos. Estas comunidades no representan un riesgo para los

organismos a menos que estos se encuentren estresados, débiles o inmunodeprimidos (Wang y Leung, 2000). En los últimos años, han surgido una serie de problemas como por ejemplo, enfermedades infecciosas y el deterioro de las condiciones ambientales (Shariff *et al.*, 2001), que afectan severamente a la producción (Shen *et al.*, 2010). Después de las enfermedades infecciosas causadas por virus, la bacteriosis constituye el principal factor de mortalidad de langostinos, en particular durante las etapas de cultivo larvario.

En el departamento de Tumbes – Perú, existen empresas dedicadas a la producción de *L. vannamei* los cuales son cultivados en pozas. En dichos cultivos se han detectado la presencia de miembros de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Flavobacterium* y otros, que tienen el potencial de comportarse como patógenos ocasionales, causando mortalidad en la población de los langostinos (Balcázar *et al.*, 2006). Por otro lado, los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*, componen hasta el 85% de la flora bacteriana en el intestino de langostinos (Leyton y Riquelme, 2008); sin embargo, especies de estos dos géneros son considerados como los patógenos infecciosos más comunes y significativos (Liu *et al.*, 2014).

En el caso de los crustáceos como el langostino, tanto de vida libre como de cultivo, se han reportado en el intestino, agua y sedimento de su entorno una diversidad de especies como: *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*; *Aeromonas veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. schubertii*, las cuales son de importancia sanitaria para los peces y humanos (Álvarez *et al.*, 2000).

Debido a la demanda de la producción intensiva de organismos acuáticos bajo condiciones controladas, la acuicultura moderna ha desarrollado una serie de técnicas eficaces para combatir estas infecciones, a pesar de ello, han ido apareciendo problemas severos de enfermedades, especialmente relacionadas al género *Vibrio* (Ronsón-Paulín y Medina-Reyna 2002). Entre las estrategias propuestas, por ejemplo, se ha sugerido la interrupción del *Quórum Sensing* (QS) como una estrategia

antibacteriana (Defoirdt *et al.*, 2004); también se están desarrollando vacunas para controlar la vibriosis, pero por lo general no son usadas como una medida de control en las diversas enfermedades que afectan la acuicultura debido a las limitaciones prácticas y los altos costos que presentan (Heppell y Davis 2000).

Por otro lado, el uso rutinario de antibióticos durante la fase larvaria no es aconsejable ya que aumenta el riesgo de promover la resistencia al antibiótico y acumulación residual (Jiang *et al.*, 2013) y, a la vez influir adversamente en la microflora autóctona, al medio ambiente y salud humana (You *et al.*, 2005). Por lo cual, el desarrollo de estrategias alternativas para el uso de antimicrobianos en el control de las enfermedades es urgente. Asimismo, las expectativas futuras de utilizar bacterias marinas con fines benéficos en la sanidad acuícola han conducido a los investigadores a buscar alternativas en el desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para reducir o impedir patologías en la acuicultura (Chau *et al.*, 2011).

El empleo de probióticos ha demostrado ventajas en la producción controlada de organismos acuáticos en especial en las etapas de su desarrollo larval y juvenil; por lo que la búsqueda de nuevos probióticos más eficaces sería un recurso potencial en la acuicultura. Los probióticos pueden ser aplicados en el alimento o añadirse al tanque de cultivo o estanque como agentes preventivos contra la infección por patógenos. Actualmente, probióticos a base de *Lactobacillus* spp. y *Bacillus* spp. son utilizados en cultivos de langostinos y proceden de organismos terrestres (Nimrat *et al.*, 2012); así como ciertas cepas de *Vibrio* y *Pseudomonas* no patógenas (Verschuere *et al.*, 2000); sin embargo, pocos estudios han reportado actinomicetos como posibles probióticos (Chau *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2010, 2008).

Los actinomicetos marinos conforman un grupo bacteriano diverso con capacidades metabólicas y fisiológicas únicas que les permite no sólo sobrevivir en condiciones

extremas, sino también producir compuestos con actividades farmacológicas nunca antes vistas en microorganismos terrestres (Olano *et al.*, 2009).

Recientemente, los mecanismos de probióticos están siendo estudiados y reportados por muchas personas (Jiang *et al.*, 2013). Por lo cual, estos hechos ameritan la importancia en el estudio, búsqueda, selección y evaluación de cepas nativas de bacterias que posean un potencial probiótico para ser utilizadas como alternativa en el control y tratamiento de infecciones larvales por bacterias patógenas.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DEL LANGOSTINO BLANCO

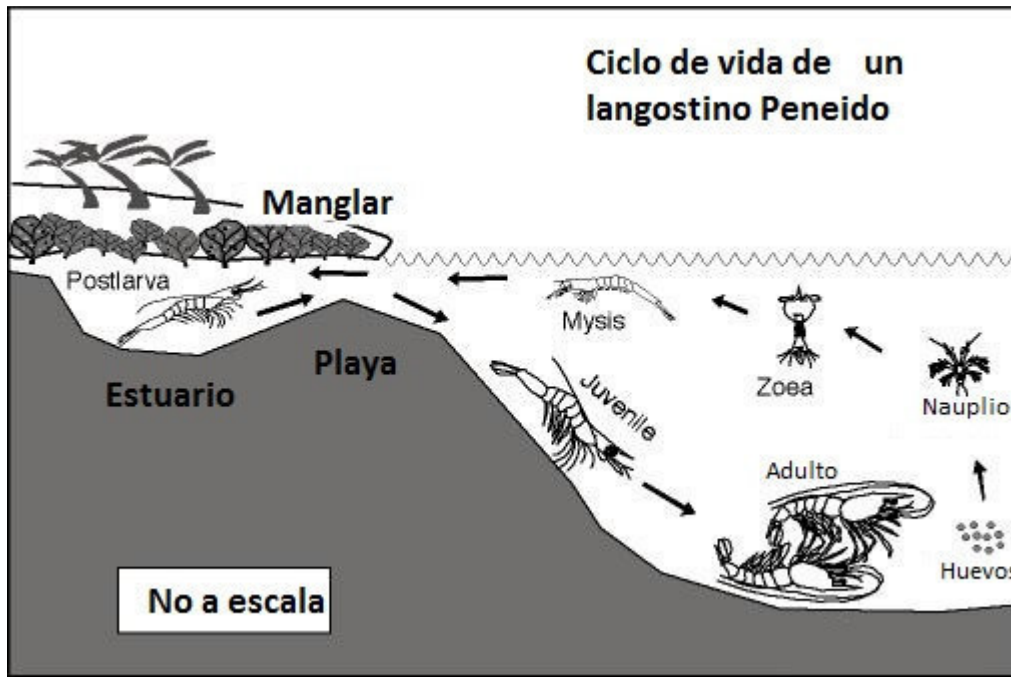
*Litopenaeus vannamei* es un Crustáceo Decápodo Macruro nadador, de mediano tamaño, comestible, apreciado y comercializado en nuestros mercados. El “langostino blanco” es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año (FAO, 2016).

El ciclo de vida del langostino (**Figura 1**) se inicia con el desove de la hembra en el mar, el cual ocurre generalmente durante la noche, posterior al depósito del paquete de espermatozoides del macho. Cada hembra adulta puede liberar entre 100000 y 250000 huevos aproximadamente (FAO 2016), los cuales eclosionan a las 12–15 h post-cópula (Carvajal, 1999).

El estadio larval consta de 11 etapas: 5 estadios de nauplio, 3 de protozoa y 3 de mysis, los cuales pueden diferenciarse en función al tipo de nado que realizan, como es el nado intermitente, hacia adelante o mediante contracciones abdominales, los cuales son característicos de los estadios nauplio, protozoa y mysis respectivamente (Edemar *et al.*, 1996).

Al desarrollarse la postlarva, esta se asemeja a un langostino adulto y además dejan de formar parte del bentos e ingresan a los estuarios, donde encontrarán mejores condiciones físicas para su desarrollo y mayor disponibilidad de nutrientes. Cuando alcanzan el estadio juvenil estos comienzan a acercarse poco a poco al mar abierto, para completar ahí su madurez sexual y alcanzar los lugares de reproducción, los cuales se encuentran alejados de la costa a profundidades de 12 a 18 metros. Los langostinos completan su desarrollo a los 12 meses aproximadamente, y pueden llegar a vivir hasta dos años (Morales, 1990).





**Figura 1.** Ciclo de vida de *Litopenaeus vannamei* (Modificado de Rosenberry, 2009).

La clasificación taxonómica del langostino obedece al siguiente formato (Integrated Taxonomic Information System):

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea: **Brünnich, 1772**

Clase Malacostraca: **Latreille, 1802**

Subclase Eumalacostraca: **Grobben, 1892**

Superorden Eucarida: **Calman, 1904**

Orden Decapoda: **Latreille, 1802**

Suborden Dendrobranchiata: **Bate, 1888**

Superfamilia Penaeoidea: **Rafinesque, 1815**

Familia Penaeidae: **Rafinesque, 1815**

Subfamilia Penaeinae: **Dana, 1852**

Género *Litopenaeus*: **Pérez-Farfante 1962**

Especie *Litopenaeus vannamei*: **Boone, 1931**

## 2.2 GÉNERO *Vibrio*

El género *Vibrio* fue uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descritos taxonómicamente en la naturaleza (Pacini, 1854). Se encuentran dentro de la familia Vibrionaceae abarcando diversos grupos de bacterias marinas heterótrofas; son gama proteo bacterias, Gram negativas, oxidasa positivos, mesófilos, generalmente móviles por medio de un simple flagelo polar (Thompson *et al.*, 2004). Toleran un amplio rango de salinidades, siendo el óptimo requerimiento de NaCl de ~ 2,0 a 2,5% (peso/volumen). Algunas especies halófilas requieren al menos una concentración del 0,5% de NaCl en el medio para crecer, mientras que especies no halófilas como *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* o *Vibrio hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (Gomez-Gil *et al.*, 2004).

Naturalmente habitan ambientes marinos y de agua dulce en formas de vida planctónica en la columna de agua (Worden *et al.*, 2006), bentónica desarrollando biopelículas en sedimentos, zooplancton (Heidelberg *et al.*, 2002) y, en el tracto gastrointestinal de organismos marinos (Watnick *et al.*, 2001). Diversos estudios han demostrado que el género *Vibrio* se encuentran en altas densidades en el ecosistema marino y han sido extensamente estudiados en los sistemas costeros por su importancia medioambiental e incidencia en la extracción de moluscos (Thompson y Polz, 2006).

A pesar de las adversidades a las que se ven expuestos estos microorganismos al formar parte del tracto digestivo de organismos marinos, como por ejemplo, pH bajo, secreción de ácido bílico, condiciones de microaerofilia o anaerobiosis; estos van a poseer una mayor disponibilidad de materia orgánica que en el agua de mar, llegando

a ser un hábitat apropiado para el desarrollo de estos microorganismos (Urakawa y Rivera, 2006).

La familia *Vibrionaceae*, al ser un grupo bastante heterogéneo, ha sido modificada en diversas oportunidades. En la última versión del manual de Bergeys (2005), consideran 3 géneros dentro de esta familia: *Vibrio* (44 especies), *Photobacterium* (6 especies) y *Salinivibrio* (1 especie); mientras que Gomez-Gil *et al.* (2014) presentan 6 géneros: *Vibrio*, (género tipo), *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia* y *Aliivibrio*; reportándose 131 especies.

La clasificación taxonómica de los vibriones obedece al siguiente formato:

Dominio bacteria: **Woese**

Filo Proteobacteria: **Stackebrandt *et al.*, 1988**

Clase Gammaproteobacteria: **Garrity *et al.*, 2005**

Orden Vibrionales: **<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>**

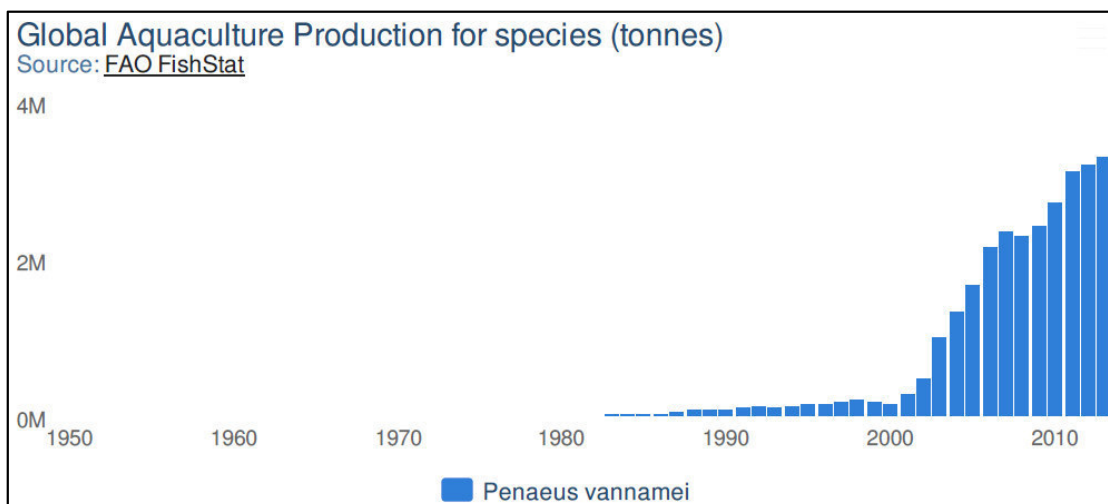
Familia Vibrionaceae: **Verón, 1965**

Género *Vibrio*: **Pacini, 1854**

## 2.3 VIBRIOSIS EN LA ACUICULTURA DE *Litopenaeus vannamei*

### 2.3.1 Estado actual de la acuicultura de *Litopenaeus vannamei*

Las estadísticas de FAO (2016) indican que el total de la producción de granjas de *L. vannamei* se incrementó constantemente de 8000 toneladas en 1980 a 194 000 toneladas en 1998. Tras un pequeño declive en 1999 y otro más significativo en el año 2000 debido a la irrupción de la enfermedad de la “Mancha Blanca” (WSSV) en América Latina, las estadísticas de FAO indican un rápido crecimiento de la producción a más de 1 386 000 toneladas en 2004, gracias a la rápida dispersión de esta especie en Asia (**Figura 2**).



**Figura 2.** Producción mundial de la acuicultura (a partir de 1950) (FAO Fishery Statistic, 2011).

En los últimos años, la industria del “langostino blanco” (*L. vannamei*) ha enfrentado muchos brotes graves de enfermedades bacterianas y virales, resultando en pérdidas de más de mil millones de dólares (Lightner, 2011; Flegel, 2012). Por lo tanto son urgentes las medidas preventivas para minimizar riesgos de estas enfermedades, ya que hasta el momento, no existe un tratamiento eficaz disponible. La alta incidencia de las patologías bacterianas ocasionadas por *Vibrio* sp. ha ocasionado mortalidades de hasta el 100% de las producciones afectadas (Peña-Navarro y Varela Mejías 2015; Ganesh *et al.*, 2010), por lo cual, los antibióticos han sido utilizados terapéuticamente en el cultivo de langostino para prevenir y reducir estos brotes (Defoirdt *et al.*, 2011). Sin embargo, el mal uso de los antibióticos puede conducir a patógenos resistentes en las especies cultivadas (Hoa *et al.*, 2011).

Las infecciones relacionadas con el género *Vibrio* frecuentemente se dan en los *hatcheries* (laboratorios de producción de larvas), así como también en los estanques de crianza de langostinos adultos, donde estas bacterias suelen ser toleradas a concentraciones bajas en la sangre de langostinos, en el agua y sedimentos (Sizemore y Davis, 1985; Lovett y Felder, 1990).

Los estadios larvarios de las especies: *Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, y *L. vannamei*, criados en cultivos, son frecuentemente afectados por infecciones de *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, y *V. parahaemolyticus*. Asimismo, los especímenes juveniles y adultos son afectados por *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus*, y *V. vulnificus* (Austin, 2008; Mohajeri *et al.*, 2011); sin embargo, muchos reportes consideran al género *Vibrio* como un patógeno oportunista, es decir solo podría afectar la mortalidad de los individuos bajo condiciones de estrés como: alta densidad de población, alta temperatura del agua, baja concentración del oxígeno disuelto e inapropiado recambio de agua (Rao, 2008; Mohajeri *et al.*, 2011); por lo tanto, estos microorganismos forman parte de la microbiota normal del agua y los animales (Zheng *et al.*, 2016; Ganesh *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012).

### **2.3.2 Signos clínicos de vibriosis en *Litopenaeus vannamei***

La vibriosis en *L. vannamei* se caracteriza por presentar manchas rojas en la zona abdominal, así como también se pueden observar opacidad del musculo abdominal, necrosis en los apéndices, septicemia, hipoxia, anorexia, debilidad, malformaciones, nado letárgico en los bordes y/o superficie de los estanques y muerte (Soto *et al.*, 2010).

El síndrome de las patas rojas es uno de los recurrentes en los cultivos de langostinos, el cual es ocasionado por *Vibrio harveyi*, desarrollándose los primeros signos siempre y cuando se encuentren en una dosis de  $10^5$  a  $10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Este síndrome se caracteriza por presentar coloración roja de los pleópodos, períopodos y branquias, en langostinos juveniles y adultos (Aguirre-Guzman *et al.*, 2013). Asimismo, *V. harveyi* es la principal causante de vibriosis luminiscente, el cual es visible durante la noche, en las postlarvas, juveniles y adultos infectados (Suárez, 2008).

### **2.3.3 Transmisión**

El género *Vibrio* forma parte de la microbiota habitual del agua de los tanques de cultivo, también se les puede encontrar formando biopelículas en distintas estructuras que están en contacto con el agua (Rao, 2008). La principal vía de ingreso, se da a consecuencia un cambio brusco en los factores ambientales, lo cual desencadena la multiplicación de las bacterias, las cuales logran penetrar las barreras físicas (exoesqueleto) del langostino. Particularmente, *Vibrio* sp. ha sido reportado como causante de lesiones a nivel de la quitina, logrando ingresar al hospedero a través de estas heridas (Cook *et al.*, 1973, Alday-Sanz *et al.*, 2002). Asimismo, las branquias, al presentar un exoesqueleto bastante delgado y, los intestinos anteriores y posteriores, al no estar revestidos por un exoesqueleto, son otra de las vías de ingreso más frecuentes al huésped (Bauer, 1998).

### **2.3.4 Tratamiento**

La sanidad y una buena gestión del agua son factores determinantes para controlar la entrada de *Vibrio* en el agua de cultivo y, mediante la reducción del estrés entre los langostinos (Baticados *et al.*, 1990).

En los últimos años el uso de los antibióticos en acuicultura ha incrementado la resistencia bacteriana. Asimismo, al ser aplicados a través de alimentos en los tanques de cultivo de los langostinos, no logran ser consumidos totalmente, por lo cual terminan acumulándose en el sedimento en forma de residuos (Suárez, 2008).

## **2.4 ACTINOMICETOS**

### **2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES**

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ambientes terrestres, de agua dulce y marinos (Augustine *et al.*, 2013). Cumplen un rol ecológico fundamental como agentes de la recirculación de nutrientes, representando entre el 20 – 60% de la población microbiana total del suelo (Jiménez, 2011). Los suelos

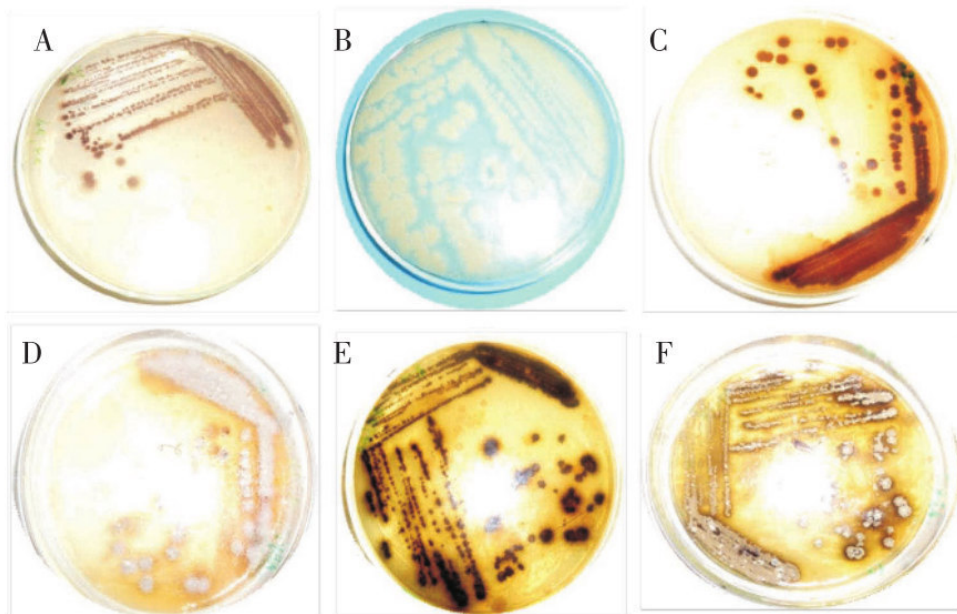
y sedimentos son ambientes propicios para la colonización de estas bacterias, cuyas esporas al encontrar condiciones favorables de temperatura, nutrientes y humedad, van a lograr desarrollarse en hifas vegetativas (De Lima *et al.*, 2012).

La amplia producción de enzimas extracelulares hidrolíticas producidas por los actinomicetos, particularmente en ambientes acuáticos, es el mecanismo primordial para la descomposición de nitrógeno y carbono (Augustine *et al.*, 2013). Asimismo, son conocidos por ser una fuente prolífica de metabolitos secundarios, los cuales en muchos casos presentan una gran diversidad química, que es fundamental para el mantenimiento, señalización y colonización del hábitat microbiano (Jiménez, 2011).

Macroscópicamente, las colonias en medios sólidos se comienzan a ver a los 3 ó 4 días de incubación fuertemente adheridas al sustrato. Entre los 7 a 14 días, a medida que se van agotando algunos de los nutrientes, comienza a desarrollarse el micelio aéreo produciéndose la esporulación. Esta etapa está estrechamente relacionada con la producción de metabolitos secundarios (Jiménez, 2011), y es aquí donde comienzan a observarse colonias de aspecto seco, costrosas y pulverulentas, las cuales pueden presentar de diferentes colores (**Figura 3 y 4**). En el caso de medios líquidos predomina la formación un sedimento de aspecto algodonoso, notándose el medio de cultivo transparente (Franco Correa, 2008; Prada, 2013).



**Figura 3.** Cultivo de actinomicetos en Agar Glicerol Asparagina (Tomado de Sirisha *et al.*, 2013).

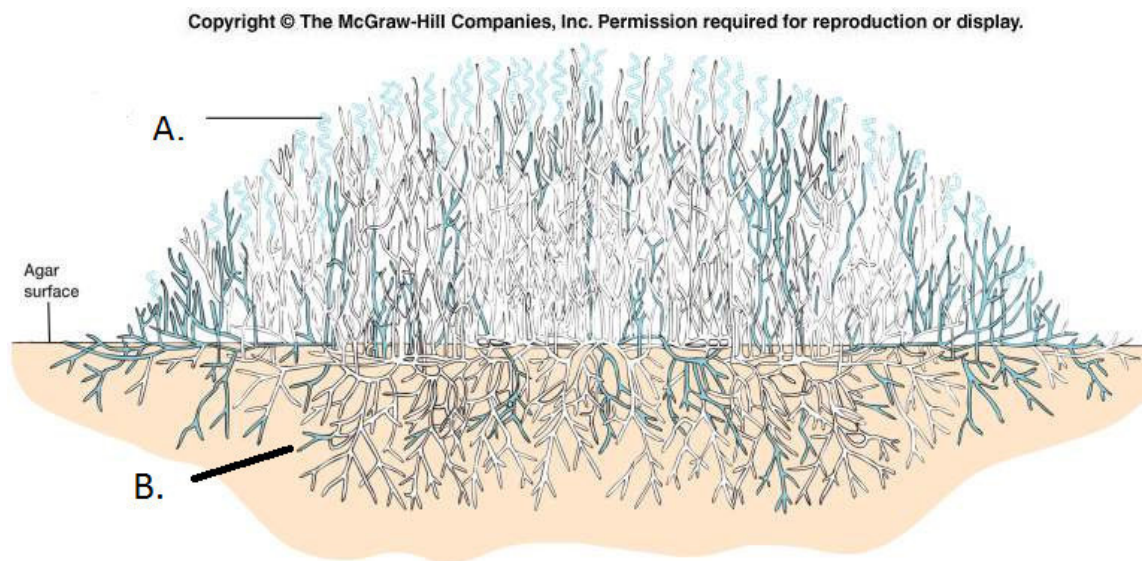


**Figura 4.** Morfología de algunos actinomicetos aislados de sedimento marino (Tomado de Gebreyohannes *et al.*, 2013).

Son microorganismos Gram positivos, presentan largas hifas filamentosas (entre 0,5 y 2,0  $\mu\text{m}$ ), de diámetro menor al de los hongos, crecen en forma de red llamadas micelios, que pueden ser de dos tipos: micelio vegetativo y micelio aéreo (Jiménez, 2011), tal



como se observa en la **Figura 5**. La escasez de algunos nutrientes y señales de densidad poblacional va a desencadenar el desarrollo del micelio aéreo y posteriormente, de las esporas por la formación de tabiques en la punta de los filamentos (Prada, 2013). Otra de las características bastante peculiares de estas bacterias es su alto contenido de guanina y citosina (G+C) en su ADN, encontrándose en el rango de 51 a 78%, siendo así la bacteria con el más alto porcentaje (Becerril, 2011).



**Figura 5.** Morfología común de una colonia de actinomiceto en medio sólido. A: Micelio aéreo. B: Micelio del sustrato (Tomado de Li *et al.*, 2016).

Los requerimientos de oxígeno de los actinomicetos pueden ser diversos, siendo la mayoría aerobios, también se pueden encontrar algunas especies microaerófilas o anaerobia facultativas. Son principalmente mesófilos, estableciendo su temperatura óptima entre 22°C a 30°C, sin embargo se han reportado géneros como *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp. y *Thermoactinomyces* sp., que se desarrollan a temperaturas entre 55 y 66°C. El pH óptimo para su desarrollo se encuentra entre 6,5 y 8,0, siendo principalmente alcalinos y presentan intolerancia a los ambientes ácidos (Prada, 2013; Jiménez, 2011).

Estas bacterias al ser heterótrofas logran utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos; utilizan como fuente de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y proteínas (Jiménez, 2011).

El suelo representa uno de los hábitats ecológicos con mayor número de aislamientos reportados de actinomicetos (Subramani y Aalbersberg 2013), por lo cual es bastante común reconocer el olor de suelo húmedo producido por estas bacterias debido a la producción de un metabolito llamado geosmina (1,10-dimetil-9-decalol), un terpenoide aromático (Prada, 2013). Asimismo, son saprófitos de plantas; también producen sideróforos, ácido indol acético y son capaces de solubilizar fosfatos, por lo cual se les considera promotores de crecimiento vegetal (Otero Jiménez, 2011).

Algunos autores relacionan la amplia adaptación del Phylum Actinobacteria a las diversas condiciones ambientales y hospederos, justificando que el surgimiento de este Phylum hace 500 - 600 millones de años, coincidiría con el aumento de los niveles de oxígeno en la atmósfera, hasta la concentración en la que se encuentra actualmente, lo cual en paralelo permitió el desarrollo de los primeros eucariontes (Stackebrandt, 1991; Embley y Stackebrandt, 1994).

#### **2.4.2 TAXONOMÍA**

Anteriormente la clasificación de los actinomicetos estaba basada en caracteres morfológicos, por lo cual fueron incluidos entre los hongos, siendo clasificados como “hongos radiados”, debido a que presentaban un micelio verdadero. En la actualidad los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio Bacteria debido a que presentan propiedades relativas a este, sin embargo se realiza un estudio polifásico, que incluyen caracteres fenotípicos, genotípicos, fisiológicos, quimiotaxonómicos, técnicas cromatográficas, microscopía electrónica, entre otros, para llevar a cabo una correcta identificación hasta el nivel de especie (Prada, 2013).

Actualmente, la clasificación del phylum Actinobacteria sugerida en el Manual de Bergey's de Sistemática Bacteriológica ha eliminado los rangos taxonómicos de subclases y subordenes, reconociendo únicamente los rangos de clases y órdenes. Por lo tanto, el nivel más de este phylum está dividido en seis clases: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* y *Thermoleophilia* (Gao y Gupta, 2012).

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales (Buchanan, 1974)

### **2.4.3 ACTINOMICETOS DE ORIGEN MARINO**

Durante muchos años, la bioprospección de nuevos metabolitos secundarios se han centrado en el medio terrestre, siendo el medio marino relegado en gran medida (Subramani y Aalbersberg 2013). Hoy en día los investigadores tienen la hipótesis de que, dado que las condiciones del ecosistema marino y terrestre son muy diferentes, los microorganismos en el medio marino deben poseer características diferentes a sus homólogos terrestres y por lo tanto tendrían la tendencia a producir diferentes compuestos bioactivos (Imada *et al.*, 2007; Valli *et al.*, 2012).

Más de dos tercios de los antibióticos aislados a partir de bacterias y hongos fueron producidos por actinomicetos: incluyendo aminoglucósidos, antraciclinas, glicopéptidos, betalactámicos, macrólidos, nucleósidos, péptidos, polienos, poliéteres, terpenos y tetraciclina (Challis y Hopwood, 2003). Como resultado, la investigación en las últimas décadas se ha ido expandiendo en el estudio de actinomicetos marinos, los cuales ha resultado ser de creciente importancia biotecnológica debido a su amplia capacidad metabólica, incluyendo la producción de enzimas industrialmente aplicables (Ramesh *et al.*, 2009; Zhang y Kim, 2010) y de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente únicos (Lam, 2006; Fenical y Jensen, 2006; Prudhomme *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006).

El grupo de los Actinomicetales está ampliamente distribuido en todo el océano, y pueden encontrarse en zonas intermareales, agua de mar, animales y en los sedimentos oceánicos (Subramani y Aalbersberg, 2012). Al igual que sus homólogos terrestres, están demostrando ser una lucrativa fuente de moléculas bioactivas con aplicaciones farmacéuticas potenciales (Mayer *et al.*, 2010). Muchos reportes sugieren que los sedimentos marinos son una fuente rica de actinomicetos por lo cual muchos investigadores centran la búsqueda de nuevos antibióticos en hábitats prístinos (Fenical y Jensen, 2006). En la India, alrededor de 1000 productos naturales derivan de microorganismos marinos (Meena *et al.*, 2013), siendo los actinomicetos marinos considerados como los procariontes económica y biotecnológicamente más valiosos.

En la actualidad existen diversos compuestos bioactivos descubiertos a partir de actinomicetos de origen marino, por ejemplo rifamicina de *Micromonospora* (Huang *et al.*, 2008); los nuevos policétidos Salinipyrone A y B, de *Salinispora pacifica* (Oh *et al.* 2008); Salinosporamida-A, un metabolito anticáncer aislado a partir de *Salinispora tropica* (Feling *et al.*, 2003); Marinomicinas de *Marinophilus* sp. (Jensen *et al.*, 2005); Abyssomicin-C de *Verrucosispora* sp. (Riedlinger *et al.*, 2004); Marinopirroles de *Streptomyces* sp (Hughes *et al.*, 2008); Linamicinas A–E, un potente antimicrobiano de amplio espectro, especialmente frente a *Staphylococcus aureus* MRSA y *Enterococcus faecium* resistentes a la Vancomicina (Mc Arthur *et al.*, 2008) (**Tabla 1**).

**El rol de los actinomicetos en medio marino:** Los actinomicetos presentan un rol importante en el medio marino, aparte de la producción de antibióticos, siendo considerados por algunos autores como parte de la microbiota marina nativa (Moran *et al.*, 1995). Estos microorganismos juegan un papel importante en la mineralización de la materia orgánica, la degradación y el reciclamiento de diversos materiales, la mejora de los parámetros físicos, la protección del medio ambiente, fijación de nitrógeno, la inmovilización de nutrientes minerales, entre otros (Subramani y Aalbersberg, 2012). Asimismo, existe la hipótesis de que el aumento o disminución de un microorganismo

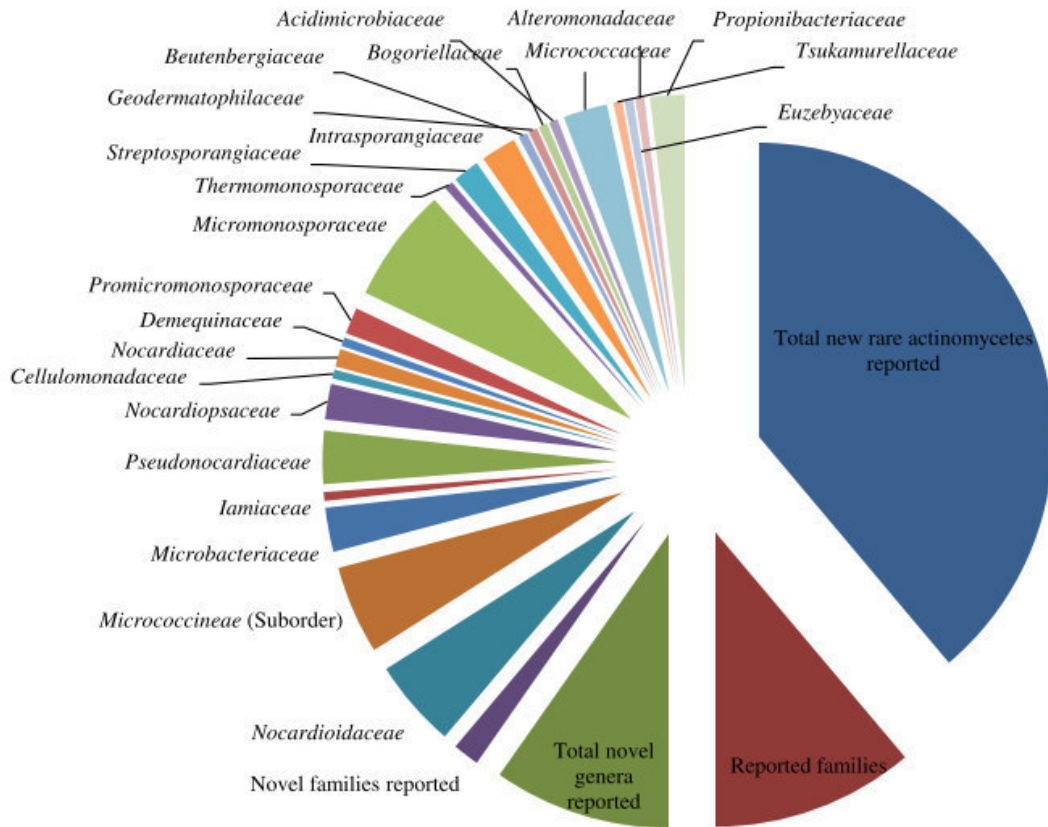
productores de enzimas, pueden indicar la concentración de sustrato natural y las condiciones del medio ambiente (Ramesh y Mathivanan, 2009).

### **Nuevos géneros de actinomicetos marinos**

Según el reporte de Subramani y Aalbersberg (2013), un total de 38 nuevas especies de actinomicetos pertenecientes a 15 diferentes familias han sido reportadas en sedimento marino entre el 2007 y mediados del 2013. Entre ellos, se informó de nueve nuevos géneros como *Actinotalea*, *Aestuariimicrobium*, *Demequina*, *Marinactinospora*, *Paraoerskovia*, *Sciscionella*, *Marisediminicola*, *Spinactinospora* y *Miniimonas*.

Asimismo, los sedimentos de manglar son una fuente abundante de población actinomicetos al ser productores versátiles de varias enzimas y moléculas antimicrobianas (Ramesh y Mathivanan, 2009). Estos ecosistemas se distinguen de otros ecosistemas por las inundaciones de marea periódicas y los factores ambientales variables como la salinidad y la disponibilidad de nutrientes, lo cual permitiría desarrollar adaptaciones de vías metabólicas que podrían generar metabolitos inusuales (Long *et al.*, 2005). En el período 2007 hasta mediados de 2013, un total de 14 nuevas especies de actinomicetos pertenecientes a siete familias diferentes han sido reportadas en los sedimentos de manglares, entre ellos dos nuevos géneros *Illumatobacter* (Matsumoto *et al.*, 2009) y *Lysinimicrobium* (Hamada *et al.*, 2012).

Finalmente, entre el 2007 y 2013, un total de 80 nuevas especies de actinomicetos pertenecientes a 23 géneros de actinomicetos diferentes fueron reportados, de los cuales 20 nuevos géneros y 3 familias nuevas se han registrado en los ambientes marinos. Es importante resaltar también, que la familia Micromonosporaceae es dominante en los hábitats marinos; seguido por los géneros *Nocardioideaceae*, *Micrococcineae* (suborden) y *Pseudonocardiaaceae* (**Figura 6**) (Subramani y Aalbersberg, 2013).



**Figura 6.** Nuevas familias, géneros y cepas de Actinomicetos reportados en hábitats marinos entre 2007 y mediados del 2013 (Tomado de Subramani y Aalbersberg, 2013).

**Tabla 1.** Nuevos metabolitos producidos por actinomicetos marinos, periodo 2005-2010 (Tomado de Subramani y Aalbersberg, 2012).

Compound	Source	Biological activity	Reference
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Li et al. (2005)
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	Antibacterial; anticancer	Soria-Mercado et al. (2005)
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla et al. (2005)
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner et al. (2005)
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial	Manam et al. (2005)
Mechercharmycins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh et al. (2005)
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer; antimalarial	Jensen et al. (2007) and Prudhomme et al. (2008)
Sporolide A	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Salinosporamides B & C	<i>Salinispora tropica</i>	Cytotoxicity	Williams et al. (2005)
2-Allyloxyphenol	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial; food preservative; oral disinfectant	Arumugam et al. (2009)
Saliniketol	<i>Salinispora arenicola</i>	Cancer chemoprevention	Jensen et al. (2007)
Marinomycins A-D	<i>Marinispora</i>	Antimicrobial; anticancer	Kwon et al. (2006)
Cyanosporaside A	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Lodopyridone	<i>Saccharomonospora</i> sp.	Anticancer	Maloney et al. (2009)
Arenimycin	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibacterial; anticancer	Asolkar et al. (2010)
Salinispyrone	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Salinipyrones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Mild cytotoxicity	Oh et al. (2008)
Pacificanones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Antibacterial	Oh et al. (2008)
Arenicolides A-C	<i>Salinispora arenicola</i>	Mild cytotoxicity	Jensen et al. (2007) and Williams et al. (2007)
1-hydroxy-1-norresistomycin	<i>Streptomyces chinaensis</i>	Antibacterial; anticancer	Gorajana et al. (2005) and Kock et al. (2005)
Resistoflavin methyl ether	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anti-oxidative	Kock et al. (2005)
Staurosporinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor; phycotoxigenicity	Wu et al. (2006)
Sesquiterpene	<i>Streptomyces</i> sp.	Unknown	Wu et al. (2006)
1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Huang et al. (2006)
Caboxamycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer	Hohmann et al. (2009)
Butenolides	<i>Streptovercillium luteovercillatum</i>	Antitumor	Li et al. (2006)
Daryamides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifungal; anticancer	Asolkar et al. (2006)
Piericidins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Hayakawa et al. (2007a)
Proximicins	<i>Verrucosipora</i> sp.	Antibacterial; anticancer	Fiedler et al. (2008)
Streptokordin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Jeong et al. (2006)
ZHD-0501	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticancer	Han et al. (2005)
Bisanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Socha et al. (2006)

### **3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 HIPÓTESIS**

Bacterias de sedimento marino del orden de los Actinomicetales inhiben el desarrollo de especies patógenas de *Vibrio* en *Litopenaeus vannamei*.

#### **3.2 OBJETIVOS**

##### **3.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antagonista de actinomicetos marinos frente a bacterias del género *Vibrio* causantes de “vibriosis” en *Litopenaeus vannamei*.

##### **3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar e identificar por técnicas convencionales y moleculares las especies de *Vibrio* patógenas asociadas a especímenes enfermos de *L. vannamei*.
- Caracterizar fenotípicamente una colección de actinomicetos aislados de sedimento marino mediante pruebas convencionales y microscópicas.
- Determinar la actividad inhibitoria de los actinomicetos mediante pruebas *in vitro* frente a especies de *Vibrio* aislados de *L. vannamei*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos orgánicos de actinomicetos seleccionados por su actividad anti-*Vibrio*
- Identificar por la técnica de PCR actinomicetos seleccionados por su actividad anti-*Vibrio*.



## **4 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **4.1.1 *Litopenaeus vannamei***

Los especímenes de *L. vannamei* fueron donados por una empresa langostinera privada. Se seleccionaron langostinos en estadio de juveniles, moribundos con signos aparentes de vibriosis tales como: opacidad del musculo abdominal, necrosis en los apéndices, debilidad y nado letárgico.

#### **4.1.2 CEPAS DE *Vibrio***

Se utilizaron las siguientes cepas de *Vibrio* como controles: *V. harveyi* CECT 525<sup>T</sup>, *V. parahaemolyticus* CECT 612 y *V. alginolyticus* CCM 2578<sup>T</sup>, las cuales fueron donadas gentilmente por el Dr. Jesús Romalde de la Universidad Santiago de Compostela (España).

#### **4.1.3 CEPAS DE ACTINOMICETOS**

Las 25 cepas de actinomicetos utilizados en el presente estudio pertenecen a la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana – Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM; fueron originalmente aislados a partir de muestras de sedimento marino de la Bahía de Independencia (Reserva Nacional de Paracas, Perú) y Bahía de Ancón (Lima, Perú) a profundidades de 34 y 100 metros, obtenidas por el método del dragado (León *et al.*, 2007), con el apoyo del Laboratorio de Ecología Marina de la Facultad de Ciencias Biológicas. Los lugares de muestreo han sido ampliamente estudiados y, son consideradas zonas de alta productividad primaria y diversidad biológica (Tarazona *et al.*, 2003).

## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 AISLAMIENTO DE *Vibrio* A PARTIR DE *Litopenaeus vannamei*

El aislamiento primario se realizó a partir de especímenes de langostinos adultos con signos de vibriosis, especímenes en cuarentena y muestras de agua de las pozas de crianza donde se encontraron especímenes enfermos. Se prepararon “pools” de estas muestras y luego fueron inoculados por diseminación en medio de cultivo Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y Agar Tripticasa de Soya (TSA) con adición de 1% de NaCl (Trujillo *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2015). Los cultivos fueron incubados a 30°C por 48 h en una incubadora convencional (Mettler, Alemania). Las cepas fueron conservadas en el medio TSA + 1% NaCl.

### 4.2.2 PRUEBAS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Vibrio*

La identificación del género se realizó mediante pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa (Bactident® Oxidasa Merck) y la inoculación en agar Hierro Triple Azúcar (TSI), agar Lisina – Hierro (LIA), Rojo de Metilo (MR), Voges Proskauer (VP), agar Motilidad – Indol - Ornitina (MIO), agar Sulfuro – Indol – Motilidad (SIM), agar Citrato de Simmons, medio basal de Oxido – Fermentación de Hugh y Leifson (Manosa y dextrosa). Se realizó también la prueba de crecimiento a distintas concentraciones de NaCl: 1.5, 2, 4, 6, 8 10%. Todos los cultivos fueron incubados a 30° C por 24 h (en algunos casos se continuó con la incubación hasta las 48 h).

### 4.2.3 ANTIBIOGRAMA

El antibiograma se realizó siguiendo las directrices del Instituto Nacional de Salud, (2002), por lo cual se prepararon diluciones de las cepas de *Vibrio*, utilizando como referencia 0,5 de la escala de Mac Farland como estándar. Las cepas fueron inoculadas por el método del hisopado en placas de agar Mueller Hinton con una adición de 1% de NaCl. La selección de los discos de antibióticos se realizó con base en el uso de estos en la industria langostinera, siendo los siguientes: enroblend (5 %), florfenicol (2 %),

amikacina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), ácido nalidixico (30 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 ul), trimetoprim/sulfa (23,75/11,25 µg), novobiocina (5 µg), nitrofurantoina (300 µg) y estreptomina (10 µg) (Vaseeharan *et al.*, 2005; INS, 2002), los cuales fueron distribuidos uniformemente de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro, colocándose solo 6 discos por cada placa. Finalmente, estas placas fueron incubadas a 30°C por 24 h y la lectura e interpretación de los resultados se realizó con base en las medidas (mm) de los diámetros de los halos de inhibición.

#### **4.2.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE ACTINOMICETOS**

Las características morfológicas de los actinomicetos se realizaron con base en el crecimiento de estos en los medios ISP (International *Streptomyces* Project): agar extracto de levadura extracto de malta (ISP 2), agar avena (ISP 3), agar almidón – sales inorgánicas (ISP 4), agar de glicerol asparagina (ISP 5), agar peptona-extracto de levadura- hierro (ISP 6) y agar tirosina (ISP 7), descritos por (Shirling y Gottlieb, 1966; Higginbotham y Murphy, 2010) (Anexo 1). Asimismo se tomó en cuenta las características morfológicas de la colonia, el tipo de micelio y esporas, para lo cual se realizaron microcultivos por el método de “bloques de agar”, los cuales fueron incubados en cámara húmeda a 28°C por 5 a 7 días (Wang *et al.*, 2014), y observados en un microscopio Labomed Lx 400.

Las propiedades bioquímicas de las cepas se evaluaron a través de la producción de enzimas extracelulares, mediante la difusión radial en placas siguiendo la metodología planteada por León (1996). Todos los medios de cultivo fueron incubados a 28°C por 5-7 días.

**Hidrólisis de la caseína:** La actividad de las caseinasas se determinó en placas conteniendo el medio agar marino suplementado con 1% de caseína (Sigma). Cuando la caseína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento microbiano, notándose un halo de aclaramiento.

**Hidrólisis de la gelatina:** La actividad de las gelatinasas se determinó suplementando 5 % de gelatina microbiológica (Difco) en el medio de agar marino. Después de 5-7 días de incubación se agregó la solución de cloruro de mercurio acidificada ( $\text{HgCl}_2$ ). Un precipitado blanco indica presencia de gelatina no hidrolizada; la ausencia del precipitado en la región de crecimiento bacteriano indica hidrólisis de la gelatina.

**Hidrólisis de la celulosa:** Se determinó en placas conteniendo el medio agar marino suplementado con 1% de carboximetilcelulosa (CMC). Después de 5 a 7 días de incubación se bañó las placas con el colorante Rojo de Congo (5%) y se lavó con cloruro de sodio. Finalmente fueron consideradas como positivas las cepas que presentaban un halo de aclaramiento alrededor de la colonia.

**Hidrólisis de almidón:** La producción de amilasas se determinó agregando 0,2% de almidón soluble (Merck) al medio agar marino. Luego de días de incubación, la superficie del medio fue bañada con solución de lugol (1:1) para revelar el almidón no digerido. Un halo incoloro alrededor del inóculo indica la hidrólisis del almidón, y por lo tanto, el microorganismo es amilasa positiva. Si existe una coloración azul-parda alrededor del cultivo significa que el almidón no ha sido hidrolizado por el microorganismo, debido a que no posee la enzima y por lo tanto es amilasa negativo.

**Hidrólisis del tween 80 y lecitina:** La producción de estererasas y lecitinasas se determinó sembrando las cepas en el medio agar marino suplementado con 1% de tween 80 y 1,5% de yema de huevo estéril respectivamente. La aparición de un halo de opacidad alrededor de la colonia nos indicará la hidrólisis de cada una de estas enzimas.

**Actividad de la ADNasa:** Para determinar la producción de la ADNasa (Difco), las cepas fueron sembradas en el medio ADN adaptado para bacterias marinas, suplementado con 75% de agua de mar. Después de 7 días, se consideraron como positivas las cepas con un halo claro alrededor de la colonia.

**Hidrólisis de la urea:** Para determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Se utilizó

el agar base de Christensen (Difco) y solución de urea al 20%, finalmente se dejó incubar por 7 días. Un viraje a un color rojo violeta indica la hidrólisis de la urea dando así la reacción como positiva. Si el tubo permanece de la coloración inicial una vez inoculado la bacteria la prueba es negativa.

### **Microscopia electrónica**

Los micelios de los actinomicetos fueron obtenidos a partir de microcultivos incubados durante 7 días, los cuales fueron fijados con solución de glutaraldehído al 2% con buffer fosfato 0,1M durante 2,5 h a temperatura ambiente. Estas muestras fueron lavadas con buffer fosfato 0,2M una vez durante 10 min. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una deshidratación gradual en alcoholes de 50, 70 y 90% durante 5 min cada uno y dos pasos de alcohol de 100% por 10 y 15 min respectivamente. Las muestras fueron mantenidas en la última solución de etanol hasta ser sometidas a desecación por punto crítico en el equipo EMS 850, usando CO<sub>2</sub>. Finalmente, las muestras fueron colocadas sobre el soporte de aluminio (stub), al cual previamente se le puso cinta de carbón adhesiva de doble cara y se procedió al recubrimiento de oro de la muestra, introduciéndola en la cámara del metalizador *Sputter Coater SPI* (Galindo, 2014).

La observación de las muestras se realizó en el laboratorio de Equipamiento Especializados de la Facultad de Ciencias Biológicas, para lo cual se utilizó el microscopio electrónico de barrido Inspect™ S50 de marca FEI usando el sensor ETD (para electrones secundarios) con una carga de voltaje aproximada de 20kV.

#### **4.2.5 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA**

Los actinomicetos fueron enfrentados a las cepas de *Vibrio* silvestres aislados de langostinos según la metodología de “doble capa” descrita por (León *et al.*, 2007). Se hizo crecer la cepa de actinomiceto a manera de macrocolonias en placas petri con agar marino. Al cabo de siete días se agregó una segunda capa de agar conteniendo un

cultivo en fase exponencial de cada cepa de *Vibrio* testigo. Las placas se incubaron a 30°C por un periodo de 24 h y luego se procedió a la observación de las placas. Todo halo de inhibición de crecimiento de la cepa testigo se consideró como prueba positiva de actividad antagonista (Anexo 2).

#### **4.2.6 PROCESO FERMENTATIVO PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS**

El proceso fermentativo se realizó siguiendo las recomendaciones de Gorajana *et al.* (2007). Se generaron cultivos iniciadores de la cepa en estudio, inoculándola en un matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 25 ml de caldo marino. Este matraz se colocó en incubación a temperatura ambiente en un “Shaker” KS250 basic (IKA LABOR TECHNIK) a 200 rpm por 48 h. Posteriormente se agregó el volumen total del cultivo iniciador en un matraz Erlenmeyer de 1 L conteniendo 225 ml del medio de fermentación mencionado previamente. Este se mantuvo en agitación de 200 rpm por 6 días. El sobrenadante fue separado haciendo uso de una centrífuga Universal Centrifuge PLC-012E a 4500 rpm por 25 min, finalmente fue filtrado y decantado en recipientes estériles para su procesamiento.

El caldo de fermentación obtenido (250 ml) fue sometido a una doble extracción usando solventes orgánicos de diferentes polaridades (diclorometano, cloroformo y butanol) en proporción 1:1 (v: v). Cada una de las fases orgánicas obtenidas fueron concentradas a presión reducida usando un rotavapor (Boeco RVO 400 SD) a 40°C. Finalmente el volumen restante fue colocado en un vial estéril y evaporado en una incubadora a 40°C (Anexo 3).

#### **4.2.7 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)**

La prueba de CMI fue realizada siguiendo la metodología según Valan *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Las cepas testigo fueron *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y las cepas de *Vibrio* silvestres aisladas de especímenes de langostinos

enfermos. Las cepas fueron mantenidas en Caldo Tripticasa Soya (TSB) + 1% de NaCl, incubándose a 30°C.

A partir de un cultivo en fase exponencial se preparó una suspensión bacteriana con turbidez igual a 0,5 de la escala Mc Farland. El extracto orgánico fue re-suspendido en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% para obtener una solución "stock" de 1 mg.ml<sup>-1</sup> de cada extracto. Se prepararon diluciones 1:2 de dicha suspensión aplicando 10 µl de cada una en los pocillos de microdilución. Posteriormente, 80 µl de Caldo Tripticasa Soya + 0,5% de NaCl fueron vertidos y mezclados con la suspensión de prueba. Finalmente, 10 µl de la suspensión bacteriana fueron vertidos en los pocillos. El material se colocó en incubación a 30°C por 18 – 24 h. Se consideró como el valor de la CMI a la menor concentración en la que no hubo crecimiento. Se usaron como controles al patógeno + medio de cultivo, patógeno + medio de cultivo + DMSO, patógeno + medio de cultivo + antibiótico y el control de esterilidad del medio de cultivo.

#### **4.2.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Vibrio* Y ACTINOMICETOS INHIBITORIOS**

##### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de los actinomicetos y *Vibrio* estuvo sujeto a las indicaciones del kit de purificación de ADN Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega®).

Se añadió 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de eppendorf de 1,5 ml y se procedió a separar las células mediante el uso de una microcentrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf) a 13,000-16,000 × g durante 2 min y se eliminó el sobrenadante.

- **Lisis celular:** Las bacterias Gram positivas como los actinomicetos, fueron resuspendidas en 480 µl de EDTA (50 mM) y se añadió lisozima al sedimento celular resuspendido en un volumen total de 120 µl. Para activar la enzima se incubó la muestra a 37°C durante 30-60 min, se centrifugó durante 2 min a 13,000-16,000 × g y se retiró el sobrenadante. Se agregó 600 µl de solución de

lisis nucleica y se pipeteó suavemente hasta que se volvieron a suspender las células. Se incubó a 80°C durante 5 min para lisar las células; a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió 3 µl de RNasa a la solución de lisado celular. Se incubó a 37°C durante 15-60 min y se enfrió la muestra a temperatura ambiente.

- **Precipitación de proteínas:** Se agregaron 200 µl de la solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con RNasa y se incubó la muestra en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13 000-16 000 × g durante 3 min.
- **Precipitación de ADN:** Se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contiene 600 µl de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN forman una masa visible, se centrifugó a 13 000-16 000 × g durante 2 min y se vertió cuidadosamente el sobrenadante. Se añadió 600 µl de Etanol al 70% y se invirtió suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN. Se centrifugó a 13 000-16 000 × g durante 2 min y se descartó el etanol. Se dejó que el precipitado se seque al aire durante 10-15 min.
- **Rehidratación del ADN:** Se añadieron 100 µl de solución de rehidratación de ADN en el tubo y se rehidrató el ADN mediante incubación a 65 °C durante 1 h. Finalmente se guardó el ADN en refrigeración a 2-8 °C.

### **Electroforesis**

Se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1% para realizar una electroforesis horizontal a 100 v durante 30 min, el gel fue teñido en Bromuro de Etidio para su visualización en un lector de geles BDA compact y transiluminador UVstar 312 nm BIOMETRA.

### **PCR**

Se realizó la amplificación del gen ARN ribosomal 16S utilizando los “primers” 16S 8F (5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3`) y 16S 1492R(I) (5`-GGT TAC CTT GTT ACG



ACT T-3'), bajo las siguientes condiciones: Denaturación inicial de 94 °C por 2 min, 25 ciclos de: denaturación (94 °C por 2 min.), alineamiento (45 °C por 1,5 min.), extensión (72 °C por 2 min.) y una extensión final de 72 °C por 3 min.

### **Secuenciamiento**

Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Se solicitó el secuenciamiento de 4 primers universales, disponibles en la colección de macrogen: 27f

(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG), 1492r (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), 518f (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC),

### **Análisis filogenético**

Los fragmentos de secuenciados fueron seleccionados con base en la claridad del cromatograma el cual se verificó mediante el uso del software Chromas Pro 1.7.6 (Technelysium Pty Ltd). El alineamiento de las secuencias fue realizado con los programas Bioedit y Clustal X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Finalmente, las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschup *et al.*, 1990).

Se construyó un árbol filogenético (*neighbour-joining tree*; Saitou y Nei 1987) a partir de una matriz de distancias genéticas entre pares calculada con el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor 1969). También se realizaron análisis tipo *bootstrap* de 500 réplicas para evaluar la estabilidad relativa de las ramas (Felsenstein, 1985). En total se compararon 852 posiciones. Todos el análisis se hizo usando el paquete MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AISLAMIENTO DE *Vibrio* A PARTIR DE *Litopenaeus vannamei*

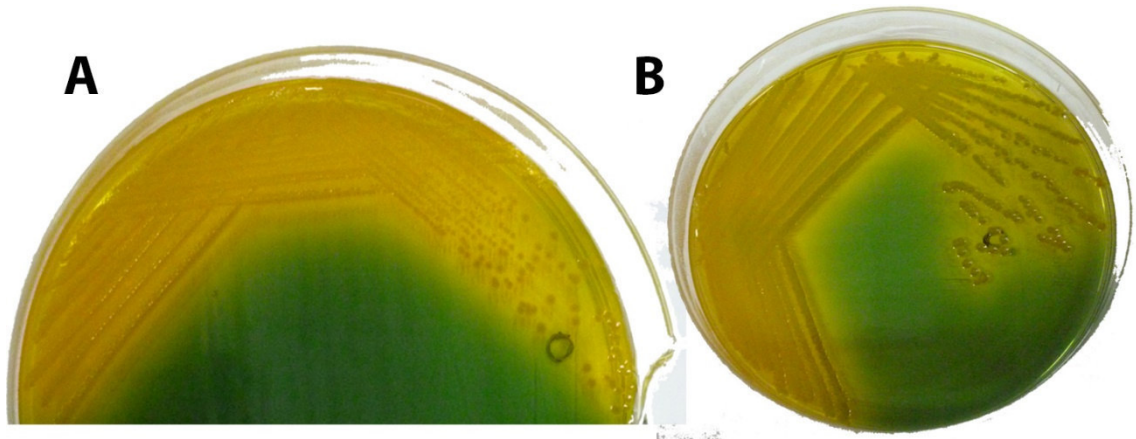
Luego del crecimiento en el medio TCBS y posterior caracterización morfológica de las colonias se seleccionaron 7 cepas presuntivas de género *Vibrio* (**Figura 7 y Tabla 2**), las cuales fueron codificados como VP para cepas aisladas a partir del hepatopáncreas de langostinos con signos de vibriosis y VL para cepas aisladas a partir de la hemolinfa de langostinos con signos de vibriosis.

**Tabla 2.** Caracterización fenotípica de cepas seleccionadas de *Vibrio* en el agar TCBS.

CEPAS	SACAROSA	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA			
		TAMAÑO (mm)	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN
V2P3(2)	+	4-5			
V3L	+	4-5			
V5P3	-	5-6			
V7P3	+	1-2			
V8P1(2)	+	1-2	Circular	Entero	Elevada
V8P2(1)	-	1-2			
V8P3	+	3-4			
<i>V. alginolyticus</i> *	+	4-5			
<i>V. parahaemolyticus</i> *	+	4-5			

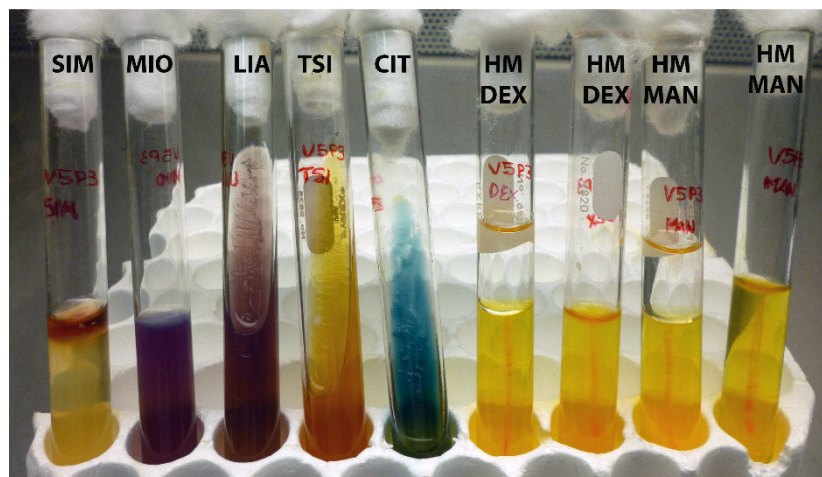
(+) : Degrada la sacarosa en TCBS, (-) : No degrada la sacarosa en TCBS

\*cepas referenciales.



**Figura 7.** Colonias presuntivas del género *Vibrio* en agar TCBS aisladas partir de langostinos. A: cepa V3L; B: cepa V8P3.

Las cepas caracterizadas en forma presuntiva como género *Vibrio* fueron identificadas taxonómicamente basadas en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas dadas por el Manual de Bacteriología Sistemática Bergey's (Baumann y Schubert, 1984). Las características bioquímicas convencionales más útiles para establecer una clave sencilla de identificación del género *Vibrio* se observan en la **Figura 8 y Tabla 3.**



**Figura 8.** Batería bioquímica aplicada para la identificación del Género *Vibrio* de la cepa V5P3. Cit: Citrato, H-L: Prueba de óxido Fermentación de Hugh y Leifson, DEX: Dextrosa y MAN: Manosa.

**Tabla 3.** Pruebas bioquímicas de las cepas presuntivas del género *Vibrio* aisladas de langostinos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS		V2P3(2)	V3L	V5P3	V7P3	V8P1(2)	V8P2(1)	V8P3	V.a.	V.p.
Catalasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI		A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	K/A
LIA		+	+	+	NC	-	-	+	+	+
MR		+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato		+	-	+	+	+	-	-	-	-
Motilidad		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina		+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sin O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrosa	O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sin O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

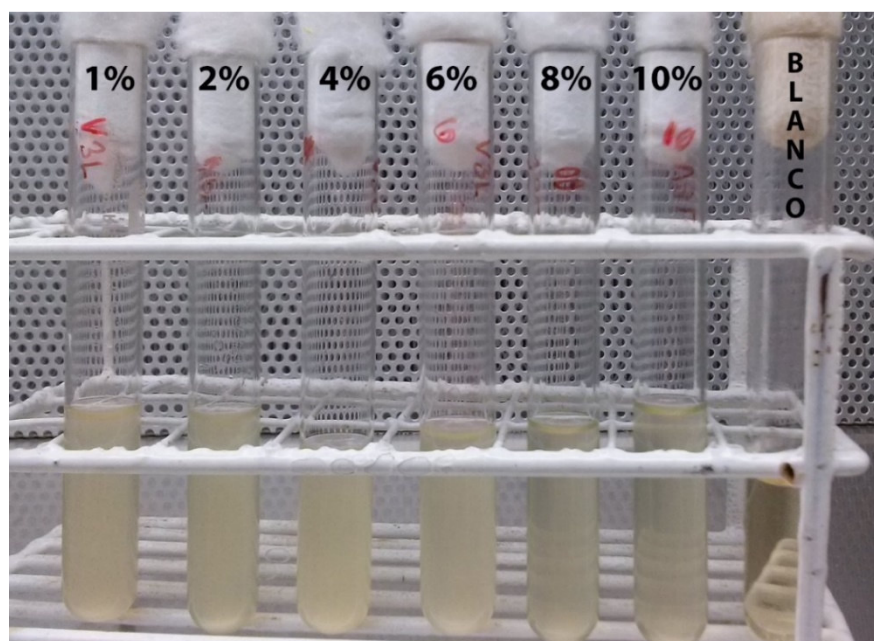
+/-: Positivo/negativo, NC: No creció, A: acidez y K: alcalinidad. V. a.: *V. alginolyticus*, V. p.: *V. parahaemolyticus*.

La identificación del género *Vibrio* se complementó con el estudio de la halotolerancia. En la **Tabla 4** se observa que la mayoría de las cepas logra tolerar hasta un 10% de cloruro de sodio a excepción de las cepas V2P3(2) y V8P2(1) que solo toleran hasta 2% y 8% de NaCl, respectivamente (**Figura 9**).

**Tabla 4.** Cepas seleccionadas como presuntivas del género *Vibrio* en diferentes concentraciones de NaCl.

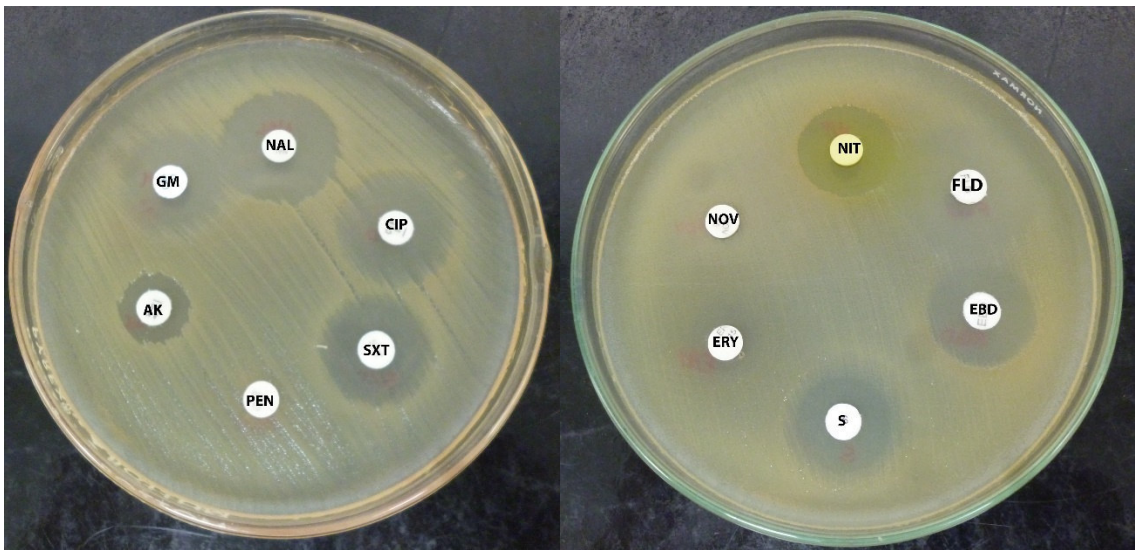
CEPAS	NaCl (%)					
	1	2	4	6	8	10
V2P3(2)	++	+	-	-	-	-
V3L	+++	+++	+++	+++	++	++
V5P3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
V7P3	++	++	++	++	++	++
V8P1(2)	+++	+++	+++	+++	+++	++
V8P2(1)	+++	+++	+++	+++	++	-
V8P3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>V. alginolyticus</i>	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>V. harveyi</i>	++	++	++	+	+	+

Crecimiento: (+++): abundante, (++): moderado, (+): escaso, (-): no creció



**Figura 9.** Comportamiento de la cepa V3L de *Vibrio* a distintas concentraciones de NaCl.

La **Tabla 5** muestra que todas las cepas de *Vibrio* silvestres probadas son sensibles al ácido nalidíxico (NAL), gentamicina (GM), ciprofloxacino (CIP), estreptomicina (S), enroblend (EBD) y florfenicol (FLD) y además son resistentes a la novobiocina (NOV). Así mismo, las cepas V2P3(2), V3L, V5P3, V8P2 Y V8P3 son resistentes a la penicilina G (PEN). Asimismo, se observa que el mayor halo de inhibición fue producido por los antibióticos florfenicol (FLD) y enroblend (EBD) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Prueba de sensibilidad antimicrobiana de la cepa V3L (método de difusión en agar) frente a antibióticos convencionales.

**Tabla 5.** Antibiograma de las cepas del género *Vibrio* aisladas de langostinos con signos de vibriosis (Halos de inhibición en mm).

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO (µg)										
	Abreviatura	V5P3	V3L	V8P3	V7P3	V8P1(2)	V8P2(1)	V2P3(2)			
Ácido Nalidixico	NAL	S	S	R	S	S	S	R			
Gentamicina	GM	I	I	S	S	S	I	S			
Amikacina	AK	R	R	S	S	S	R	S			
Penicilina g	PEN	R	R	R	I	R	R	R			
Trimetoprim/sulfa	SXT	S	S	R	S	S	S	R			
Ciprofloxacino	CIP	I	I	S	S	S	S	S			
Nitrofurantoina	NIT	S	S	R	S	S	S	R			
Novobiocina	NOV	R	R	R	R	R	R	R			
Estreptomycin	S	S	S	S	S	S	S	S			
Enroblend	EBD	S	S	S	S	S	S	S			
Florfenicol	FLD	S	S	R	S	S	S	R			

R: resistente, I: intermedio, S: sensible y \*: Unidades Internacionales

## 5.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ACTINOMICETOS

Los resultados de la caracterización de las 25 cepas de actinomicetos marinos utilizados en el presente estudio se indican en la **Tabla 6**. De ellas el 80% (20) son provenientes de sedimentos colectados en la Bahía de Independencia (Ica – Perú) y el 20% (5) de la Bahía de Ancón (Lima – Perú).

El crecimiento en el laboratorio en Agar Marino ocurre entre los 7 y 21 días. El tamaño de las colonias es variable, desde pequeñas de 7 mm, hasta colonias de 20 mm de diámetro. La mayoría de las colonias son de color blanco o gris, así como la pigmentación al reverso de cada colonia fue de color marrón, amarillo o rojizo. Se pudo observar una variedad de formas de colonia de actinomicetos siendo las más frecuentes las colonias circulares con borde liso y colonias de bordes irregulares, elevadas o planas, convexas, con presencia de hifas aéreas bien desarrolladas y micelio ramificado con esporas que nacen del micelio.



**Tabla 6.** Caracterización fenotípica de las 25 cepas de actinomicetos marinos utilizados en el presente estudio.

<b>Cepas</b>	<b>Crecimiento</b>	<b>Micelio aéreo</b>	<b>Reverso de colonia</b>	<b>Origen (Bahía)</b>
B1-CD1	+	Blanco	Amarillo	I
B1-IM2	++	Blanco	Amarillo	I
B1TG1	+++	Blanco	Amarillo	I
B1-662	+++	Blanco	Amarillo	I
I1334C	++	Gris	Amarillo	I
M10-77	+++	Blanco	Rojo	I
M10-85	++	Blanco	Amarillo	I
M11-105	++	Blanco	Amarillo	I
M11-106	++	Blanco	Amarillo	I
M11-108	+++	Gris	Amarillo	I
M11-111	++	Blanco	Amarillo	I
M11-115	+	Blanco	Amarillo	I
M11-116	++	Gris	Amarillo	I
M11-116a(2)	+++	Gris	Marrón	I
M11-116b(2)	NC	NC	NC	I
M11-116(B)	+++	Gris	Marrón	I
M11-116d	++	Gris	Amarillo	I
M11 116d(A)	++	Gris	Marrón	I
M11-116d(B)	++	Gris	Marrón	I
M11-133	++	Blanco	Amarillo	I
I300A(2)	+++	Gris	Amarillo	A
I434Bb	NC	NC	NC	A
I434B	+++	Blanco	Marrón	A
I434Bc	+++	Blanco	Amarillo	A
E54Ba	+++	Blanco	Marrón	A

Crecimiento:

(+++): abundante, (++): moderado, (+): escaso; I: Bahía de Independencia, A: Bahía de Ancón; NC: no creció

Las características morfológicas y culturales de 6 de las cepas seleccionadas (M11-108, M10-77, M11-116(B), M11-116d(B), I300A, M11-116d(A)), se realizaron de acuerdo a las directrices del International *Streptomyces* Project (ISP) (**Tabla 7**). Las propiedades de crecimiento, el color de micelio aéreo y el sustrato y la formación de pigmentos solubles se observaron en diferentes medios después de 14 días de incubación a 28°C.

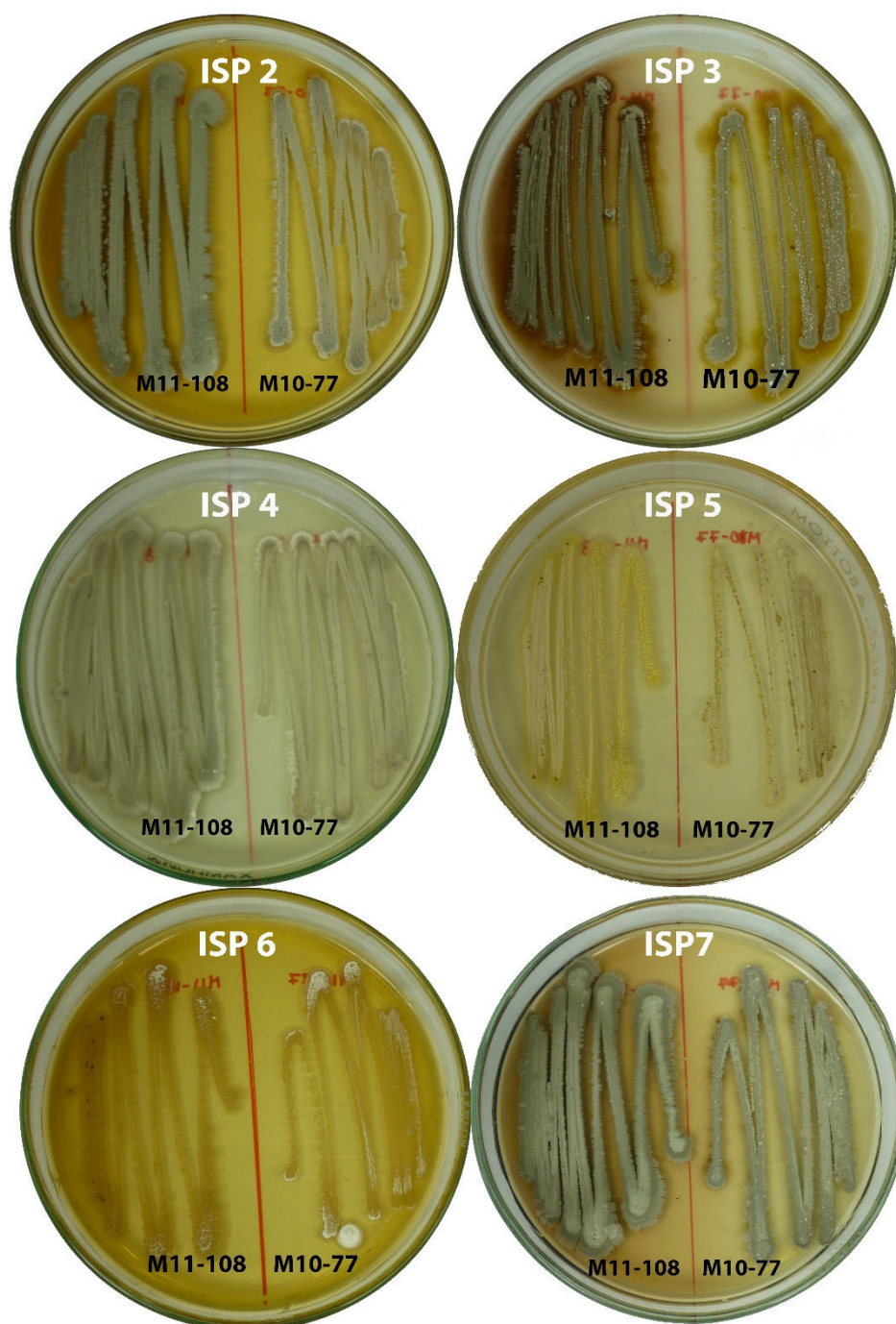
Los medios “standard” para observar las características morfológicas y determinación del color fueron ISP 2, ISP 3, ISP 4 y ISP5, por lo cual se realizaron lecturas durante los 7, 14 y 21 días de incubación. Asimismo el color del sustrato del micelio se determinó observando el lado reverso de placas. La mayoría de cepas en estos medios fueron de aspecto seco, pulverulento y costroso, el color del micelio aéreo y del sustrato fue gris, marrón, amarillo o blanco.

Las colonias con pigmento de color marrón verdoso o marrón oscuro son consideradas como formadoras de pigmentos melanoides, los cuales se comienzan a observar a partir del cuarto día en los medios ISP 6 e ISP 7. Entre las cepas que fueron seleccionadas, solo la cepa M11-108 mostró este color de pigmentación difusible, por lo cual fue reportada como positiva para pigmentos melanoides (**Figura 11**).

**Tabla 7.** Caracterización fenotípica en medios estándar ISP de 6 cepas seleccionadas de actinomicetos utilizados en el presente estudio.

CEPA	MEDIO	COLOR DEL		PIGMENTO SOLUBLE	CRECIMIENTO
		MICELIO AÉREO	LADO REVERSO		
<b>M11-108</b>	ISP2	gris	marrón claro	ninguno	++
	ISP3	gris	marrón claro	marrón	++
	ISP4	gris	amarillo claro	ninguno	++
	ISP5	amarillo	amarillo	ninguno	+
	ISP6	beige	beige	ninguno	+
	ISP7	gris	marrón oscuro	marrón	++
<b>M10-77</b>	ISP2	gris	marrón claro	ninguno	++
	ISP3	gris	marrón rojizo	verde	++
	ISP4	gris	gris	ninguno	++
	ISP5	marrón	gris	ninguno	+
	ISP6	beige	amarillo	ninguno	+
	ISP7	gris	marrón oscuro	ninguno	++
<b>M11-116(B)</b>	ISP2	gris	marrón claro	ninguno	++
	ISP3	gris	amarillo	ninguno	++
	ISP4	gris	marrón claro	gris	++
	ISP5	blanco	blanco	ninguno	+
	ISP6	beige	amarillo	ninguno	+
	ISP7	blanco	marrón claro	gris	++
<b>M11-116d(B)</b>	ISP2	gris	amarillo	ninguno	++
	ISP3	gris	gris	ninguno	++
	ISP4	blanco	marrón claro	gris	++
	ISP5	blanco	blanco	ninguno	+
	ISP6	beige	beige	ninguno	+
	ISP7	blanco	marrón oscuro	gris	++
<b>I300A</b>	ISP2	gris	marrón rojizo	ninguno	++
	ISP3	gris	marrón claro	marrón	++
	ISP4	gris	gris	ninguno	++
	ISP5	blanco	amarillo	amarillo	+
	ISP6	blanco	amarillo	ninguno	+
	ISP7	gris	marrón oscuro	gris	++
<b>M11-116d(A)</b>	ISP2	blanco	marrón oscuro	ninguno	++
	ISP3	gris	gris	ninguno	++
	ISP4	gris	gris	ninguno	++
	ISP5	blanco	blanco	ninguno	+
	ISP6	beige	amarillo oscuro	ninguno	+
	ISP7	gris	marrón oscuro	gris	++

Crecimiento: ++: Moderado, +: escaso



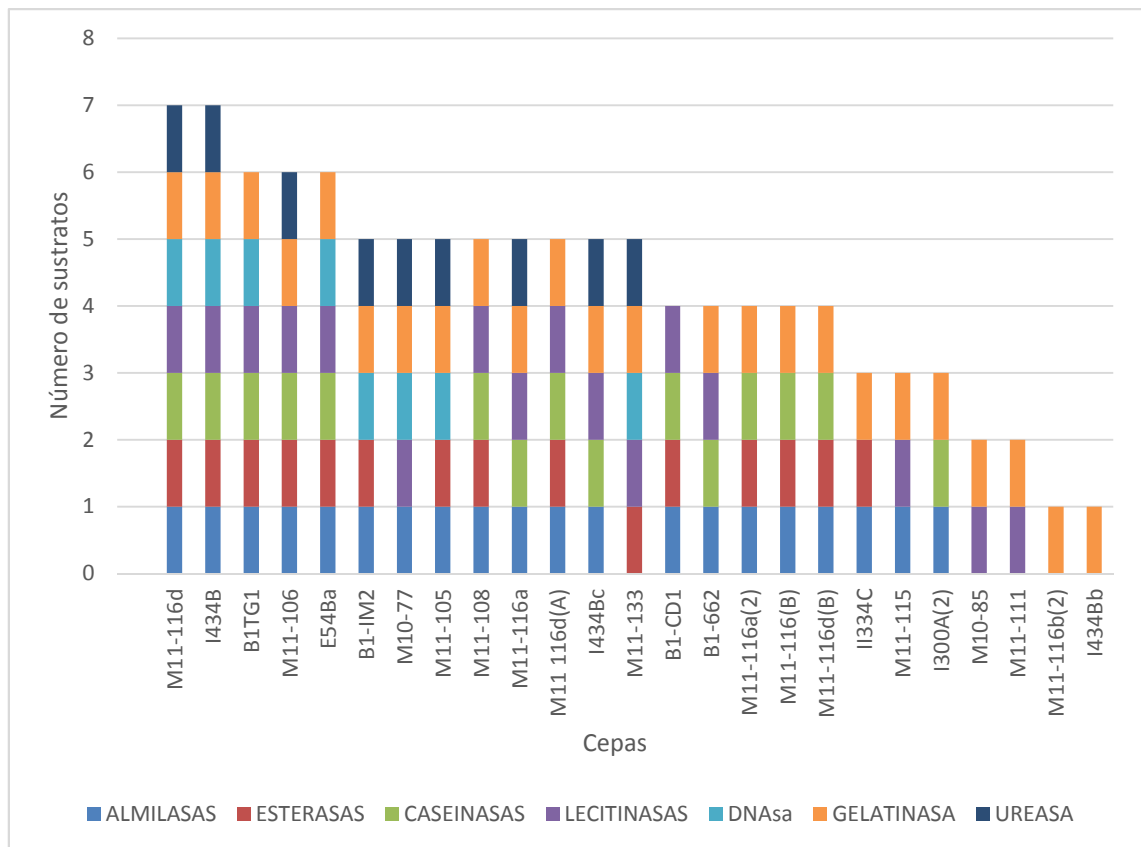
**Figura 11.** Morfología colonial de las cepas M11-108 y M10-77 de actinomicetos en los medios ISP, luego de una incubación de 20 días a 28°C.

Respecto a la actividad enzimática extracelular (Tabla 8), del total de cepas evaluadas (25), el 96% (24 cepas) sintetizaron enzimas proteolíticas sobre la gelatina, el 80% (20) tuvo actividad amilolítica, 64% (16) hidrolizaron la lecitina, el 60% (15) hidrolizaron el

tween 80 y la caseína, 36% (7) tuvieron actividad ureásica, y 28% (7) desoxirribonucleasas.

En la **Figura 12** se muestra la cantidad de cepas que lograron hidrolizar los distintos sustratos. Las cepas I434B y M11-116d hidrolizaron los 7 sustratos probados, mientras que las cepas B1TG1, E54Ba y M11-106 hidrolizaron 6 de los sustratos; y ninguna de las 25 cepas probadas logró hidrolizar la celulosa.

La cepa B1TG1 logro formar halos de hidrólisis de 23 y 52 mm en el agar tween 80 y caseína, mientras que la cepa E54Ba formó halos de 56 y 23 mm en los sustratos de almidón y lecitina (**Figura 13**).

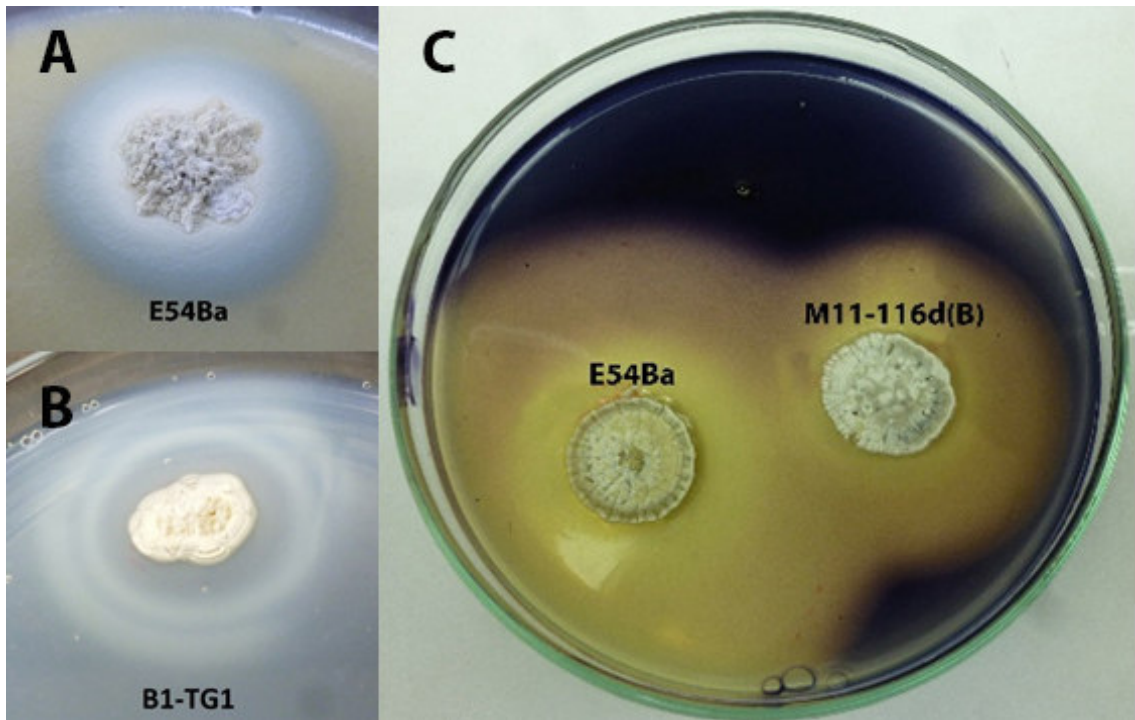


**Figura 12.** Frecuencia de la actividad multienzimática de las cepas de actinomicetos.

**Tabla 8.** Actividad enzimática extra e intracelular de las 25 cepas de actinomicetos frente a distintos sustratos.

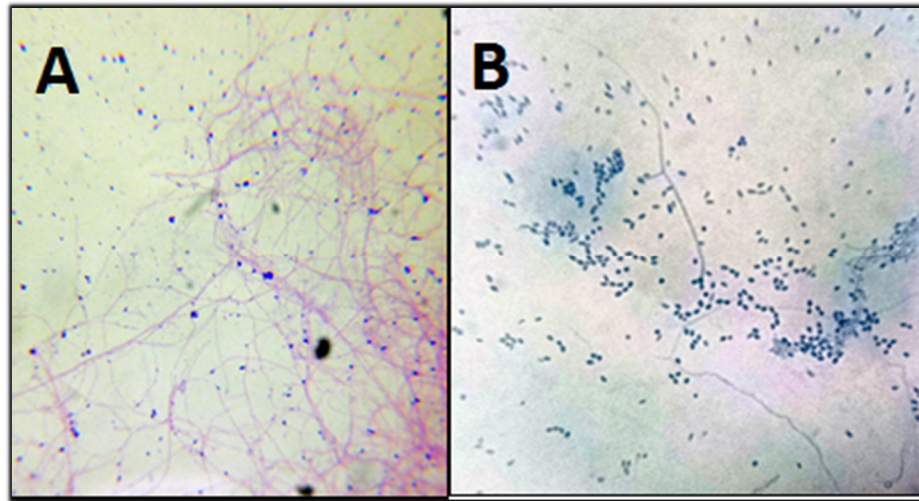
CEPAS	HALOS DE HIDRÓLISIS (mm)				ADNasa	Gelatinasa	Ureasa
	Amilasa	Esterasa	Caseinasa	Lecitinas			
B1-CD1	44	19,83	17	9,13	-	-	-
B1-IM2	45	8,75	0	0	+	+++	+
B1TG1	20,65	23,38	52,25	16,38	+	+++	-
B1-662	12	0	25	20,5	-	+++	-
II334C	10,6	19	0	0	-	+	-
M10-77	24	0	0	14	+	+	+
M10-85	0	0	0	9,5	-	++	-
M11-105	28	12	0	0	+	+++	+
M11-106	42	8	7	7,38	-	+++	+
M11-108	25,05	7,28	1,5	17,75	-	+	-
M11-111	0	0	0	16,88	-	++	-
M11-115	29	0	0	17,88	-	+++	-
M11-116a	25	0	21	14,25	-	++	+
M11-116a(2)	36	29,25	23	0	-	+	-
M11-116b(2)	0	0	0	0	-	+	-
M11-116(B)	33	21,25	40	0	-	+	-
M11-116d	33	20	19	17,63	+	+	+
M11 116d(A)	43,05	19,25	30,6	16,63	-	+	-
M11-116d(B)	32,05	18	25,75	0	-	+	-
M11-133	0	28,5	0	15,5	+	++	+
I300A(2)	18	0	15,5	0	-	+	-
I434Bb	0	0	0	0	-	++	-
I434B	40	17,58	24	15,75	Ligero halo	+++	+
I434Bc	21	0	14	16,63	-	+	+
E54Ba	55,5	14,63	41,63	22,63	+	+++	-

Agar ADNasa: positiva (+), negativa (-); Agar gelatina: hidrólisis total (+++), hidrólisis parcial (++) , hidrólisis moderada (+); Agar urea: positiva (+), negativa (-).

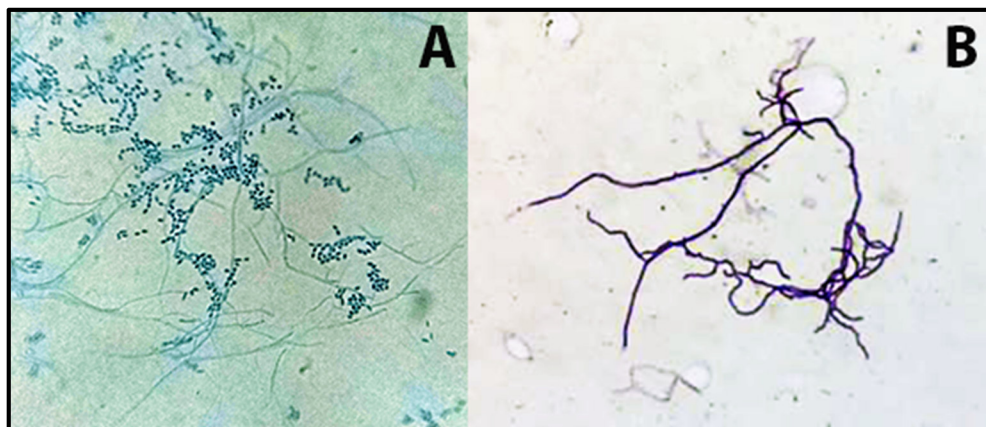


**Figura 13.** Pruebas de actividad enzimática de los actinomicetos frente a diferentes sustratos. (A): agar marino + yema de huevo, (B): agar marino + Tween 80 y (C): agar marino + almidón.

La coloración Gram de los actinomicetos a partir de 7 días de incubación mostró filamentos ramificados Gram positivos delgados y largos, así como también esporas ovaladas desprendiéndose de los filamentos (**Figura 14**). Los microcultivos realizados a las cepas M11-116d(A) y M11-108 permitieron observar esporas individuales dispuestas alrededor de los filamentos (**Figuras 15**). Asimismo la coloración con azul de Lactofenol realizada a la cepa M11-108 mostró filamentos alargados que se originan en un centro común y se extienden formando redes que constituyen el micelio.



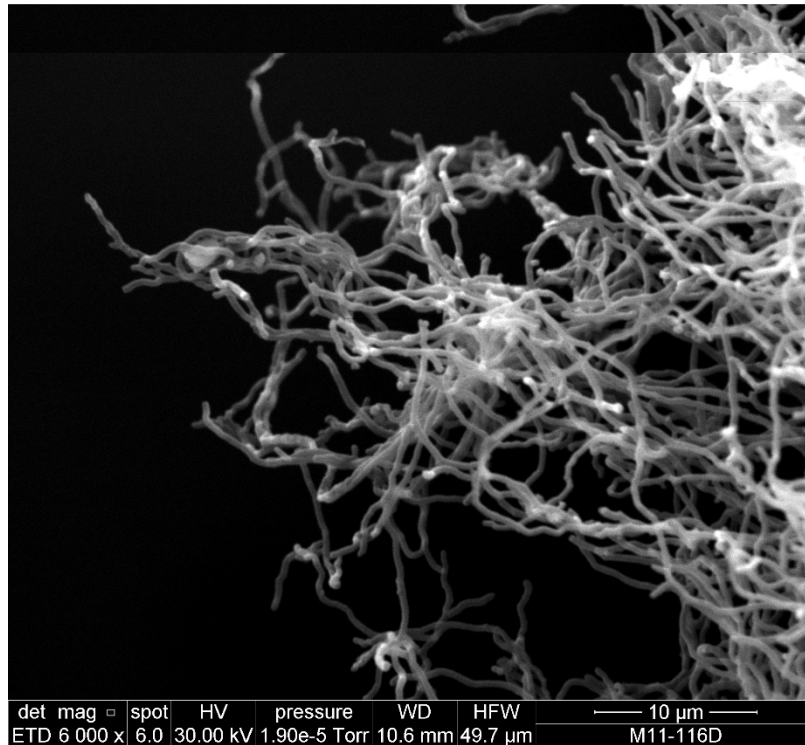
**Figura 14.** Observaciones microscópicas. (A) Coloración Gram a partir de un cultivo de 5 días; (B) Microcultivo luego de 7 días de incubación de la Cepa M11-116d.



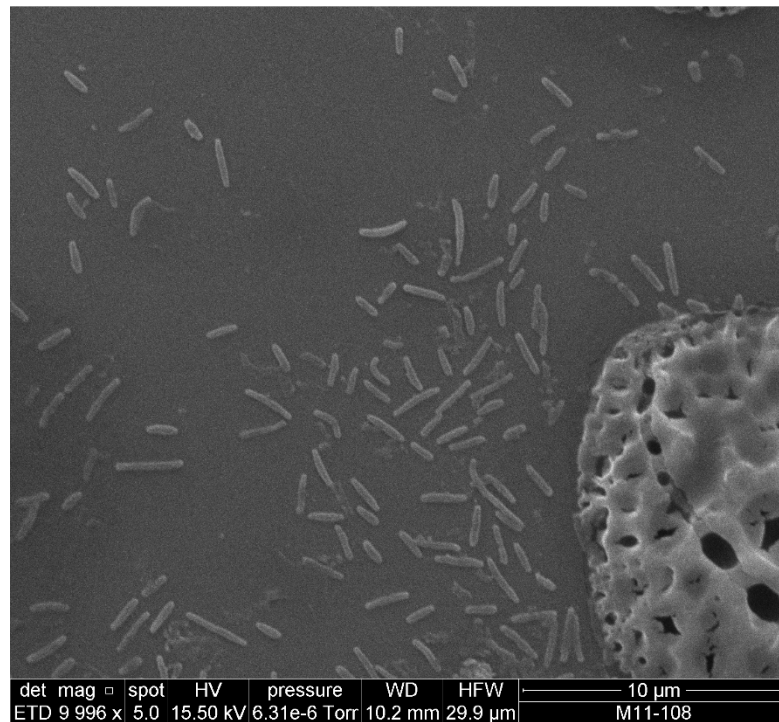
**Figura 15.** Observaciones microscópicas. (A) Microcultivo de 7 días de la cepa M11-108, se observan a detalle las esporas e hifas delgadas. (B) Coloración Gram de la cepa M11-108 a partir de un cultivo de 7 días.

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de la cepa M11-116d (B) muestra hifas bastante ramificadas, aún sin formación de esporas (**Figura 16**). Sin embargo, en la imagen electrónica de la cepa M11-108 a diferencia del microcultivo, no se observan filamentos, pero es bastante notorio la presencia de estructuras bacilares alargadas y algunas curvadas (**Figura 17**).





**Figura 16.** Microfotografía de la cepa M11-116d(B) obtenida a partir de un cultivo en caldo marino.

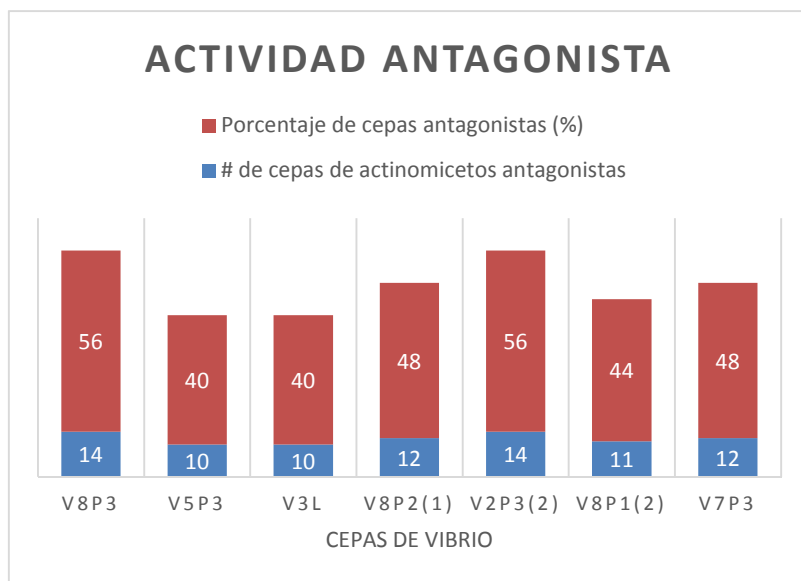


**Figura 17.** Microfotografía de la cepa M11-108 obtenida a partir de un microcultivo en agar marino.

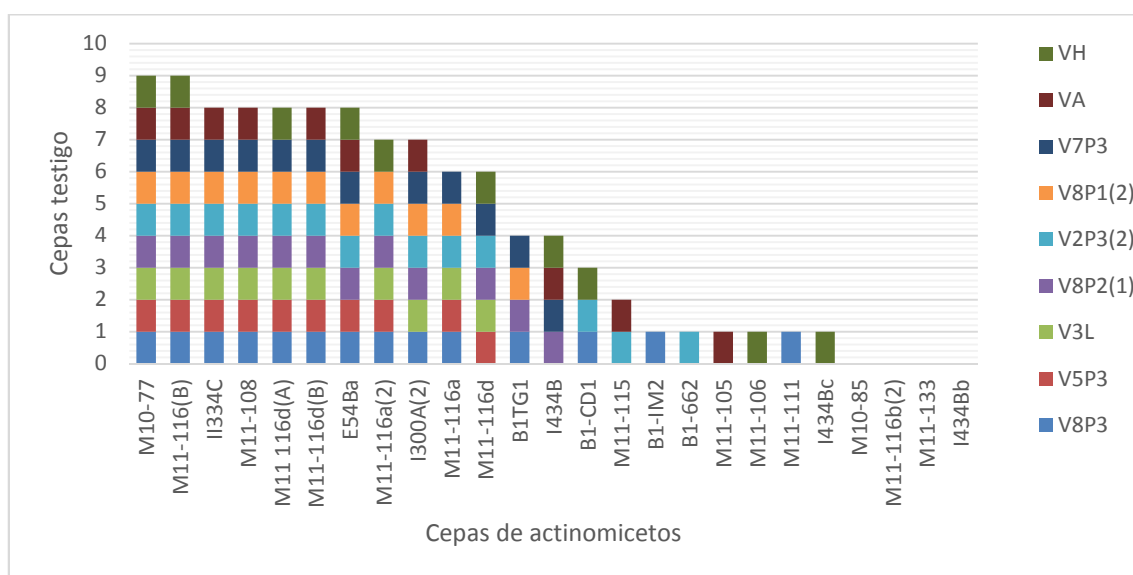
### 5.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA

Los resultados de la prueba de bicapa muestran que el 88% (22 cepas) de las 25 cepas probadas presentan actividad inhibitoria frente a alguna de las cepas de *Vibrio* (Anexo 4). Solo las cepas M10-77 y M11-116(B), inhibieron el crecimiento de las 7 cepas de *Vibrio* silvestres y los controles (**Figura 19**). Asimismo, el 56% (14 cepas) de actinomicetos logró inhibir el crecimiento de las cepas de *Vibrio* silvestre V8P3 y V2P3 (2) (**Figura 18**).

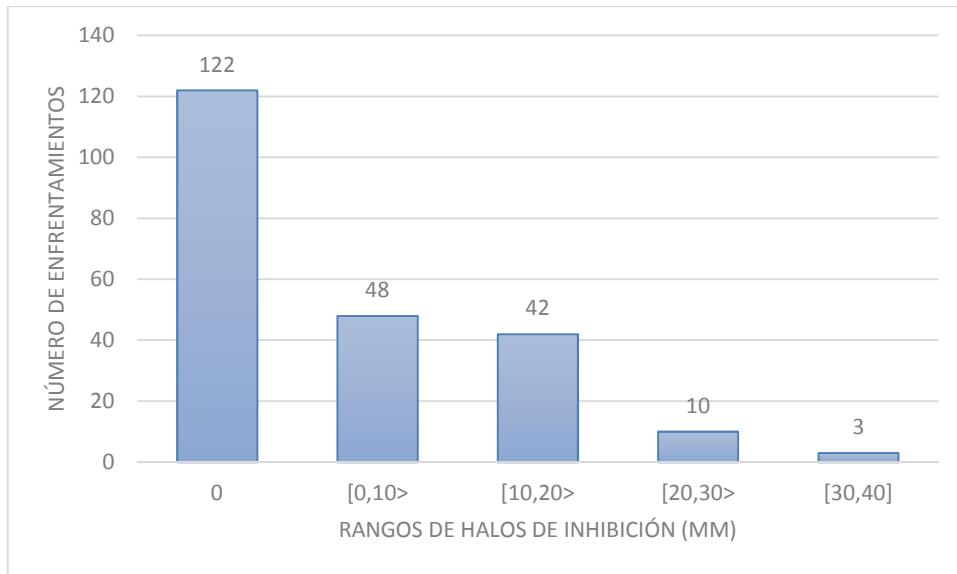
En la **Figura 22** se observa que la cepa M11-108 presentó los mayores halos de inhibición frente a las cepas de *Vibrio* (**Figura 23 y 24**), resaltando las cepas V8P1 (2) y V7P3, formando halos de 30,25 y 35,92 mm de diámetro respectivamente (**Figura 20 y 21**). Asimismo, cabe resaltar la actividad antagonista de ésta, frente a las 7 cepas de *Vibrio*.



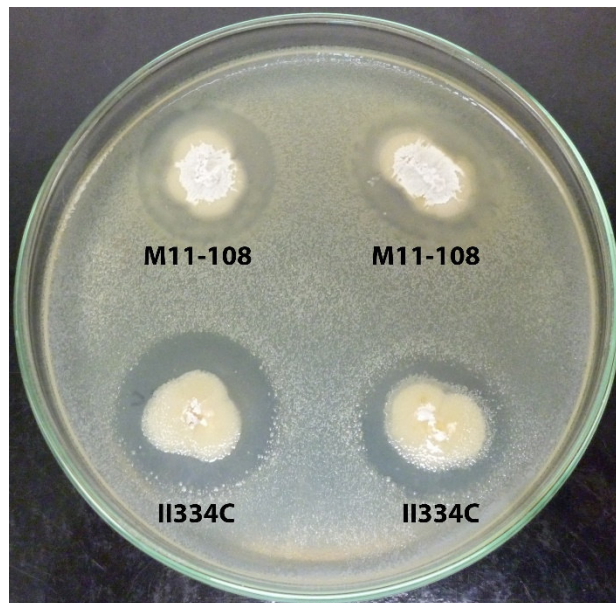
**Figura 18.** Porcentaje de actinomicetos antagonistas frente a cepas de *Vibrio*.



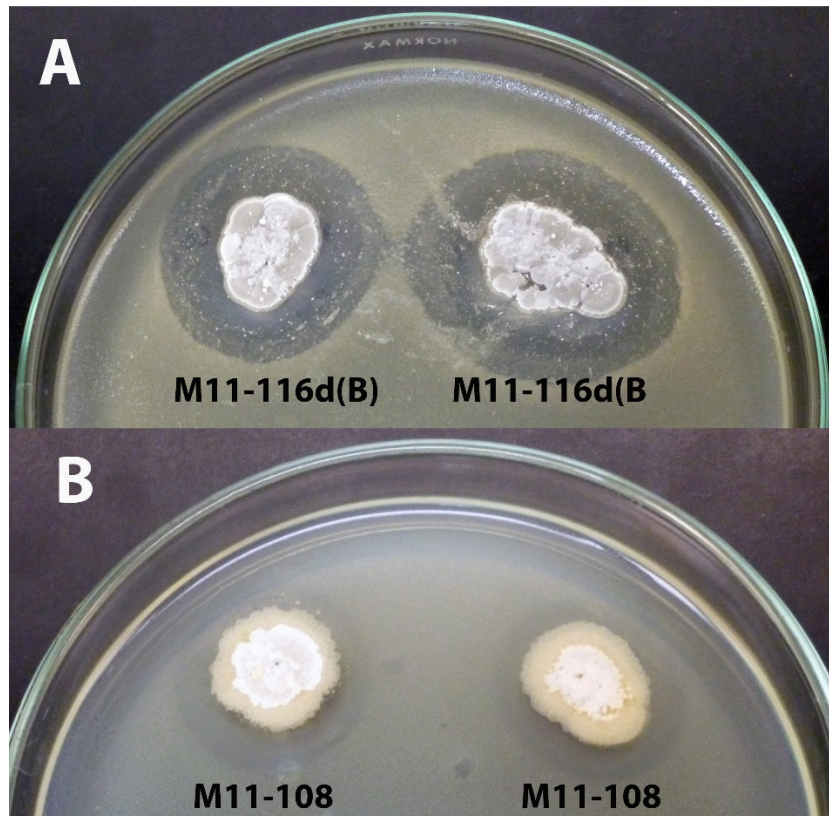
**Figura 19.** Frecuencia de la actividad antagonista de las 25 cepas de actinomicetos frente a las cepas de *Vibrio*.



**Figura 20.** Frecuencia de halos de inhibición (en mm de diámetro) de los actinomicetos frente a las cepas del género *Vibrio*.



**Figura 21.** Antagonismo de las cepas M11-108 y I1334C frente a *Vibrio* cepa V5P3, mediante la técnica de la “doble capa”.



**Figura 22.** Antagonismo de las cepas: (A) M11-116d(B) y (B) M11-108 frente a *Vibrio* cepa V3L (Método de la “doble capa”).

#### 5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Para este proceso fue seleccionada la cepa M11-108, la cual mostró mejores resultados de actividad inhibitoria de las cepas de *Vibrio* silvestres. El volumen adecuado utilizado para obtener la concentración de extracto suficiente para el desarrollo de las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria fue de 350 ml (**Figura 23**).



**Figura 23.** Cultivos de fermentación de la cepa M11-108 en agitación por 7 días.

Luego del tratamiento de fermentos con solventes orgánicos, se lograron obtener extractos de 48,6; 196,5 y 17,5 mg.ml<sup>-1</sup> utilizando Diclorometano, Butanol y Cloroformo respectivamente (**Figura 24**). Posteriormente, para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria se igualaron las concentraciones a 17,5 mg.ml<sup>-1</sup>.



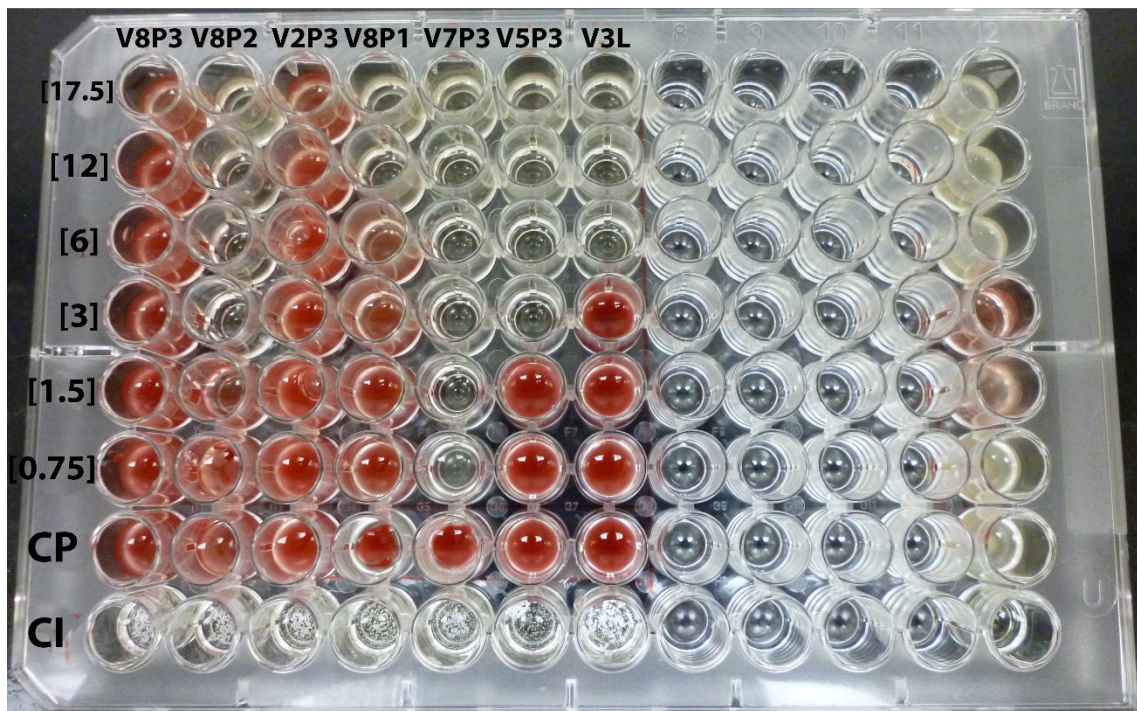
**Figura 24.** Sobrenadante de los cultivos de la cepa M11-108, con los solventes orgánicos: Cloroformo (A), Butanol (B) y Diclorometano (C).

Se logró determinar la Concentración Mínima Inhibitoria las 7 cepas de *Vibrio* silvestres con alguno de los solventes probados (**Tabla 10**). Las cepas V3L, V7P3, V8P1(2), V8P2(1) y V5P3 mostraron un valor de 0,3 mg.ml<sup>-1</sup> y la cepa V8P3 un valor de 0,15 mg.ml<sup>-1</sup> con el extracto diclorometánico. No se logró encontrar el valor de CMI de las cepas V8P1(2) y V8P2(1), sin embargo se logró determinar que estos valores serían menores a 0,075 mg.ml<sup>-1</sup> con el extracto clorofórmico (**Figura 25**).

**Tabla 9.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los 3 extractos de la cepa M11-108 frente a *Vibrio* spp.

CEPAS de <i>Vibrio</i>	EXTRACTOS (mg.ml <sup>-1</sup> )		
	DICLOROMETANO	BUTANOL	CLOROFORMO
V2P3(2)	>11,9	>21,6	>3,39
V3L	0,3	>21,6	1,2
V5P3	0,3	>21,6	2,4
V7P3	0,3	21,6	0,6
V8P1(2)	0,3	10,8	<0,075
V8P2(1)	0,3	10,8	<0,075
V8P3	0,15	>21,6	1,2
CONTROLES			
VA	0,3	7,8	1,2
VH	0,6	4,8	0,6
CC			+
CC+DMSO			+
CI (ácido nalidíxico)			-
CM			-

CC: control de crecimiento; CC+DMSO: Control de crecimiento de las cepas de *Vibrio* con DMSO; CI: control de inhibición usando ácido nalidíxico (0.01g.ml) y CM: control de esterilidad del medio; VA: *V. alginolyticus* y VP: *V. parahaemolyticus*

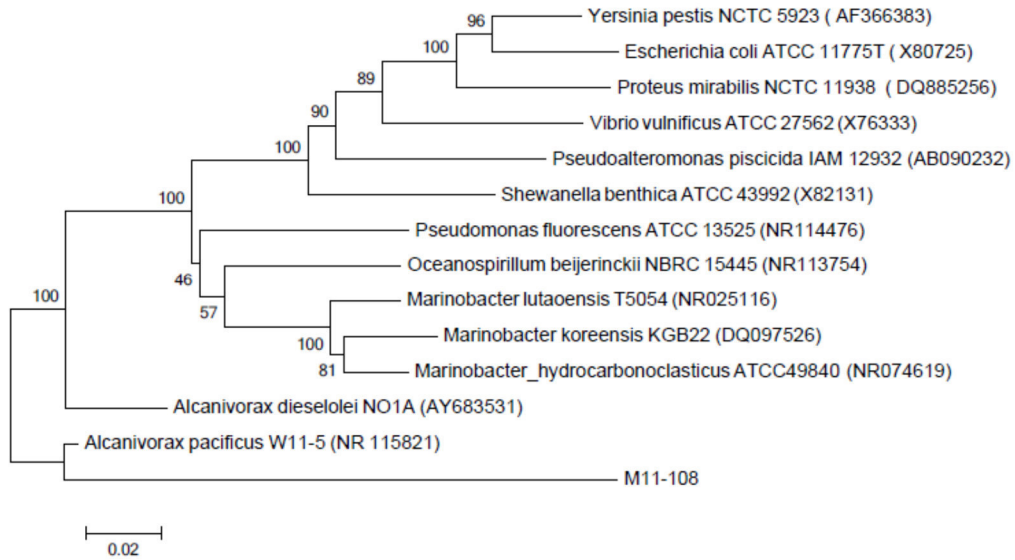


**Figura 25.** Prueba de CMI del extracto clorofórmico de la cepa M11-108 usando cloruro de trifenil tetrazolium (TTC) como revelador. CP: control de crecimiento del *Vibrio*, CI: control de inhibición del *Vibrio*.

### 5.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR LA CEPA M11-108 y *Vibrio*

La identificación de la cepa M11-108 basado en el gen 16S rRNA, no mostró relación cercana al grupo de los actinomicetales. Como se observa en la **Figura 26**, el género más cercano es *Alcanivorax pacificus*, con un porcentaje de similitud de 83%. No se realizó la comparación con los actinomicetos en el árbol filogenético debido a que estos están lejanamente relacionados, ya que el género *Alcanivorax* pertenece al filo Proteobacteria.



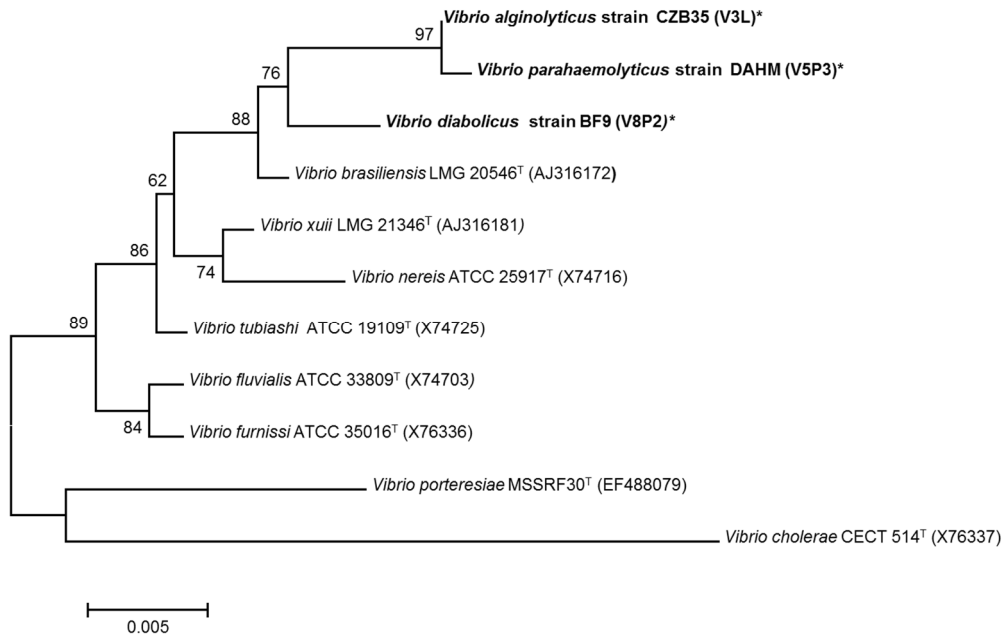


**Figura 26.** Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de la subunidad 16S rRNA de un cultivo puro de la cepa M11-108.

La identificación de las cepas aisladas de *L. vannamei* mostraron porcentajes de similitud de hasta 100% para las especies *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus* (**Figura 27**) (**Tabla 11**). En tanto la cepa V2P3 fue identificada como *Achromobacter* sp.

**Tabla 10.** Resultados de la identificación de las cepas aisladas de *L. vannamei*.

Cepas	
V2P3	<i>Achromobacter</i> sp. (98%)
V3L	<i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>V. parahaemolyticus</i> (100%)
V5P3	<i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>V. parahaemolyticus</i> (100%)
V7P3	<i>Vibrio</i> sp. (98%)
V8P1	<i>Vibrio diabolicus</i> / <i>V. mytili</i> (100%/ 99%)
V8P2	<i>Vibrio diabolicus</i> / <i>V. mytili</i> (99%)
V8P3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> / <i>V. diabolicus</i> (100%)



**Figura 27.** Árbol filogenético con base en la secuencia parcial de la subunidad 16S rRNA de cultivos puros de las cepas de *Vibrio* V8P2, V5P3 y V3L (Se observan en negrita). El árbol se construyó usando como base las secuencias de *Vibrio porteresiae* y *Vibrio cholerae*.

## 6 DISCUSIÓN

La comunidad bacteriana asociada con el “Langostino Blanco” ha sido investigado extensamente (Zhang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Pangastuti *et al.*, 2010), siendo las especies de vibrionales los patógenos primarios en la acuicultura del langostino (por ejemplo, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) (Longyant *et al.*, 2008; Defoirdt *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012) y *Rickettsia* (Nunan *et al.*, 2003; Flegel, 2012).

Zheng *et al.* (2016), realizaron un estudio para demostrar la diversidad de las comunidades bacterianas cultivables en larvas de “langostino blanco” en diferentes etapas de crecimiento y diferentes estados de salud, utilizando el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S, resultando que *Vibrio campbellii* (el cual ya había sido previamente reportando como potencial patógeno para *Penaeus monodon* y *L. vannamei*, por Huang *et al.* (2014) y *V. sinaloensis* poseían más alta y más baja patogenicidad, respectivamente, demostrando así que no todas las bacterias predominantes fueron responsables de alguna enfermedad. Asimismo, Pangastuti *et al.* (2010), mediante análisis de dos filotipos de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (TRFLP) sugirieron que no todas las especies de *Vibrio* son patógenas para el langostino. Por lo cual la alta diversidad microbiana en el langostino, desarrolla un papel fundamental manteniendo un equilibrio entre las bacterias nocivas y benéficas, lo cual evita la proliferación de patógenos oportunistas y futuras enfermedades (Pangastuti *et al.*, 2010). Es importante comprender también que en el presente estudio, a pesar de que las 7 cepas obtenidas fueron aisladas a partir de especímenes enfermos, no podemos confirmar que estos microorganismos hayan sido los causantes de la patogenicidad en el langostino. Sin embargo, existen otros reportes como el publicado por Peña-Navarro y Varela-Mejías (2015) que confirman la alta patogenicidad de las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* sp. y en particular, a las infecciones sistémicas causadas por la especie *V. parahaemolyticus* en *L. vannamei*

Los reportes de aislamientos de *Vibrio* en langostinos son diversos. Gomez-Gil *et al.* (1998), aislaron 21 cepas de *Vibrio* a partir del hepatopáncreas, hemolinfa y tracto digestivo de especímenes adultos de *L. vannamei*. Se reportaron pocas diferencias entre el número de especies aisladas del estómago, intestino y hepatopáncreas y el contenido de la hemolinfa presentaba un limitado número de bacterias. Suárez (2008) aisló 42 cepas de interés a partir de muestras de hemolinfa de langostinos de un cultivo semi-intensivo. Los cultivos en agar TCBS mostraron que estas colonias eran predominantemente sacarosas positivas y en su mayoría  $\geq$  a 2mm. De manera similar, las cepas del presente estudio resultaron fermentar la sacarosa en el agar TCBS, asimismo la cepa V3L, la cual también fue aislada de hemolinfa, fue posteriormente identificada como *V. alginolyticus*.

El estudio realizado por Jayasree *et al.* (2006) en *Penaeus monodon* utilizó la caracterización bioquímica indicada en el Manual de Bergey's Systematic Bacteriology (Baumann y Schubert, 1984). En el presente estudio también se realizaron algunas de estas pruebas, obteniendo algunas diferencias en el comportamiento de la cepa V8P3, identificada como *V. parahaemolyticus*, la cual logra fermentar la sacarosa, ocurriendo lo contrario en los microorganismos de la misma especie aislados por Jayasree *et al.* (2006). Otra notable diferencia es el comportamiento de esta especie frente a altas concentraciones de cloruro de sodio, pudiendo tolerar hasta 10%, a diferencia de las cepas aisladas de esta especie en *P. monodon*, que solo tolera 8%. Las características bioquímicas del *V. parahaemolyticus* varían principalmente en la prueba del indol y citrato, con algunas variaciones respecto al estudio realizado por Jayasree *et al.* (2006). Los resultados del presente estudio concordaron con los obtenidos por Ganesh *et al.* (2010) frente a *V. parahaemolyticus* aislados de pozas de cultivo de langostinos.

Las pruebas bioquímicas no deben ser consideradas como el principal criterio de clasificación para estudios de taxonomía o sistemática de los géneros bacterianos; asimismo, las pruebas bioquímicas representan parte de la caracterización fisiológica

de las cepas, por lo cual debe representar una aplicación necesaria y un filtro previo a los estudios moleculares (Noguerola y Blanch, 2008). Es necesario considerar que sin este primer filtro los costos y tiempo para la identificación bacteriana se incrementarían (Dulanto, 2013). Asimismo se han evidenciado problemas en la identificación de géneros bacterianos mediante el uso de sistemas estandarizados de identificación (API), ya que suelen haber muchas discordancias entre los resultados obtenidos mediante técnicas moleculares, principalmente cuando se trata de cepas ambientales.

Las bacterias del género *Vibrio* con resistencia a múltiples fármacos son bastante recurrentes en las pozas de cultivo de langostinos (Dos Santos *et al.*, 2016). En los últimos años, el uso intensivo de los antimicrobianos ha resultado una causa importante de la resistencia bacteriana (Martinez, 2009). Particularmente, la producción acuícola de organismos marinos, tales como el cultivo de langostinos, requieren una gran cantidad de sustancias antimicrobianas que son administradas excesivamente como promotores del crecimiento (Kümmerer, 2009). Los resultados del antibiograma realizado en este estudio, muestran que todas las cepas fueron sensibles al ciprofloxacino y al enroblend, mientras que 2 de las cepas fueron resistentes al florfenicol y al ácido nalidíxico. Estos datos son semejantes a los resultados obtenidos por Dos Santos *et al.* (2016), quienes aislaron 70 cepas de *Vibrio* y todas resultaron ser sensibles al ciprofloxacino, mientras que 33 cepas fueron resistentes al florfenicol.

Entre las cepas aisladas en este estudio, todas mostraron resistencia a la Novobiocina y a la penicilina G., lo cual se asemeja al estudio realizado por Jayasree *et al.* (2006), donde las 4 cepas de *Vibrio* aisladas y asociadas a las principales enfermedades del langostino *P. monodon*, mostraron ser resistentes a la penicilina G. Cabe resaltar que las cepas V8P3 y V2P3(2) fueron las que mostraron resistencia a la mayoría de las cepas probadas y particularmente al florfenicol, el cual es un antibiótico bastante usado por la industria acuícola, siendo efectivo en bacterias que han desarrollado la habilidad

de inactivar otros antibióticos incluyendo tiamfenicol y cloranfenicol (Santiago *et al.*, 2009).

El color del micelio aéreo y del sustrato son consideradas como características importantes para la agrupación y la identificación de caracteres importantes de los actinomicetos (Hesseltine *et al.*, 1954). Por lo cual, la caracterización del crecimiento de actinomicetos, particularmente del género *Streptomyces*, en los medios ISP resulta de mucha ayuda (Mohammd y Haidar, 2014; Selvakumar *et al.*, 2010).

Algunas investigaciones que han realizado aislamientos de actinomicetos a partir de muestras de sedimento de la Bahía de Bengala (India), encontraron colonias pigmentadas, algunas otras con pigmentos difusibles siendo color blanco y gris las más predominantes (Ramesh y Mathivanan, 2009); se ha reportado también la cepa *Streptomyces* sp. VITSTK 7, la cual produce pigmento amarillo en el micelio aéreo y rojo en el micelio del sustrato en el agar ISP 7 (Thenmozhi y Kannabiran, 2011). En el trabajo de Sirisha *et al.* (2013), la mayor parte de los actinomicetos marinos aislados produjeron colonias grises y blancas con pigmentación. Los aislados mostraron pigmentación amarilla, roja, negra y gris. Estos estudios reportan una amplia proporción de *Streptomyces* basados en la morfología de la colonia y la microscopía, asimismo concuerdan en la caracterización de las cepas aisladas en distintos años, siendo estos resultados semejantes a las características culturales observadas en el presente estudio con varias de las cepas obtenidas en Bahía Independencia, donde predominaron también pigmentos gris y blancos del micelio y, pigmentos solubles en su mayoría de color marrón gris y amarillo. Por lo tanto, la caracterización cultural y microscópica siguen siendo parámetros a tomar en cuenta en la identificación de actinomicetos. Sin embargo, cabe resaltar que las características fisiológicas de actinomicetos pueden variar en función a los nutrientes disponibles y las condiciones físicas del medio en el que se encuentren, siendo éstas determinantes en la identificación a nivel de género (Vijayakumar *et al.*, 2010).

Las cepas que presentaron un mejor potencial antimicrobiano fueron seleccionadas para un proceso de identificación morfológica más profunda, como fue la caracterización en medios ISP, microcultivos y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). En el caso de la cepa M11-108, el crecimiento en los distintos medios de cultivo evidenció un comportamiento cultural típico de cualquier actinomiceto. Asimismo, el microcultivo de 7 días mostró filamentos delgados con abundantes esporas alrededor. Sin embargo, la observación por Microscopía Electrónica de Barrido a partir de cultivos de 5 días en agar marino mostró células bacilares, sin ninguna evidencia de filamentos o esporas alrededor, por lo cual resultó más que necesario complementar el análisis con métodos más exactos para la identificación de esta cepa como las técnicas moleculares.

Con la creciente preocupación sobre la protección del medio ambiente, el uso de enzimas, en particular de los microorganismos extremófilos, ganaron una considerable atención en muchos procesos industriales (Zhang y Kim, 2010). En los últimos años, las enzimas microbianas han ido sustituyendo los catalizadores químicos en la fabricación de productos químicos, textiles, productos farmacéuticos, papel, alimentos y productos químicos agrícolas (Manivasagan *et al.*, 2013). En el caso de actinomicetos terrestres, muchos investigadores informaron de la producción de diversas enzimas industriales (Goshev *et al.*, 2005). Parte de la colección de actinomicetos analizada en este estudio fue reportada en un trabajo previo realizado por León *et al.* (2007), donde la totalidad de cepas de actinomicetos marinos (65 cepas) producen algún tipo de enzima extracelular, siendo los productores de caseinasa, los que mostraron mayor actividad enzimática seguida por las lipasas de tipo tween esterases y lecitinasas. Estos resultados concuerdan con lo reportado para las 25 cepas evaluadas en el presente estudio donde se resalta la actividad proteolítica sobre la gelatina (96%), seguido por la actividad amilolítica (80%) y lipasas de tipo lecitinasas (64%). Otro de los trabajos realizados por León *et al.* (2016), reportaron que las enzimas más abundantes obtenidas

a partir de las 27 cepas de actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* fueron las gelatinasas (81%).

En el estudio realizado por Selvakumar *et al.* (2010), los actinomicetos aislados de esponjas fueron capaces de licuar la gelatina e hidrolizar la caseína, el almidón y la celulosa, asimismo la degradación de la urea se llevó a cabo con eficacia por las cepas AQBCD11 y AQBMM35. Resultados similares se obtuvieron en este estudio ya que el 96% (24) de las cepas logró hidrolizar la gelatina, lográndose incluso en muchos casos una hidrólisis total. Por otro lado, los reportes de hidrólisis de la urea en microorganismos marinos sigue siendo escasa, como en nuestro estudio solo se evidenció la producción de esta enzima en 36% (7 de las 25 cepas).

Los aislamientos de actinomicetos realizados a partir de sedimento marino de la Bahía de Bengala realizados por Ramesh *et al.* (2009); Thenmozhi y Kannabiran (2011); Sirisha *et al.* (2013); Augustine *et al.* (2013) indican que estos poseen un potencial significativo de secretar una amplia gama de enzimas hidrolíticas, mostrando que la mayoría de las cepas produjeron lipasas, caseinasas, gelatinasas, quitinasas, L-asparaginasas, celulasas, desoxirribonucleasas y amilasas. En el presente estudio, el 8 % (2) de las cepas obtenidas de Bahía Independencia y Bahía de Ancón, lograron hidrolizar todos los sustratos probados, así como muchos de ellos degradaron de manera particular cada sustrato probado.

Es importante destacar también que la mayoría de los actinomicetos aislados en el presente estudio produjeron lipasas. La población de actinomicetos productores de lipasa es relativamente grande en el entorno marino, porque el océano contiene cantidades significativas de polímeros (Ramesh y Mathivanan 2009). Los microorganismos tienen que producir la enzima lipasa para degradar los polímeros con el fin de adaptarse en el ambiente extremo. Por lo cual, la actividad multienzimática en localidades como Bahía Independencia y Bahía de Ancón, son fuentes potenciales para el descubrimiento de moléculas o enzimas industrialmente útiles (León *et al.*, 2007).



En un estudio similar al presente trabajo realizado por Chau *et al.* (2011), en el que se aislaron actinomicetos a partir de muestras de sedimentos de estanques de langostinos y de manera paralela se aislaron microorganismos del género *Vibrio* a partir del músculo e hígado de langostinos (*Penaeus monodon*) moribundos de estanques de cultivo, se obtuvieron, a partir de la prueba de “doble capa, halos de inhibición de 40 y 36 mm. Dichos resultados indican un potencial similar al obtenido en este estudio ya que el máximo valor en halos reportado fue de 35.9 mm frente al *Vibrio* sp. V7P3. La prueba de doble capa resultó sumamente útil para la selección cualitativa de actinomicetos con actividad anti-*Vibrio*. En el presente estudio, se utilizó la información de la medida de los halos de inhibición como un filtro previo a la preparación de los extractos orgánicos.

Es importante, también, resaltar que en un “screening” de antagonismo es más sencillo evidenciar la inhibición de microorganismos Gram positivos a diferencia de los Gram negativos, esto debido principalmente a la compleja estructura de la pared celular de estos últimos. Existen diversos reportes (Devi *et al.*, 2006; Dhanasekaran *et al.*, 2009) en los que se plantea que los actinomicetos, en particular, las especies de *Streptomyces*, muestran actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Valli *et al.* (2012), aislaron 21 actinomicetos a partir de muestras de sedimento marino, de las cuales, la cepa C11 mostró actividad frente a especies de *Staphylococcus* (13 mm), *Pseudomonas* (12 mm) y *V. harveyi* (11 mm); y la cepa C12 mostró actividad frente a especies de *Staphylococcus* (16 mm), *B. subtilis* (11 mm), *Pseudomonas* (10 mm) y *V. harveyi* (9 mm). La mayor inhibición se mostró frente a especies de *Staphylococcus*. Asimismo, la colección de actinomicetos de sedimento marino de Bahía Independencia ya había sido probada anteriormente frente a algunos patógenos estándares Gram positivos y negativos, resultando también un mayor porcentaje de inhibición frente a Gram positivos. Cabe resaltar también que la actividad antagonista puede variar de una cepa estándar a una cepa silvestre, así se trate del mismo género, esto debido a todos los

factores de resistencia a los que están expuestos estos microorganismos en sus diversos hábitats.

Existen estudios donde se reporta el aislamiento de actinomicetos a partir de sedimento de los cultivos de langostinos. You *et al.* (2005) realizaron el aislamiento de 94 cepas de actinomicetos aislados de langostinos en China, donde el 51% (47) inhibió a alguna de las cepas de *Vibrio* y el 24,5% (23) inhibió a 7 especies de *Vibrio* patógenas de peces y langostinos. La mayoría de las cepas antagonistas resultaron ser del género *Streptomyces*. Das *et al.* (2010) aislaron 43 cepas a partir langostineras en Australia, la actividad antimicrobiana de estas cepas fue probada frente a 5 cepas de *Vibrio*, patógenos de peces: *V. harveyi* V890, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus* V760, *V. anguillarum* V572 y *V. alginolyticus* V34; encontrándose que 12 de estas tienen actividad antimicrobiana como se demostró en el ensayo de antagonismo. De las 12 cepas, 2 fueron antagonistas frente a los 5 patógenos y sólo 8 aislamientos lograron inhibir a *V. harveyi*. León *et al.* (2016), reportaron que el 37% (10) del total de cepas que obtuvieron, presentaban actividad anti *Vibrio* frente a las especies *V. vulnificus*, *V. anguillarum* y *V. alginolyticus*. En el presente estudio el 88% (22) de las 25 cepas probadas logró presentar actividad inhibitoria frente a alguna de las cepas de *Vibrio* probadas y el 8% (2) de éstas logró inhibir a las 9 cepas de *Vibrio*, además se encontró que 10 cepas lograban inhibir a *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.

El modo probable de la acción de los actinomicetos frente a las bacterias patógenas, se basa en liberar antibióticos en una especie de guerra bioquímica para eliminar los microorganismos competidores del medio ambiente (Chau *et al.*, 2011). Investigaciones recientes indican el enorme potencial de actinomicetos marinos, en particular, especies de *Streptomyces* como una fuente útil y sostenible de nuevos productos naturales bioactivos. Asimismo, pueden formar esporas resistentes al calor y a la desecación, permitiendo así que los productos probióticos sean fáciles de preservar (Manivasagan *et al.*, 2013). Por lo tanto, los resultados de la presente investigación revelan que los

actinomicetos marinos de Bahía Independencia son una fuente potencial de nuevos antibióticos. Teniendo en cuenta estos resultados, los actinomicetos deben ser considerados como posibles cepas probióticas en el cultivo de langostinos. You *et al.* (2005, 2007) describieron el potencial de actinomicetos frente a cepas patógenas de *Vibrio* spp. de langostinos. Kumar *et al.* (2016), extrajeron el producto antibiótico de actinomicetos marinos y lo incorporaron en el alimento para observar el efecto *in vivo* sobre el virus de la mancha blanca en el “camarón tigre negro”. Das *et al.* (2006) informaron de un estudio preliminar sobre el efecto de la suplementación probiótica de *Streptomyces* en el crecimiento y prevención de las enfermedades del “camarón tigre negro” (*Penaeus monodon*).

Los compuestos bioactivos son extraídos por medio de varias técnicas. La extracción con solventes orgánicos se emplea generalmente para la extracción de metabolitos secundarios a partir del cultivo filtrados. Particularmente para la extracción de compuestos bioactivos a partir de actinomicetos, se han realizado diversos estudios donde se han puesto a prueba diferentes polaridades de solventes orgánicos: acetato de etilo, acetato de butilo, etanol, metanol, cloroformo, n-butanol, n-hexano, éter de petróleo, cloroformo benceno y xileno (Selvameenal *et al.*, 2009), siendo los solventes polares y en particular el acetato de etilo, los que han mostrado mejor actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos. Mientras que otros extractos mostraron una actividad moderada contra patógenos (Vijayakumar *et al.*, 2010). En el presente estudio se tomaron en cuenta varios criterios para la selección de los solventes orgánicos, en primer lugar se quiso probar la eficiencia del solvente al concentrar metabolitos en función a su naturaleza polar o apolar. La polaridad es una característica muy importante de los solventes debido a que determina la solubilidad, por lo cual se seleccionó al diclorometano y butanol, los cuales son solventes polares aprótico y prótico respectivamente y, al cloroformo que es de naturaleza no polar. Adicionalmente también

se tomaron en cuenta el costo y la viabilidad de conseguir los solventes, ya que como se sabe estos son actualmente productos controlados.

Existen diversos estudios que confirman la eficacia de los extractos obtenidos a partir de acetato de etilo, reportándose una destacada actividad antagonista frente a *Streptococcus* sp. (El-shatoury *et al.*, 2009), *S. aureus* MDR (Sathish y Kokati, 2012), *S. aureus* y *B. megaterium* (Ravi *et al.*, 2015), bacterias Gram-positivas en su mayoría (Singh *et al.*, 2014) y también frente a algunos microorganismos Gram negativos como *E. coli* (Meena *et al.*, 2013), *S. typhimurium* y *S. sonnei*. Los resultados demuestran claramente que las bacterias Gram positivas fueron altamente susceptibles a los extractos crudos probados en comparación con bacterias Gram negativas. La sensibilidad entre bacterias Gram positivas y Gram negativas podrían atribuirse a sus diferencias morfológicas, tales como la membrana externa de las bacterias Gram negativas que tienen lipopolisacáridos que hacen que la pared celular sea impermeable a los extractos lipofílicos (Gebreyohannes *et al.*, 2013). Pero, una bacteria Gram positiva sería más susceptible debido a la falta de membrana externa (Sibanda *et al.*, 2010).

Existen también otros reportes respecto a otros solventes utilizados como por ejemplo en el estudio realizado por Valan *et al.* (2014) aislaron actinomicetos cuyos extractos hexánicos mostraron actividad antibacteriana de amplio espectro y el extracto de cloroformo logró inhibir Gram positivas. Kumar *et al.* (2012) aislaron el actinomiceto Loyola PBT VAS 10, cuyo extracto de acetato de etilo mostró una actividad moderada frente a *V. parahaemolyticus*. Sumitha y Philip, (2006) extrajeron metabolitos antimicrobianos de actinomicetos con acetato de etilo, hexano y 1-butanol, los cuales presentaron actividad anti-*Vibrio*. Laidi *et al.* (2008) a partir de la cepa de actinomiceto RAF- 10, reportaron que el n-hexano, cloroformo y éter dietílico fueron solventes ineficientes, mientras que el n-butanol resulto eficiente para la extracción de compuestos activos.

Al comparar los valores de CMI de los 3 extractos, notamos que el extracto diclorometánico fue con el que se obtuvieron los menores valores para la mayoría de las cepas silvestres como para las cepas utilizadas como controles, en segundo lugar el extracto clorofórmico también resultó bastante eficiente frente a alguna de las cepas a pesar de su naturaleza apolar. Los solventes polares, en particular, los de naturaleza prótica como el acetato de etilo (Palaniappan *et al.*, 2013) son los que presentan mejor capacidad para concentrar metabolitos. En este estudio el extracto diclorometánico fue el que presentó valores entre 0,15 - 1,2 mg.ml<sup>-1</sup> frente a las distintas cepas de *Vibrio* silvestres, siendo estos valores menores a diferencia de los obtenidos por los extractos butanólico y clorofórmico de la cepa M11-108. Asimismo, estos resultados son similares a los obtenidos por León *et al.* (2016), donde los extractos diclorometánicos de actinomicetos aislados de *A. purpuratus*, obtuvieron valores entre 0,25 a más de 500 µg.ml<sup>-1</sup> entre las cepas de *Vibrio* probadas.

Existen pocos reportes con resultados resaltantes obtenidos a partir de extractos preparados con solventes apolares. En el trabajo presentado por Valan *et al.* (2014) se prueba la eficiencia de distintos solventes tanto polares como apolares, entre ellos el cloroformo y el hexano. Sin embargo, el extracto clorofórmico no presentó ningún tipo de actividad frente *V. fischeri* MTCC 1738, a diferencia del extracto hexánico que si presentó un valor de 0,01 mg.ml<sup>-1</sup> frente a la misma cepa. Este valor es aún menor a los valores determinados por las cepas V8P1(2) y V8P2(1), cuyo valor es menor a 0,075 mg.ml<sup>-1</sup>, frente al extracto clorofórmico. Por lo cual no se puede descartar la posibilidad de que los solventes apolares logran recuperar con eficacia metabolitos con actividad anti-*Vibrio*.

Los resultados obtenidos a partir de las cepas de *Vibrio* aisladas de *L. vannamei* y las cepas control que se usaron en este caso, aisladas a partir de patógenos de peces, presentan valores similares. Cabe resaltar que las cepas silvestres siempre resultan

más difíciles de inhibir debido a la mayor cantidad de mecanismos de resistencia que pueden haber adquirido de su medio ambiente a diferencia de una cepa estándar.

Un estudio muy similar al presentado fue realizado por Mohanraj y Sekar (2013), donde a partir del extracto de acetato de etilo producido a partir de la cepa de *Streptomyces* LCJ94, aislada de la Bahía de Bengala (India), produjo valores de CMI de 0,25 mg.ml<sup>-1</sup> frente a *V. harveyi* y *V. vulnificus*, y 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> frente a *V. alginolyticus*. Estos valores son similares a los resultados obtenidos en el presente estudio en el cual se obtuvo el valor de 0,6 y 0,3 mg.ml<sup>-1</sup> para las cepas *V. harveyi* y *V. alginolyticus* V3L usando el extracto diclorometánico siendo en ambos casos cepas silvestres patógenas de langostinos.

Con base en los resultados obtenidos a partir del antibiograma, se observa que el grupo de las quinolonas como el enrofloxacino y el florfenicol son los que resultan más efectivos frente a las cepas de *Vibrio* silvestres, por lo cual se seleccionó al ácido nalidixico (10 mg.ml<sup>-1</sup>) como control de las pruebas de CMI, logrando inhibir todas las cepas. De esta manera se pudo evidenciar que nuestras cepas son bastante sensibles al grupo de las quinolonas y en particular al ácido nalidixico. En el estudio realizado por Soto *et al.* (2010) se evaluó la CMI de algunos antibióticos comerciales como enrofloxacina (0,0059 mg.ml<sup>-1</sup>) y florfenicol (0,0115 mg.ml<sup>-1</sup>), frente a una cepa patógena de langostino *V. harveyi*.

Por otro lado, si comparamos los valores de estos antibióticos comerciales frente a los valores obtenidos por los extractos de la cepa M11-108 observamos que la mayoría de estos últimos son valores más altos. Reportes previos mostraron que ciprofloxacino resulta ser el más activo de las quinolonas. Zanetti *et al.* (2001) informaron de que el CIM de ciprofloxacino fue de 0,38 mg.L<sup>-1</sup> para el control de *Vibrio* spp. aislado del medio ambiente. Por lo tanto, estos valores son similares a los obtenidos por el extracto

diclorometánico de la cepa M11-108, o incluso mayor, en comparación con el valor de CMI de la cepa V8P3.

Estudios moleculares preliminares de la cepa M11-108 indican que ésta no estaría relacionada al phylum de las Actinobacterias; pruebas basadas en el análisis filogenético señalan que pertenece aparentemente al filo de las Proteobacterias. Sin embargo, estudios previos como hemos señalado anteriormente muestran un comportamiento cultural propio de los actinomicetos marinos. La cepa M11-108 presentó un porcentaje de similitud de 83% con la especie *Alcanivorax pacificus*. El género *Alcanivorax* fue reportado por primera vez por Yakimov *et al.* (1998), siendo aislado de agua y sedimento marino. Se describe como un género que utiliza exclusivamente hidrocarburos de petróleo como fuente de carbono y energía y, con potencial uso en procesos de biorremediación en los sistemas costeros marinos contaminados (Bookstaver *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que el porcentaje de similitud con la especie *A. pacificus* de la cepa M11-108 es bastante bajo, esta podría tratarse de un nuevo género dentro de la familia *Alcanivoraceae*, por lo cual se requiere realizar un análisis más completo para su confirmación. Si fuera este el caso, esta cepa sería el primer reporte de *Alcanivorax* para el Perú y el primer reporte en donde se muestra esta cepa como un productor de metabolitos secundarios.

Los resultados de la identificación de las cepas aisladas de *L. vannamei* demostraron que 6 de estas cepas pertenecen al género *Vibrio*, lo cual no coincide con los resultados determinados por el API 20 NE, el cual identifica a la mayoría de estas cepas como *Aeromonas* entre un 70 - 99.9% de similitud. Los sistemas como API 20E y API 20NE son los más utilizados para analizar la diversidad de las especies de *Vibrio* asociadas a los organismos marinos y sus hábitats. Sin embargo, diversos estudios resaltan la insuficiencia de los sistemas API para la identificación del género *Vibrio*, lo cual implica que se requieran de ciertas modificaciones en esos sistemas en cuanto a las condiciones de incubación e inoculación (Topic Popovic *et al.*, 2007; Croci *et al.*, 2007).

Asimismo, varios autores afirmaron que a pesar de las ventajas presentadas por los sistemas API en cuanto a su ejecución rápida, estos mostraron una menor eficiencia en la identificación de *V. parahaemolyticus*, esto debido a la gran variabilidad de las características de diagnóstico entre las especies (Crocini *et al.*, 2007), por lo cual el análisis molecular se considera necesario, ya sea para pruebas adicionales confirmatorias o para un determinado método de identificación (Fabbro *et al.*, 2010).

Cabe resaltar también el hecho de que la cepa V2P3(2), la cual fue aislada en agar TCBS (medio de cultivo selectivo para *Vibrio*), fue identificada mediante 16S rRNA como perteneciente al género *Achromobacter* sp. Además esta cepa había mostrado, en pruebas preliminares de concentración de sales, que no es halotolerante la cual es una característica bastante común en el género *Vibrio*.

Por otro lado, hasta el momento no se había reportado la especie *V. diabolicus* en los cultivos de *L. vannamei* en el Perú, siendo este el único reporte de esta especie asociada a *L. vannamei* en nuestro medio. Fue Dos Santos *et al.* (2016) quienes reportaron el aislamiento de 70 cepas de *Vibrio* del estuario de Acaraú (Brasil), donde se lleva a cabo el cultivo de *L. vannamei*. Del total, tres cepas fueron identificadas como *V. diabolicus*, las cuales fueron aisladas procedentes del agua y sedimento del estuario.

Finalmente, las bacterias de sedimento marino del orden de los Actinomicetales resultan inhibir el desarrollo de especies patógenas de *Vibrio* en *Litopenaeus vannamei*, por lo cual los ambientes marinos representan una fuente promisoría de microorganismos capaces de producir metabolitos secundarios novedosos, así como potenciales candidatos probióticos.



## 7 CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia del género *Vibrio* en hepatopáncreas y hemolinfa de especímenes enfermos de *Litopenaeus vannamei* “langostino blanco” de cultivos controlados.
2. Se reporta por primera vez la presencia de *Vibrio diabolicus* V8P2 en cultivos de *L. vannamei* en el Perú.
3. Un porcentaje elevado (88%) de las 25 cepas evaluadas en este estudio, aisladas de sedimentos marinos de Bahía Independencia y Bahía de Ancón, presentan actividad inhibitoria frente a cepas de *Vibrio* aisladas de *Litopenaeus vannamei*, siendo la cepa M11-108 la que presentó un mejor potencial antagonista.
4. Los extractos diclorometánico y clorofórmico de la cepa M11-108 fueron eficaces frente a cepas de *Vibrio* aislados de *L. vannamei* en concentraciones de 0,15 y 0,075 mg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente.
5. A pesar de su semejanza fenotípica con los actinomicetos, la identificación molecular preliminar de la cepa M11-108 indica que está más relacionada a la *Alcanivorax pacificus*, sin embargo el porcentaje de similitud es bajo, lo que amerita realizar estudios complementarios a nivel molecular.

## 8 RECOMENDACIONES

- Complementar el análisis molecular de las cepas de *Vibrio* aisladas, mediante el uso de otros marcadores moleculares, como los genes esenciales para el desarrollo de la célula (“*housekeeping genes*”).
- Realizar la caracterización química de los metabolitos encontrados en la cepa M11-108, utilizando técnicas analíticas de mayor rendimiento como Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC).
- Realizar un estudio taxonómico polifásico de la cepa M11-108 y describir el organismo en detalle.
- Realizar pruebas preliminares *in vivo* de la cepa M11-108, en estanques de *Litopenaeus vannamei*, para corroborar su potencial capacidad como microorganismo probiótico.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-GUZMAN, G., LÓPEZ-ACEVEDO, E. y VÁZQUEZ-SAUCEDA, M. 2013. Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria*, vol. 4, pp. 121-127.

ALDAY-SANZ, V., ROQUE, A. and TURNBULL, J.F. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms*, vol. 48, pp. 91-99.

ALTSCHUP, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. and LIPMAN, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of molecular biology*, vol. 215, pp. 403-410.

ÁLVAREZ, J.D., AUSTIN, B., ÁLVAREZ, A. y AGURTO, C. 2000. Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de camarones marinos sanos silvestres y cultivados en Venezuela. *Veterinaria Tropical*, vol. 25, no. 1, pp. 5-27.

AUGUSTINE, D., JACOB, J.C., RAMYA, K.D. and PHILIP, R. 2013. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal : Biochemical and physiological characterization. *International Journal of Research in Marine Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 56-63.

AUSTIN, B. 2008. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, vol. 140, pp. 310-317. ISSN 03781135. DOI 10.1016/j.vetmic.2009.03.015.

BALCÁZAR, J.L., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., CUNNINGHAM, D., VENDRELL, D. and MÚZQUIZ, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, vol. 114, no. 3-4, pp. 173-186. ISSN 03781135. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.

BATICADOS, M., LAVILLA PITOGO, C., CRUZ-LACIERDA, E., DE LA PEÑA, L. and SUNAZ, N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi*

and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases of aquatic organisms*, vol. 9, pp. 133-139.

BAUER, R.T. 1998. Gill-cleaning mechanisms of the crayfish *Procambarus clarkii* (Astacidea : Cambaridae): experimental testing of setobranch function. *Invertebrate biology*, vol. 117, no. 2, pp. 129-143.

BECERRIL, A. 2011. *Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: Diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa*. S.I.: Universidad Autónoma de Baja California.

BOOKSTAVER, M., GODFRIN, M.P., BOSE, A. and TRIPATHI, A. 2015. Journal of Petroleum Science and Engineering An insight into the growth of *Alcanivorax borkumensis* under different inoculation conditions. *Journal of Petroleum Science and Engineering* [en línea], vol. 129, pp. 153-158. ISSN 0920-4105. DOI 10.1016/j.petrol.2015.02.038. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2015.02.038>.

Carvajal, A.M. "Valores hematológicos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de laboratorio en relación con la costa de origen, estadio de muda, peso y sexo". Tesis de grado. Corporación Universitaria de Ciencias Aplicadas y Ambientales "UDCA". Santafé de Bogotá, 1999.

CHALLIS, G.L. and HOPWOOD, D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 2, pp. 14555-14561.

CHAU, N., HIEU, N., THUAN, L., MATSUMOTO, M. and MIYAJIMA, I. 2011. Identification and Characterization of Actinomycetes Antagonistic to *Vibrio* spp. Isolated from Isolated from Shrimp Culture Pond in Thua Thien Hue – Viet Nam. *Journal of the*

*Faculty of Agriculture, Kyushu University*, vol. 56, no. 1, pp. 15-22.

COOK, DAVID, W. and LOFTON, S. 1973. Chitinoclastic Bacteria Associated with Shell Disease in *Penaeus* Shrimp and the Blue Crab (*Callinectes sapidus*). *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 9, pp. 154-159.

CROCI, L., SUFFREDINI, E., COZZI, L., TOTI, L., OTTAVIANI, D., PRUZZO, C., SERRATORE, P., FISCHETTI, R., LOFFREDO, G., MIONI, R. and The *Vibrio parahaemolyticus* WORKING GROUP. 2007. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal applied Microbiology*, vol. 102, pp. 229-237. DOI 10.1111/j.1365-2672.2006.03046.x.

DAS, S., LYLA, P.S. and KHAN, S.A. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science* [en línea], vol. 90, no. 10, pp. 1325–1335. ISSN 00113891. Disponible en: <http://www.ias.ac.in/currsci/may252006/1325.pdf>.

DAS, S., WARD, L.R. and BURKE, C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied microbiology and biotechnology* [en línea], vol. 81, no. 3, pp. 419-29. [Consulta: 4 noviembre 2013]. ISSN 1432-0614. DOI 10.1007/s00253-008-1731-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841358>.

DAS, S., WARD, L.R. and BURKE, C. 2010. Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture* [en línea], vol. 305, no. 1-4, pp. 32-41. ISSN 0044-8486. DOI 10.1016/j.aquaculture.2010.04.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.001>.

DE LIMA, R., DA SILVA, I., KASSAWARA, M., DE AZEVEDO, J. and DE ARAUJO, J. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* [en línea], vol. 16, no. 5, pp. 466-71. [Consulta: 1 junio 2013]. ISSN 1678-4391. DOI

10.1016/j.bjid.2012.08.014.

Disponible

en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975171>.

DEFOIRDT, T., BOON, N., BOSSIER, P. and VERSTRAETE, W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing : an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, vol. 240, pp. 69-88. DOI 10.1016/j.aquaculture.2004.06.031.

DEFOIRDT, T., SORGELOOS, P. and BOSSIER, P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, no. 3, pp. 251-258. ISSN 13695274. DOI 10.1016/j.mib.2011.03.004.

DEVI, N., JEYARANI, M. and BALAKRISHNAN, K. 2006. Isolation and Identification of Marine Actinomycetes and their Potencial in Antimicrobial Activity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 9, no. 3, pp. 470-472.

DHANASEKARAN, D., SELVAMANI, S., PANNEERSELVAM, A. and THAJUDDIN, N. 2009. Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estuary , Annagkoil , Tamil Nadu. *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 17, pp. 4159-4162.

DOS SANTOS, R., VIANA, O. and SILVA, R. 2016. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* [en línea], vol. 105, no. 1, pp. 337-340. ISSN 0025-326X. DOI 10.1016/j.marpolbul.2016.02.001.

Disponible

en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.001>.

DULANTO GOMEZ, Jimmy Ronald. "Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "Langostino Blanco" *Litopenaeus vannamei*". Asesor: Jorge León. Tesis Título Profesional. UNMSM. EAP Ciencias Biológicas, Lima-Tumbes-Perú. 2014.

EDEMAR, R., BELTRAME, E. y SEIFFERT, W. Despesca e Transporte de pós-larvas. Curso internacional de "Produção de pós-larvas de camarão marinho ". Florianópolis, Brasil. 1996, pp 153-156.

EL-SHATOURY, S.A., EL-SHENAWY, N.S. and ABD EL-SALAM, I.M. 2009. Antimicrobial, antitumor and in vivo cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], vol. 25, no. 9, pp. 1547-1555. ISSN 0959-3993. DOI 10.1007/s11274-009-0040-4. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/222028086?accountid=12268>.

EMBLEY, T.M. and STACKEBRANDT, E. 1994. The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, vol. 48, pp. 257-289.

FABBRO, C., CATALETTO, B. and NEGRO, P. Del 2010. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* through. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 307, pp. 158-164. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.01969.x.

FAO. Visión general del sector acuícola nacional. 2015. [En línea] [Fecha de consulta: 26 de marzo 2016]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_peru/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_peru/es).

FAO. Programa de información de especies acuáticas - *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). 2016. [En línea] [Fecha de consulta: 15 de marzo 2014]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es).

FELING, R.H., BUCHANAN, G.O., MINCER, T.J., KAUFFMAN, C.A., JENSEN, P.R. and FENICAL, W. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, no. 3, pp. 355-357. ISSN 14337851. DOI 10.1002/anie.200390115.

FELSENSTEIN, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American*

*Naturalist*, vol. 125, pp. 1-15.

FENICAL, W. and JENSEN, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, vol. 2, no. 12, pp. 666-673. ISSN 1552-4450. DOI 10.1038/nchembio841.

FLEGEL, T.W. 2012. Historic emergence , impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 110, no. 2, pp. 166-173. ISSN 0022-2011. DOI 10.1016/j.jip.2012.03.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>.

FRANCO CORREA, M. "*Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores De Micorrizas*". Asesor: José Barea Navarro, Tesis para optar al título de Doctor. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Granada - España 2008.

GALINDO CABELLO, Nadia Regina. "*Potencial antiparasitario de los metabolitos extracelulares de actinomicetos aislados de esponjas marinas frente a Leishmania (viannia) peruviana y Leishmania (v.) braziliensis*". Asesor: Jorge León. Tesis Título Profesional. UNMSM. EAP Microbiología y Parasitología, Lima-Perú. 2014.

GANESH, E.A., DAS, S., CHANDRASEKAR, K., ARUN, G. and BALAMURUGAN, S. 2010. Monitoring of Total Heterotrophic Bacteria and *Vibrio* Spp . in an Aquaculture Pond. *Current Research Journal of Biological Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 48-52.

GAO, B. and GUPTA, R.S. 2012. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 76, no. 1, pp. 66-112. DOI 10.1128/MMBR.05011-11.

GEBREYOHANNES, G., MOGES, F., SAHILE, S. and RAJA, N. 2013. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [en



[en línea], vol. 3, no. 6, pp. 426-435. [Consulta: 1 junio 2013]. ISSN 22211691. DOI 10.1016/S2221-1691(13)60092-1. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169113600921>.

GOMEZ-GIL, B., THOMPSON, C., MATSUMURA, Y., SAWABE, T., IIDA, T., CHRISTEN, R., THOMPSON, F. and SAWABE, T. 2014. *The Prokaryotes – Gammaproteobacteria*. S.l.: s.n. ISBN 9783642389221.

GOMEZ-GIL, B., THOMPSON, F.L., THOMPSON, C.C., GARCIA-GASCAS, A., ROQUE, A. and SWINGS, J. 2004. *Vibrio hispanicus* sp . nov ., isolated from Artemia sp . and sea water in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, pp. 261-265. DOI 10.1099/ij.s.0.02775-0.

GOMEZ-GIL, B., TRON-MAYEN, L., ROQUE, A., TURNBULL, J.F., INGLIS, V. and GUERRA-FLORES, A.L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas , haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, vol. 163, pp. 1-9.

GORAJANA, A., M, V., VINJAMURI, S., KURADA, B.V.V.S.N., PEELA, S., JANGAM, P., POLURI, E. and ZEECK, A. 2007. Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *Microbiological Research* [en línea], vol. 162, no. 4, pp. 322-327. ISSN 09445013. DOI 10.1016/j.micres.2006.01.012. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501306000140>.

GOSHEV, I., GOUSTEROVA, A., VASILEVA, E. and NEDKOV, P. 2005. Characterization of the enzyme complex produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials. *Process Biochemistry*, vol. 40, pp. 1627-1631. DOI 10.1016/j.procbio.2004.06.016.

HAMADA, M., TAMURA, T., YAMAMURA, H., SUZUKI, K. and HAYAKAMA, M. 2012. *Lysinimicrobium mangrovi* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the

rhizosphere of a mangrove. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 62, pp. 1731-1735. DOI 10.1099/ij.s.0.035493-0.

HEIDELBERG, J.F., HEIDELBERG, K.B. and COLWELL, R.R. 2002. Bacteria of the  $\gamma$ -Subclass Proteobacteria Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5498-5507. DOI 10.1128/AEM.68.11.5498.

HEPPELL, J. and DAVIS, H. 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 43, pp. 29-43.

HESEL TINE, C.W., BENEDICT, R.G. and PRIDHAM, T.G. 1954. Useful criteria for species differentiation in the genus *Streptomyces*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 60, pp. 136-151.

HIGGINBOTHAM, S.J. and MURPHY, C.D. 2010. Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research* [en línea], vol. 165, no. 1, pp. 82-86. ISSN 0944-5013. DOI 10.1016/j.micres.2008.12.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2008.12.004>.

HOA, P., MANAGAKI, S., NAKADA, N., TAKADA, H., SHIMIZU, A., ANH, D., VIET, P. and SUZUKI, S. 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment* [en línea], vol. 409, no. 15, pp. 2894-2901. ISSN 0048-9697. DOI 10.1016/j.scitotenv.2011.04.030. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.030>.

HUANG, H., LV, J., HU, Y., FANG, Z. and ZHANG, K. 2008. *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, pp. 17-20. DOI

10.1099/jjs.0.64484-0.

HUANG, Z., LI, X., WANG, L. and SHAO, Z. 2014. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of White shrimp , *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, pp. 1-10. DOI 10.1111/are.12628.

HUGHES, C.C., PRIETO-DAVO, A., JENSEN, P.R. and FENICAL, W. 2008. The Marinopyrroles , Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp . *Organic Letters*, vol. 10, no. 4, pp. 629-631.

IMADA, C., KOSEKI, N., KAMATA, M., KOBAYASHI, T. and HAMADA-SATO, N. 2007. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, vol. 21, no. 1, pp. 27-31. ISSN 0914-5818. DOI 10.3209/saj.SAJ210104.

INS 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima Perú:

JAYASREE, L., JANAKIRAM, P. and MADHAVI, R. 2006. Characterization of *Vibrio* spp . Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 37, no. 4, pp. 523-532.

JENSEN, P.R., MINCER, T.J., WILLIAMS, P.G. and FENICAL, W. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 87, no. 1, pp. 43-48. ISSN 00036072. DOI 10.1007/s10482-004-6540-1.

JIANG, H., LIU, X., CHANG, Y., LIU, M. and WANG, G. 2013. Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64 , *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone , *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish and Shellfish Immunology* [en línea], vol. 35, no. 1, pp. 86-91. ISSN 1050-4648. DOI 10.1016/j.fsi.2013.04.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.009>.

JIMÉNEZ, D.P. 2011. *Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintasas tipo I en actinomicetos aislados a partir de Hormigas Cortadoras de hojas Atta cephalotes*. S.l.: Universidad Industrial de Santander.

KUMAR, S., PHILIP, R. and ACHUTHANKUTTY, C. 2016. Antiviral property of marine actinomycetes against White Spot Syndrome Virus in penaeid shrimps. *Current Science*, vol. 91, no. 6, pp. 807-811.

KUMAR, V., BHARTI, A., GUPTA, V.K., GUSAIN, O. and BISHT, G.S. 2012. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: Isolation and screening for their antibacterial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 871-880. ISSN 09593993. DOI 10.1007/s11274-011-0884-2.

KÜMMERER, K. 2009. Chemosphere Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* [en línea], vol. 75, no. 4, pp. 417-434. ISSN 0045-6535. DOI 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.

LAIDI, R., SIFOUR, M., SAKR, M. and HACENE, H. 2008. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, pp. 2235-2241. DOI 10.1007/s11274-008-9735-1.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MC GETTIGAN, P.A., MC WILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. and HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2 . 0. *Bioinformatics applications note*, vol. 23, no. 21, pp. 2947-2948. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.

LEÓN QUISPE, Jorge. “Cepas nativas del Bacterioneuston Marino con actividad antagónica frente a bacterias ictiopatógenas. Caracterización preliminary de sustancias inhibitorias”. Asesor: Patricio García-Tello. Tesis de Maestría. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Valparaíso-Chile. 1996.

LEÓN, J., APONTE, J.J., CUADRA, D.L., GALINDO, N., JARAMILLO, L., VALLEJO, M. y MARGUET, E. 2016. Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología marina y Oceanografía*, vol. 51, pp. 69-80. DOI 10.4067/S0718-19572016000100007.

LEÓN, J., LIZA, L., SOTO, I., CUADRA, D., PATIÑO, L. y ZERPA, R. 2007. Actinomicetos bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista peruana de Biología*, vol. 14, no. 2, pp. 259-270.

LEYTON, Y. y RIQUELME, C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología marina y Oceanografía*, vol. 43, no. 3, pp. 441-456. ISSN 0718-1957. DOI 10.4067/S0718-19572008000300004.

LI, Q., CHEN, X., JIANG, Y. and JIANG, C. 2016. Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. *Morphological Identification of Actinobacteria*. S.l.: s.n., pp. 59-86.

LIGHTNER, D. V 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 106, no. 1, pp. 110-130. ISSN 0022-2011. DOI 10.1016/j.jip.2010.09.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>.

LIU, H., LI, Z., TAN, B., LAO, Y., DUAN, Z., SUN, W. and DONG, X. 2014. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity

and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* [en línea], vol. 41, no. 2, pp. 300-307. ISSN 10504648. DOI 10.1016/j.fsi.2014.08.028. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464814003131>.

LONGYANT, S., RUKPRATANPORN, S., CHAIVISUTHANGKURA, P., SUKSAWAD, P., SRISUK, C., SITHIGORNGUL, W., PIYATIRATITIVORAKUL, S. and SITHIGORNGUL, P. 2008. Identification of *Vibrio* spp . in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 98, pp. 63-68. DOI 10.1016/j.jip.2007.10.013.

LOVETT, D. and FELDER, D. 1990. Ontogenetic Changes in Enzyme Distribution and Midgut Function in Developmental Stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea , Decapoda, Penaeidae). *Biological Bulletin*, vol. 178, pp. 160-174.

MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., SIVAKUMAR, K. and KIM, S.-K. 2013. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological research* [en línea], vol. 168, no. 6, pp. 311-332. [Consulta: 21 mayo 2013]. ISSN 1618-0623. DOI 10.1016/j.micres.2013.02.002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480961>.

MARTINEZ, J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* [en línea], vol. 157, no. 11, pp. 2893-2902. ISSN 0269-7491. DOI 10.1016/j.envpol.2009.05.051. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>.

MATSUMOTO, A., KASAI, H., MATSUO, Y., ÖMURA, S., SHIZURI, Y. and TAKAHASHI, Y. 2009. *Ilumatobacter fluminis* gen . nov ., sp . nov ., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. *Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 205, pp. 201-205.

MAYER, A.M.S., GLASER, K.B., CUEVAS, C., JACOBS, R.S., KEM, W., LITTLE, R.D., MCINTOSH, J.M., NEWMAN, D.J., POTTS, B.C. and SHUSTER, D.E. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Cell Press*, vol. 31, pp. 255-265. DOI 10.1016/j.tips.2010.02.005.

MC ARTHUR, K.A., MITCHELL, S.S., TSUENG, G., RHEINGOLD, A., WHITE, D.J., GRODBERG, J., LAM, K.S. and POTTS, B.C.M. 2008. Lynamincins A - E , Chlorinated Bisindole Pyrrole Antibiotics from a Novel Marine. *Journal of Natural Products*, vol. 71, pp. 1732-1737.

MEENA, B., RAJAN, L.A., VINITHKUMAR, N.V. and KIRUBAGARAN, R. 2013. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. *BMC microbiology* [en línea], vol. 13, no. 1, pp. 1-17. ISSN 1471-2180. DOI 10.1186/1471-2180-13-145. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3695772&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.

MOHAJERI, J., AFSHARNASAB, M., JALALI, B., KAKOOLAKI, S., SHARIFROHANI, M. and HAGHIGHI, A. 2011. Immunological and histopathological changes in *Penaeus semisulcatus* challenged with *Vibrio harveyi*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 252-265.

MOHAMMAD, E. and HAIDAR, N. 2014. Extraction and Purification of Antimicrobial agent Produced from Actinomycetes Isolated from Agriculture Soils Abstract: *Journal Of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 1-10.

MOHANRAJ, G. and SEKAR, T. 2013. Antagonistic activity of marine *Streptomyces* sp LCJ94 against the shrimp pathogens. *Annals of Biological Research*, vol. 4, no. 4, pp. 224-227.

MORALES, V. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Cartilla Pradepesca. 1990, pp 1.

MORAN, M. A., RUTHERFORD, L.T. and HODSON, R.E. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 10, pp. 3695-3700. ISSN 00992240.

NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T. and VUTHIPHANDCHAI, V. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology* [en línea], vol. 159, pp. 443-450. ISSN 03781135. DOI 10.1016/j.vetmic.2012.04.029. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>.

NOGUEROLA, I. and BLANCH, A.R. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *Journal of applied microbiology*, vol. 105, no. 1, pp. 175-85. DOI 10.1111/j.1365-2672.2008.03730.x.

NUNAN, L.M., NOBLE, B., LE GROUMELLE, M. and LIGHTNER, D. V 2003. Experimental infection of *Penaeus vannamei* by a *Rickettsia* like bacterium (RLB) originating from *P. monodon*. *Diseases of aquatic organisms*, vol. 54, pp. 43-48.

OH, D., GONTANG, E.A., KAUFFMAN, C.A., JENSEN, P.R. and FENICAL, W. 2008. Salinipyrones and Pacificanones, Mixed-Precursor Polyketides from the Marine Actinomycete *Salinispora pacifica*. *NIH Public Access*, vol. 71, no. 4, pp. 1-21. DOI 10.1021/np0705155.Salinipyrones.

OLANO, C., MÉNDEZ, C. and SALAS, J.A. 2009. Antitumor compounds from actinomycetes : from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, vol. 26, pp. 628-660. DOI 10.1039/b822528a.



OTERO JIMÉNEZ, V. "Aislamiento , selección e identificación de actinomicetos , bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante , a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la costa atlántica colombiana. Asesor: María Teresa Reguero. Tesis para optar al grado de Magister, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá - Colombia, 2011.

PALANIAPPAN, S., PANCHANATHAN, M., PACKIYARAJ, V., KANNAN, S., SHANMUGAM, S., SUBRAMANIAM, P., VISWANATHAN, M., SHANMUGAM, V. and BALASUBRAMANIAN, T. 2013. Antibacterial and brine shrimp lethality effect of marine actinobacterium *Streptomyces* sp. CAS72 against human pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* [en línea], vol. 3, no. 4, pp. 286-293. [Consulta: 19 julio 2013]. ISSN 22221808. DOI 10.1016/S2222-1808(13)60071-7. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2222180813600717>.

PANDIYAN, P., BALARAMAN, D., THIRUNAVUKKARASU, R., GEORGE, E.G.J., SUBARAMANIYAN, K., MANIKKAM, S. and SADAYAPPAN, B. 2013. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today* [en línea], vol. 5, no. 1, pp. 55-59. ISSN 09757619. DOI 10.1016/j.dit.2013.03.003. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0975761913000082>.

PANGASTUTI, A., SUWANTO, A., LESTARI, Y. and SUHARTONO, M.T. 2010. Bacterial communities associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversitas*, vol. 11, no. 2, pp. 65-68. ISSN 1412033X. DOI 10.13057/biodiv/d110203.

PEÑA-NAVARRO, N. y VARELA MEJÍAS, A. 2015. Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana* [en línea], vol. 26, no. 1, pp. 43-53. ISSN 2215-3608. DOI 10.15517/am.v26i1.16892. Disponible en: <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/16892>.

PRADA, L. "*Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos*". Asesora: Marcela Franco Correa, Tesis para optar al grado de Magister. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá - Colombia, 2013.

PRUDHOMME, J., MCDANIEL, E., PONTS, N., BERTANI, S., FENICAL, W., JENSEN, P. and LE ROCH, K. 2008. Marine Actinomycetes : A New Source of Compounds against the Human Malaria Parasite. *PLoS ONE*, vol. 3, no. 6, pp. 1-8. DOI 10.1371/journal.pone.0002335.

RAMESH, S. and MATHIVANAN, N. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], vol. 25, no. 12, pp. 2103-2111. ISSN 0959-3993. DOI 10.1007/s11274-009-0113-4. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/221990076?accountid=12268>.

RAMESH, S., RAJESH, M. and MATHIVANAN, N. 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces* fungicidicus MML1614. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [en línea], vol. 32, no. 6, pp. 791-791-800. ISSN 1615-7591. DOI 10.1007/s00449-009-0305-1. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/215879856?accountid=12268>.

RAO, V., 2008. *Vibriosis en la acuicultura del camarón*. 2008. S.l.: s.n.

RAVI, K., VASANTBA, J., BHOOMI, M., BONISHA, T. and BHUMIKA, C. 2015. Antibacterial Potentials of Actinomycetes Isolated from Gujarat. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 30, no. 15, pp. 78-83.

RIEDLINGER, J., REICKE, A., ZÄHNER, H., KRISMER, B., BULL, A.T., MALDONADO, L.A., WARD, A.C., GOODFELLOW, M., BISTER, B., BISCHOFF, D., SÜSSMUTH, R.D. and FIEDLER, H.-P. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid

pathway produced by the marine *Verrucosisspora* strain AB-18-032. *The Journal of antibiotics*, vol. 57, no. 4, pp. 271-279. ISSN 0021-8820. DOI 10.7164/antibiotics.57.271.

RONSON-PAULÍN, J.Á. y MEDINA-REYNA, C.E. 2002. Probióticos en la acuicultura. *Ciencia y Mar*, pp. 45-49.

ROSENBERRY, R. About shrimp farming. 2009. [En línea] [Fecha de consulta: 17 de marzo 2016]. Disponible en: <http://www.shrimpnews.com/About.html>).

SANTIAGO, M., ESPINOSA, A. y BERMÚDEZ, M. del C. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40, no. 3, pp. 22-32.

SATHISH, K.S.R. and KOKATI, V.B.R. 2012. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* [en línea], pp. 787-92. [Consulta: 1 junio 2013]. ISSN 2221-1691. DOI 10.1016/S2221-1691(12)60230-5. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3609227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SELVAKUMAR, D., ARUN, K., SUGUNA, S., KUMAR, D. and DHEVENDARAN, K. 2010. Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. *Iranian Journal of Microbiology*, vol. 2, no. 3, pp. 157-164. ISSN 20083289.

SELVAMEENAL, L., RADHAKRISHNAN, M. and BALAGURUNATHAN, R. 2009. Antibiotic Pigment from Desert Soil Actinomycetes ; Biological Activity , Purification and Chemical Screening. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 71, no. 5, pp. 499-504.

SHARIFF, M., YUSOFF, F.M., DEVARAJA, T.N. and RAO, P.S.S. 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp , *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. *Aquaculture Research*, vol. 32, pp. 181-187.

SHEN, W., FU, L., LI, W. and ZHU, Y. 2010. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth , performance , immune response and antioxidant activities of the shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ). *Aquaculture Research*, vol. 41, pp. 1691-1698. DOI 10.1111/j.1365-2109.2010.02554.x.

SHIRLING, E.B. and GOTTLIEB, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 16, no. 3, pp. 313-340. ISSN 0020-7713. DOI 10.1099/00207713-16-3-313.

SIBANDA, T., MABINYA, L. V, MAZOMBA, N., AKINPELU, D.A., BERNARD, K., OLANIRAN, A.O. and OKOH, A.I. 2010. Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 11, pp. 2612-2623. DOI 10.3390/ijms11072612.

SINGH, L.S., SHARMA, H. and TALUKDAR, N.C. 2014. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiology* [en línea], vol. 14, no. 278, pp. 1-13. ISSN 1471-2180. DOI 10.1186/s12866-014-0278-3. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/278>.

SIRISHA, B., HARITHA, R., MOHAN, Y.J., KUMAR, K.S. and RAMANA, T. 2013. Bioactive Compounds from Marine Actinomycetes Isolated from the Sediments of Bay of Bengal. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 257-264.

SIZEMORE, R.K. and DAVIS, J.W. 1985. Source of *Vibrio* spp . found in the Hemolymph of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 46, pp. 109-110.

SOTO-RODRIGUEZ, S., GOMEZ-GIL, B. and LOZANO, R. 2010. 'Bright-red' Syndrome

in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms*, vol. 92, pp. 11-19. DOI 10.3354/dao02274.

STACKEBRANDT, E. 1991. Aspects on the Evolution and Phylogeny of the Actinomycetes. *Actinomycetologica*, vol. 5, pp. 56-63.

SUÁREZ, C. "*Cuantificación y caracterización molecular de bacterias de hemolinfa de camarones *Litopenaeus vannamei* durante brotes del síndrome de mancha blanca y evaluación de sensibilidad a cinco productos antibacterianos*". Asesor: Jorge Cuellar Anjel. Tesis para optar al Título Profesional. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Bogotá- Colombia 2008.

SUBRAMANI, R. and AALBERSBERG, W. 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research* [en línea], vol. 167, pp. 571-580. [Consulta: 1 junio 2013]. ISSN 1618-0623. DOI 10.1016/j.micres.2012.06.005. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796410>.

SUBRAMANI, R. and AALBERSBERG, W. 2013. Culturable rare Actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, pp. 9291-9321. ISSN 01757598. DOI 10.1007/s00253-013-5229-7.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. and KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* [en línea], vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729. ISSN 0737-4038. DOI 10.1093/molbev/mst197. Disponible en: <http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/molbev/mst197>.

TARAZONA, J., GUTIÉRREZ, D., PAREDES, C. and INDACOCHEA, A. 2003. Overview and challenges of marine biodiversity research in peru. *Gayana*, vol. 67, no. 2, pp. 206-231.

THENMOZHI, M. and KANNABIRAN, K. 2011. Anti-Aspergillus activity of *Streptomyces* sp. VITSTK7 isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, India. *Journal of Natural & Environmental Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 1-8.

THOMPSON, J.R., RANDA, M.A., MARCELINO, L.A., TOMITA-MITCHELL, A., LIM, E. and POLZ, M.F. 2004. Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community. *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, no. 7, pp. 4103-4110. DOI 10.1128/AEM.70.7.4103.

THOMPSON, JR. and POLZ, MF. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*. ASM Press. Washington DC. 2006, 13: 190-203.

TOPIC POPOVIC, N., COZ-RAKOVAC, R. and STRUNJAK-PEROVIC, I. 2007. Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: A review. *Veterinarni Medicina*, vol. 52, no. 2, pp. 49-53. ISSN 03758427.

TRUJILLO, T., AGUIRRE, G., SÁNCHEZ, J.G. y RÁBAGO, J. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Ciencia y Mar*, vol. 27, no. 9, pp. 11-18.

URAKAWA, H. and RIVERA, IN. Aquatic environment. *The biology of vibrios*. ASM Press. Washington DC. 2006, 12: 175-189.

VALAN, M., REJINIEMON, T.S., AL-DHABI, N.A., DURAI PANDIYAN., V., AGASTIAN, P., HUXLEY, V.A.J., SONG, C.E. and CHOI, K.C. 2014. In vitro antimicrobial potential of organic solvent extracts of novel actinomycetes isolated from forest soil. *African Journal of Biotechnology* [en línea], vol. 13, no. 18, pp. 1891-1897. ISSN 1684-5315. DOI 10.5897/AJB2013.13555. Disponible en: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/EF34E2244436>.

VALLI, S., SUVATHI, S.S., AYSHA, O., NIRMALA, P., VINOTH, K.P. and REENA, A.

2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [en línea], pp. 469-473. ISSN 22211691. DOI 10.1016/S2221-1691(12)60078-1. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60078-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60078-1).

VASEEHARAN, B., RAMASAMY, P., MURUGAN, T. and CHEN, J.C. 2005. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 26, no. 4, pp. 285-291. ISSN 09248579. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2005.07.005.

VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P. and VERSTRAETE, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 4, pp. 655-671. ISSN 1092-2172. DOI 10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.Updated.

VIJAYAKUMAR, R., MURUGESAN, S. and PANNEERSELVAM, A. 2010. Isolation, Characterization and antimicrobial activity of actinobacteria from point Climere Coastal Region, East Coast of India. *International Research Journal of Pharmacy*, vol. 1, no. 1, pp. 358-365.

WANG, D., XUE, Q., MA, Y., WEI, X., CHEN, J. and HE, F. 2014. Oligotrophy is Helpful for the Isolation of Bioactive Actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology* [en línea], vol. 54, no. 2, pp. 178-184. ISSN 0046-8991. DOI 10.1007/s12088-014-0444-1. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-014-0444-1>.

WANG, X.H. and LEUNG, K.Y. 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*, vol. 146, pp. 989-998.

WATNICK, P.I., LAURIANO, C.M., KLOSE, K.E., CROAL, L. and KOLTER, R. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 223-235.

WORDEN, A.Z., SEIDEL, M., SMRIGA, S., WICK, A., MALFATTI, F., BARTLETT, D. and AZAM, F. 2006. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environmental Microbiology*, vol. 8, no. 1, pp. 21-29. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00863.x.

YAKIMOV, M.M., GOLYSHIN, P.N., LANG, S., MOORE, E.R.B., ABRAHAM, W., LUNSDORF, H. and TIMMIS, K.N. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new , hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 48, pp. 339-348.

YANO, Y., HAMANO, K., TSUTSUI, I., AUE-UMNEOY, D., BAN, M. and SATOMI, M. 2015. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiology* [en línea], vol. 47, pp. 21-27. ISSN 07400020. DOI 10.1016/j.fm.2014.11.003. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014002639>.

YOU, J., XUE, X., CAO, L., LU, X., WANG, J., ZHANG, L. and ZHOU, S. 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 76, no. 5, pp. 1137-1144. ISSN 01757598. DOI 10.1007/s00253-007-1074-x.

YOU, J.L., CAO, L.X., LIU, G.F., ZHOU, S.N., TAN, H.M. and LIN, Y.C. 2005. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], vol. 21, pp. 679-682. ISSN 0959-3993. DOI 10.1007/s11274-004-3851-3. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/752073270?accountid=12268>.

ZANETTI, S., SPANU, T., DERIU, A., ROMANO, L., SECHI, L.A. and FADDA, G. 2001. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp . isolated from the environment. *International Journal*



of *Antimicrobial Agents*, vol. 17, pp. 407-409.

ZHANG, C. and KIM, S. 2010. Research and Application of Marine Microbial Enzymes : Status and Prospects. *Marine Drugs*, vol. 8, pp. 1920-1934. DOI 10.3390/md8061920.

ZHANG, M., SUN, Y., CHEN, K., YU, N., ZHOU, Z., CHEN, L., DU, Z. and LI, E. 2014. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture* [en línea], vol. 434, pp. 449-455. ISSN 00448486. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.09.008. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848614004578>.

ZHENG, Y., YU, M., LIU, Y., SU, Y., XU, T., YU, M. and ZHANG, X. 2016. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture* [en línea], vol. 451, pp. 163-169. ISSN 0044-8486. DOI 10.1016/j.aquaculture.2015.09.020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>.

ZHOU, J., FANG, W., YANG, X., ZHOU, S., HU, L., LI, X. and QI, X. 2012. A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strain Is Associated with “ Bacterial White Tail Disease ” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, pp. 1-6. DOI 10.1371/journal.pone.0029961.

## 10 ANEXOS

### ANEXO 1

#### COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO DE ACTINOMICETOS

##### Agar Marino

Componente	g.l <sup>-1</sup>
Extracto de levadura	1
Peptona de soya	4
Agua de mar	750 ml
Agua destilada	250 ml

##### ISP 2: Agar Extracto de Levadura – Extracto de Malta

Componente	g.l <sup>-1</sup>
Extracto de malta	10
Extracto de levadura	4
Dextrosa	4
Agua destilada	1000 ml
Agar	15

##### ISP 3: Agar Avena

Componente	g.l <sup>-1</sup>
Avena*	18
Agar	15
Solución Trasa	1 ml
Agua destilada	1000 ml

\*Hervir el agua con la avena por 20 min.

#### ISP 4: Agar Sales Inogánicas - Almidón

Componente	g.l <sup>-1</sup>
Almidón	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
NaCl	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
CaCO <sub>3</sub>	2
Solución Trasa	1 ml
Agua destilada	1000 ml
Agar	15

#### ISP 5: Agar Glicerol Asparagina

Componente	g.l <sup>-1</sup>
Glicerol	10
L-asparagina	4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4
Solución Trasa	1 ml
Agua destilada	1000 ml
Agar	15

#### ISP 6: Agar Peptona-Extracto de Levadura Hierro

Componente	g.l <sup>-1</sup>
Bacto peptona	15
Proteosa Peptona	5
Extracto de levadura	1
Citrato de amonico férrico	0.5
Fosfato dipotásico	1
Tiosulfato sódico	0.08
Agua destilada	1000 ml
Agar	15

### ISP 7: Agar Tirosina

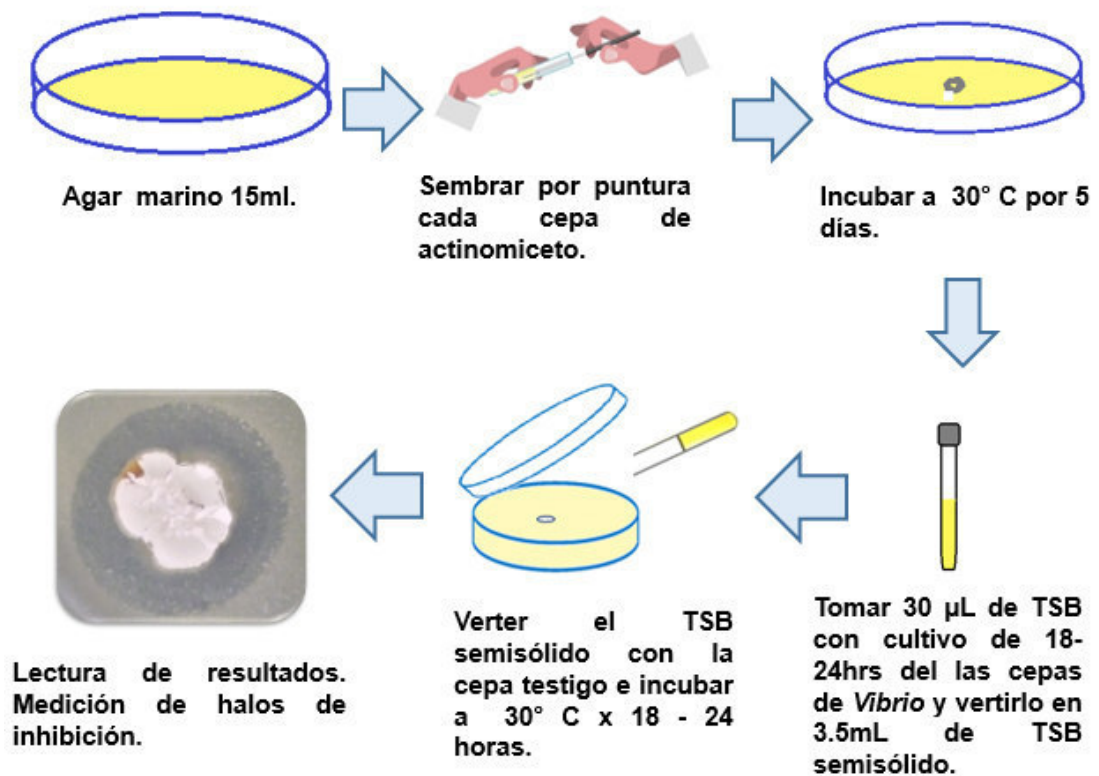
Componente	g.l <sup>-1</sup>
Glicerol	15
L-asparagina	1
L-Tirosina	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
NaCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Solución Trasa	1 ml
Agua destilada	1000 ml
Agar	15

### Solución Trasa

Componente	g.l <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
Agua destilada	1000 ml

## ANEXO 2

### PRUEBA DE ANTAGONISMO: MÉTODO DE LA “DOBLE CAPA”.

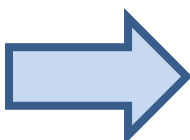


### ANEXO 3

#### PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS



Fermentación en Caldo Marino x 7 días, 150rpm



Centrifugación 4500 RPM por 25min



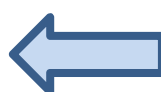
Agregar Diclorometano, butanol y cloroformo en proporción V:V a cada matraz.



Separación de fases



Evaporación de los solventes orgánicos en el rotavapor



Extractos orgánicos

## ANEXO 4

Tabla de resultados de la prueba de la “Doble capa” de los actinomicetos frente a las cepas de *Vibrio* expresados en halos de inhibición (mm).

Cepas	Cepas silvestres							Cepas control		
	V8P3	V5P3	V3L	V8P2(1)	V2P3(2)	V8P1(2)	V7P3	VA	VP	VH
B1-CD1	1,83	0	0	0	3,88	0	0	0	NH	3,5
B1-IM2	7	0	0	0	0	0	0	0	NH	0
B1TG1	7,38	0	0	13,25	0	10,17	14,25	0	NH	NC
B1-662	0	0	0	0	25,25	0	0	0	NH	0
II334C	28,38	9,67	3	10,25	16	10,63	11	6	13,5	NC
M10-77	21	10,96	14,75	21,17	19,5	19,08	21,5	17	18,88	15,75
M10-85	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	0
M11-105	0	0	0	0	0	0	0	3,5	NH	0
M11-106	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	4
M11-108	29,17	12,17	8,88	29,42	6	30,25	35,92	32,9	31	NC
M11-111	8,5	0	0	0	0	0	0	0	NH	0
M11-115	0	0	0	0	12	0	0	6,5	NH	0
M11-116a	4,25	6	8,5	0	0,5	5	5,13	0	NH	0
M11-116a(2)	16,42	12,08	20,17	16,92	13,67	6,5	0	0	5,75	8,83
M11-116b(2)	0	0	0	0	0	0	0	NC	NC	Nc
M11-116(B)	19,33	19,13	18,92	14,67	12,75	16,83	14,83	18,5	16,5	7,67
M11-116d	0	2,63	2	1,5	1,5	0	6,08	0	NH	2
M11 116d(A)	18,93	20,13	18,83	18,88	8,75	10,75	8,33	0	17,79	10,33
M11-116d(B)	22,79	10,25	18,17	15,33	16,92	15,92	12,75	10,25	NH	NC
M11-133	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	0
I300A(2)	3,75	0	10,5	9,25	3,33	4,17	3,75	14	NH	0
I434Bb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I434B	0	0	0	6,25	0	0	8,67	8,71	0	4,17
I434Bc	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	5
E54Ba	1,38	16,13	0	6,5	7,25	5	5	7,11	9,21	5,48

NC: No creció, NH: no se hizo, VA: *V. alginolyticus*, VP: *V. parahaemolyticus*, VH: *V.harveyi*.