Resistencia a antibióticos de vibrios aislados durante el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

M. H. Gracia-Valenzuela[1*], A. Márquez-Castillo[2], J. M. Leyva[1], L. A. Ortega-Ramirez[1], J. O. Cardoso-Antonio[3], M. I. Sital-Gastelum[1], J. I. Galindo-Félix[1], y M. M. Gutiérrez-Pacheco[1*]

[1] *Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui. Ave. Tecnológico, Block 611, Valle del Yaqui, Bácum , Sonora. C.P. 85276.*
[2] *Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Hermosillo. Ave. Tecnológico 115, Col. El Sahuaro, Hermosillo, Sonora , México. C. P. 83170*
[3] *Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71230.*

Artículo recibido el 29 de abril y aceptado el 6 de junio de 2024

Antibiotic resistance of vibrios isolated during white shrimp (Litopenaeus vannamei) culture).

Abstract

Shrimp farming, an activity with high growth potential in areas of northeastern Mexico, has been affected by early mortality syndrome (EMS) caused by bacteria of the genus *Vibrio*. This disease has led producers to indiscriminate use of antibiotics, contributing to antibiotic resistance. Therefore, the objective of the study was to determine the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal concentration (MBC), of the antibiotics oxytetracycline, enrofloxacin, and florfenicol against vibrios isolated during the culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The results showed that high doses of all antibiotics are required to inhibit the viability of *Vibrio* strains. 73.40% of the strains showed resistance to oxytetracycline at the tested doses. Conversely, enrofloxacin demonstrated higher efficacy, with 83% of the strains being sensitive to this antibiotic with MICs between 0.5 and 32 µg/mL. Florfenicol was the antibiotic to which strains showed the highest resistance, with 81.91% of the strains being resistant at the evaluated doses. 52.12% of the evaluated Vibrio strains presented resistance to more than one antibiotic. These results demonstrate that *Vibrio* bacteria have developed antibiotic resistance to oxytetracycline and florfenicol and the need to control antibiotic use in aquaculture.

Key words: shrimp farming, penaeids, vibriosis, antibacterial.

Resumen

La camaronicultura, una actividad con alto potencial de crecimiento en zonas del noreste de México, se ha visto afectada por el síndrome de mortalidad temprana (EMS, por sus siglas en inglés), causado por bacterias del género *Vibrio*. Esta enfermedad ha llevado a los productores al uso indiscriminado de antibióticos contribuyendo a la resistencia bacteriana. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB), de los antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol contra vibrios aislados durante el cultivo de camarón blanco *(Litopenaeus vannamei*). Los resultados mostraron que se requieren dosis altas de todos los antibióticos para inhibir la viabilidad de las cepas de *Vibrio*. El 73.40% de las cepas mostró resistencia a oxitetraciclina a las dosis probadas. Por el contrario, la enrofloxacina demostró una mayor eficacia, siendo el 83% de las cepas sensibles a este antibiótico con CMIs entre 0.5 y 32 µg/mL. El florfenicol fue el antibiótico al que las cepas mostraron mayor resistencia con 81.91% de las cepas resistentes a las dosis evaluadas. El 52.12% de las cepas de *Vibrio* evaluadas presentó resistencia a más de un antibiótico. Estos resultados demuestran que las bacterias del género *Vibrio* han desarrollado resistencia antibiótica a la oxitetraciclina y al florfenicol, y la necesidad de

*Autor de correspondencia
Email: martina.gv@vyaqui.tecnm.mx, maria.gp@vyaqui.tecnm.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

controlar el uso de antibióticos en la acuicultura.

Palabras claves: camaronicultura, peneidos, vibriosis, antibacteriano.

Introducción

Se estima que cada año se pierden alrededor de 6000 millones de dólares por enfermedades infecciosas en cultivos acuícolas en todo el mundo (Culot *et al*., 2021). Uno de los obstáculos más grandes para que la producción sea exitosa son las enfermedades infecciosas causadas por bacterias en cultivos del camarón blanco (Soto-Marfileñ *et al*., 2023). Actualmente, la producción de camarón está siendo afectada por la incidencia de bacterias patógenas principalmente del género *Vibrio*, que afecta la salud de larvas y juveniles, siendo un factor limitante en el desarrollo del cultivo (Sánchez and Miranda, 2021).

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), sustenta la acuicultura más grande de crustáceos en el mundo; en 2018 produjo 4.97 millones de toneladas, equivalente a 52.9% de la producción de crustáceos (FAO, 2000). Las enfermedades causadas por *Vibrio* son actualmente las que originan mayores pérdidas en el cultivo de camarón (Mulyadi and Iba, 2020). Ejemplos de ellas son la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), y el síndrome de mortalidad temprana (EMS), causadas por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* (Soto-Marfileñ *et al*., 2023).

Para controlar esta enfermedad caracterizada por la necrosis aguda del hepatopáncreas en cultivos larvales, los acuicultores utilizan antibióticos de manera frecuente y excesiva; siendo la oxitetraciclina el más común, y en menor medida la enrofloxacina, florfenicol y norfloxacina (Zhao *et al*., 2021). Estos son manipulados sin criterio técnico, ocasionando resistencia bacteriana y un impacto ambiental negativo, ya que sus residuos, expulsados por medio de la excreta de los camarones, se acumulan en el fondo de los estanques (Varela-Mejías and Alfaro-Mora, 2018).

Estos antibióticos se usan a menudo inadecuadamente, en dosis superiores a las recomendadas, como profiláctico o para tratar infecciones no bacterianas, lo que promueve el surgimiento de cepas de *Vibrio* resistentes o multirresistentes a antibióticos (Letchumanan *et al*., 2019, Mulyadi and Iba, 2020). La resistencia bacteriana de estas cepas hace que la eficacia del tratamiento antibiótico sea cada vez menor; representando un riesgo para el ambiente y la salud humana, pues las cepas resistentes pueden llegar al público a través del consumo de camarones y transferir sus genes de resistencia a cepas patógenas para humanos (Zhao *et al*., 2018, Sotomayor *et al*., 2019). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB), de los antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol contra vibrios aislados durante el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

Materiales y métodos

Reactivación de cepas

Se aislaron 94 cepas de *Vibrio* de muestras de agua de granjas camaronícolas de Sonora durante el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), y posteriormente se reactivaron en agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS) (Difco®) y Chromagar (Difco®), adicionados con 2% de NaCl, previa caracterización de las mismas. Posteriormente, las cepas fueron reactivadas en agar soya tripticasa (TSA) (Difco®), mediante estrías simples..

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI se determinó con base en los estándares reportados por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Se prepararon 8 soluciones madre a diferentes concentraciones de los 3 antibióticos mayormente usados en la camaronicultura, la oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol. Para la preparación del inóculo bacteriano, se utilizó como referencia la unidad 0.5 del nefelómetro de McFarland, correspondiente a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). En tubos de ensayo se agregaron 2 mL de caldo soya tripticasa (TSB), y la cantidad de antibiótico necesaria para obtener las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de inóculo de la bacteria a ensayar a cada tubo, para finalmente, ser incubados a 35 ºC durante 24 horas. Después del periodo de incubación, se determinó la CMI como la concentración mínima a la cual no se observa crecimiento visual de la bacteria (turbidez), expresándose los resultados como µg/mL.

Concentración mínima bactericida (CMB)

Una vez obtenida la CMI, de los tubos sin crecimiento, así como el tubo anterior al tubo determinado como CMI, se tomaron 100 µL y se sembraron en placas Petri con agar nutritivo, para posteriormente ser incubadas por 24 horas a 35 ºC. La CMB se determinó como la concentración a la cual no se observa crecimiento bacteriano. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como µg/mL.

Resultados y discusión

Se determinó la CMI y CMB de oxitetraciclina, enrofloxcina y florfenicol contra 94 cepas de *Vibrio* aisladas durante el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*). En la figura 1 se resumen las CMI de las 94 cepas contra los antibióticos probados. Se puede observar para el caso de oxitetraciclina, que el 1.06% de las cepas mostraron una CMI de 8 y 64 µg/mL, el 2.13% una de 16 µg/mL, el 22.24% de 32 µg/mL, mientras que para el resto (73.40%), no se determinó la CMI a las dosis probadas, lo que nos indica resistencia de las cepas a este antibiótico. Para el caso de enrofloxacina, las cepas mostraron mayor sensibilidad, presentándose solo un 17.02% de cepas resistentes. Las cepas mayormente presentaron una CMI de 8 µg/mL (30.85 %), seguido de 16 (24.46%), 32 (11.70%), 4 (7.45%), 2 (7.45%) y 0.5 µg/mL (1.06%). Por otra parte, las cepas mostraron mayor resistencia al antibiótico florfenicol, requiriéndose dosis mayores para inhibir el crecimiento bacteriano. El 20.21% de las cepas presentaron una CMI de 32 µg/mL, el 1.06% de 64 µg/mL, el 2.13% de 16 µg/mL, mientras que el crecimiento del resto de las cepas no se inhibió a las dosis evaluadas. Según los datos que proporciona IDEXX (2023), para el caso de florfenicol, concentraciones de CMI por debajo de los 8 µg/mL denotan sensibilidad y mayores a 16 µg/mL resistencia de las bacterias evaluadas a este antibiótico.

En la figura 2 se muestran las CMB de las 94 cepas contra los antibióticos probados y se puede observar que se requirieron dosis altas de todos los antibióticos para inhibir la viabilidad de las cepas de *Vibrio*. En el caso de las cepas expuestas a oxitetraciclina, el 22.34% de las cepas requirió una dosis de 64 µg/mL, 2.12% de 32 µg/mL y el 1.06% una CMI de 16 µg/mL; mientras que el 74.46% (correspondiente a 70 cepas), fueron resistentes al antibiótico, presentándose dosis superiores a los 64 µg/mL. Con respecto a enrofloxacina, el 81.91% de las cepas presentaron una CMB en el rango de 4-64 µg/mL y el resto de las cepas (18.09%), fueron resistentes. Por otra parte, florfenicol fue el

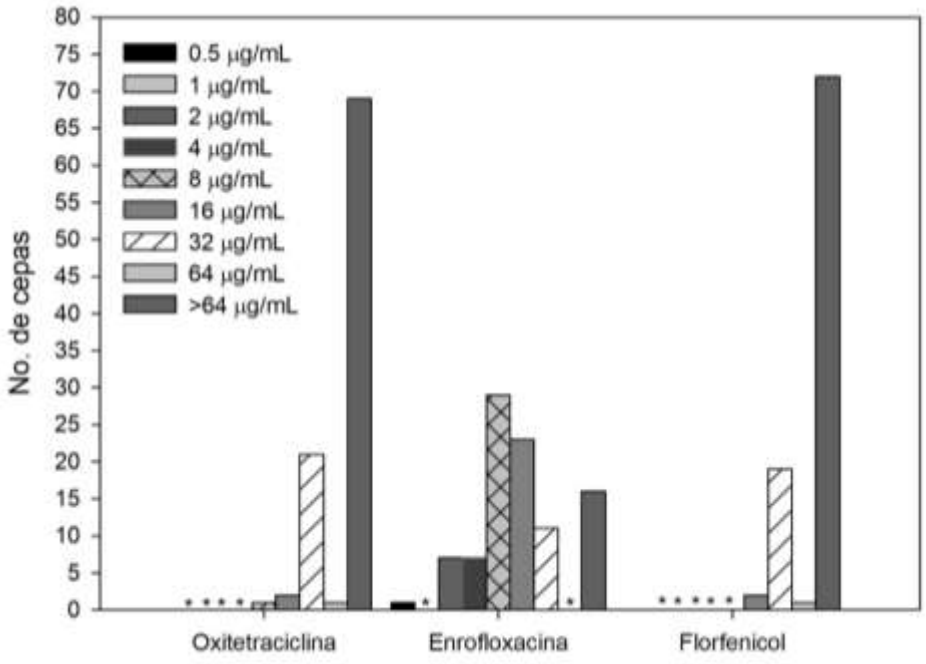


Figura 1. Concentración mínima inhibitoria de antibióticos usados en la acuicultura contra cepas aisladas durante el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) (n= 94). * = CMI no detectada.

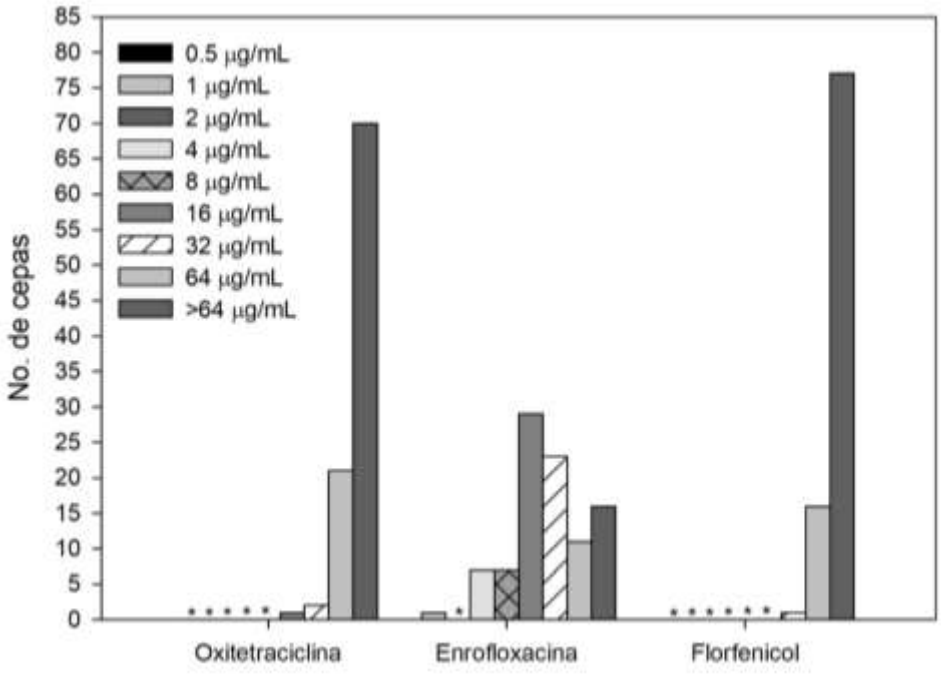


Figura 2. Concentración mínima bactericida de antibióticos usados en la acuicultura contra cepas aisladas durante el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) (n= 94). * = CMB no detectada.

antibiótico al que las cepas mostraron mayor resistencia, siendo resistentes el 81.91% de las cepas. La figura 3 muestra el comportamiento de las cepas de *Vibrio* a los antibióticos evaluados; se puede observar que más del 70% de las cepas fueron resistentes a oxitetraciclina y florfenicol, mientras que para enrofloxacina, más del 80% fueron sensibles.

Los resultados muestran que las cepas de *Vibrio* exhibieron valores de CMI y CMB mayores para florfenicol y oxitetraciclina en comparación con enrofloxacina, demostrando que las bacterias expuestas a estos antibióticos desarrollaron mecanismos de resistencia que evitan su acción bacteriostática. Esto puede ser atribuido al uso excesivo de estos antibióticos en las granjas camaronícolas como ha reportado previamente el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (Bermúdez-Almada *et al*., 2014, Santiago *et al*., 2009).

Diversos estudios han evaluado las CMI y CMB de antibióticos contra especies de *Vibrio*, y han reportado concentraciones similares a las observadas en el presente estudio. Por ejemplo, Bermúdez-Almada *et al*. (2014), reportaron valores de CMI para oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol en el rango de 0.75-100, 0.25-10 y 0.5-5 µg/mL, respectivamente, contra cepas de *Vibrio* aisladas de hepatopáncreas de camarón. De manera similar, You *et al*. (2016), reportaron una CMI menor a 0.5 µg/mL de oxitetraciclina para 83 aislamientos de *Vibrio* obtenidos de muestras de agua de mar, mientras que Ramasamy *et al*. (2020), reportaron una CMI de 14 µg/mL.

Por otra parte, en un estudio reportado por Sotomayor *et al*. (2019), se determinaron las CMI de 20 cepas de *Vibrio* aisladas de larvas de *L. vannamei* de 10 estanques de camarón durante eventos de mortalidad. Los resultados evidenciaron que 40% de las cepas exhibieron valores de CMI para oxitetraciclina menores a 100 µg/mL, el 45% entre 200 y 500 µg/mL, y un 10% de las cepas presentaron una CMI alta, superior a 3500 µg/mL. Sin embargo, en este caso, las cepas fueron sensibles a florfenicol, obteniéndose valores de CMI menores a los 40 µg/mL. En otro estudio, oxitetraciclina fue el antibiótico que presentó CMIs más altas al ser usado contra cepas de *Vibrio* aisladas de camarones enfermos (*L. vannamei*). El 67% de los vibrios aislados presentó una CMI en el rango de 75.1-133 µg/mL y el resto entre 0-75 µg/mL. Por otra parte, para florfenicol, enrofloxacina y norfloxaciona el 55, 58 y 44% de las cepas presentaron CMIs entre 0-2.0 µg/mL,

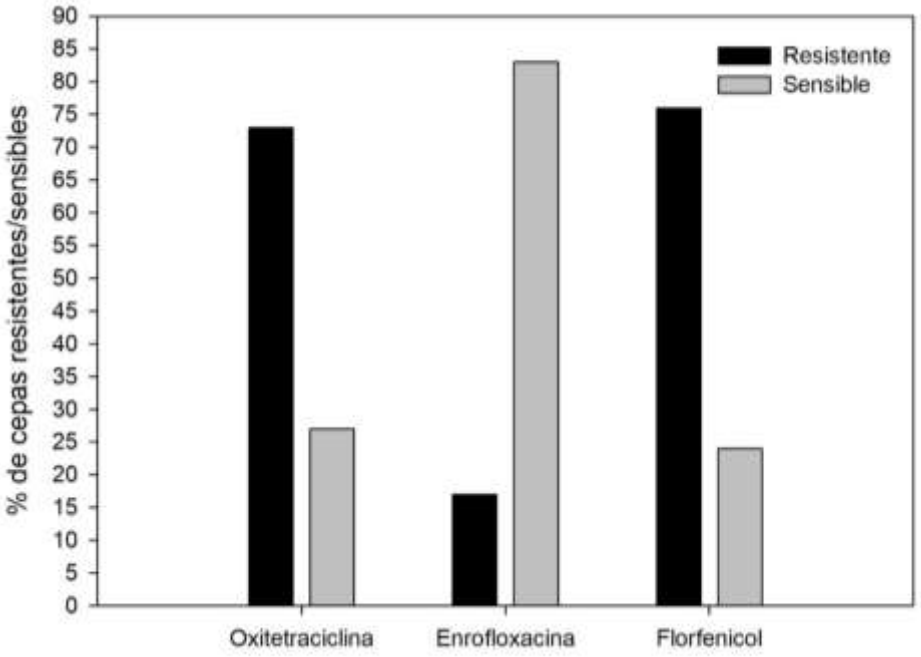


Figura 3. Resistencia de cepas aisladas del cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) a los antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol (n= 94).

indicando mayor sensibilidad a estos antibióticos.

Las diferencias entre las concentraciones antes mencionadas y las obtenidas en este trabajo se pueden atribuir al tipo, concentración y frecuencia de uso de los antibióticos en cada contexto influye a diferentes niveles en la resistencia de las bacterias. Además, la efectividad de los antibióticos puede cambiar en cepas de *Vibrio* spp. de colección y cepas obtenidas de un ambiente natural. Por ejemplo, un estudio reportó que cepas de *V. harveyi* aisladas de granjas de camarón tuvieron CMIs más altas comparadas con cepas de *V. harveyi* provenientes de colección, y que, además, las cepas aisladas de las granjas fueron capaces de desarrollar resistencia a oxitetraciclina (Nakayama *et al*., 2006).

Por otra parte, el efecto de estos antibióticos también ha sido reportado para otros microorganismos aislados del cultivo de camarón blanco. Gracia-Valenzuela *et al*. (2022) reportaron que los antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacina, florfenicol, aviflox y magnamicina mostraron efecto inhibitorio contra 19 aislados bacterianos (correspondientes a los géneros *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Proteus*), provenientes de hepatopáncreas de camarón, agua y sedimento de 13 granjas de camarón. De manera general, florfenicol fue el antibiótico que mostró mayor actividad, inhibiendo el crecimiento *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Pseumonas aeruginosa* con halos de inhibición de crecimiento de 28, 28 y 26 mm; mientras que enrofloxacina inhibió a *Salomonella* spp. y *E. cloacae* (28 y 27 mm, respectivamente).

Es importante resaltar que el 52.12% de las cepas de *Vibrio* evaluadas en el presente estudio fueron multirresistentes, de las cuales, el 36.17% fueron resistentes a 2 antibióticos, y el 15.95% fueron resistentes a los 3 antibióticos evaluados. Esto representa un riesgo ya que los vibrios son altamente abundantes en los ambientes acuáticos y se han reconocido como reservorios y vehículos de genes de resistencia a antibióticos mediante intercambio horizontal de material genético (Yuan *et al*., 2023, Dubert *et al*., 2016). El incremento de microorganismos portadores de genes de resistencia a antibióticos afecta la incidencia de infecciones en animales acuáticos, así como la salud humana y la terapia antimicrobiana.

Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran la resistencia que presentan las cepas de *Vibrio* aisladas durante el cultivo de camarón blanco a los

antibióticos más comunes usados en la acuicultura, requiriéndose dosis elevadas para ejercer su efecto bacteriostático y bactericida. Además, destaca el preocupante panorama de la resistencia antibiótica y la necesidad de la necesidad de implementar medidas efectivas de monitoreo y seguimiento del uso de antibióticos en la acuicultura en beneficio de la salud pública y la seguridad alimentaria asociada a esta actividad productiva.

Agradecimiento

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el recurso presupuestario otorgado al proyecto "Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) de 3 Antibióticos Contra Vibrios Aislados Durante el Cultivo de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)" con clave 19055.23-P.

Referencias

Bermúdez-Almada, M.D.C., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-Hernández, M.L., Barajas-Borgo, C.J., Acedo-Félix, E. 2014. Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibioticos de bacterias de Vibrio aisladas de los organismos. *Biotecnia*, 16**,** 29-37.

Culot, A., Grosset, N., Bruey, Q., Auzou, M., Giard, J.C., Favard, B., Wakatsuki, A., Baron, S., Frouel, S., Techer, C. 2021. Isolation of Harveyi clade *Vibrio* spp. collected in aquaculture farms: How can the identification issue be addressed? *Journal of Microbiological Methods*, 180**,** 106106.

Dubert, J., Osorio, C.R., Prado, S., Barja, J.L. 2016. Persistence of antibiotic resistant *Vibrio* spp. in shellfish hatchery environment. *Microbial ecology*, 72**,** 851-860.

FAO 2000. *The State of World Fisheries and Aquaculture, 2000*, Food & Agriculture Org.

Gracia-Valenzuela, M.H., Arias Moscoso, J.L., Ochoa-Meza, A.R., Escobedo-Bonilla, C. 2022. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of two types of oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against bacteria from shrimp ponds. *Revista bio ciencias*, 9.

IDEXX 2023. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Laboratorios de Referencia IDEXX.

Letchumanan, V., Ab Mutalib, N.S., Wong, S.H., Chan, K.G., Lee, L.H. 2019. Determination of antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp and shellfish in Selangor, Malaysia. *Progress in Microbes & Molecular Biology*, 2.

Mulyadi, I.N., Iba, W. 2020. Efficacy of seaweed (*Sargassum sp.*) extract to prevent vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juvenile. *International Journal of Zoological Research*, 16.

Nakayama, T., Ito, E., Nomura, N., Nomura, N., Matsumura, M. 2006. Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. *FEMS microbiology letters*, 258**,** 194-199.

Ramasamy, P., Rani, J.S., Gunasekaran, D. 2020. Pathogenicity of Antibiotic-Resistant/Sensitive Bacteria *Vibrio spp*. and *Aeromonas spp*. *Chapter*, 2**,** 37-42.

Sánchez, S.A., Miranda, F.P. 2021. Evaluación del extracto de Semillas *Citrus paradisi* para inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* en *Litopenaeus vannamei*. *Revista Ciencia UNEMI*, 14**,** 1-9.

Santiago, M.L., Espinosa, A., Del Carmen-Bermúdez, M. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40**,** 22-32.

Soto-Marfileñ, K., Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z. 2023. Evaluación de microbiota de las costas de Sonora y Baja California contra cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* y V*ibrio harveyi*, agentes causales de la necrosis hepatopancreática en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8**,** 189-195.

Sotomayor, M.A., Reyes, J.K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., Bayot, B. 2019. Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLOS ONE*, 14**,** e0210478.

Varela-Mejías, A., Alfaro-Mora, R. 2018. Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29**,** 1-14.

You, K., Bong, C., Lee, C. 2016. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio spp*. in tropical waters of Peninsular Malaysia. *Environmental monitoring and assessment*, 188**,** 1-15.

Yuan, X., LV, Z., Zhang, Z., Han, Y., Liu, Z., Zhang, H. 2023. A Review of Antibiotics, Antibiotic Resistant Bacteria, and Resistance Genes in Aquaculture: Occurrence, Contamination, and Transmission. *Toxics*, 11**,** 420.

Zhao, Y., Yang, Q.E., Zhou, X., Wang, F.H., Muurinen, J., Virta, M.P., Brandt, K.K., Zhu, Y.G. 2021. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51**,** 2159-2196.

Zhao, Y., Zhang, X.X., Zhao, Z., Duan, C., Chen, H., Wang, M., Ren, H., Yin, Y., Ye, L. 2018. Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp. *Journal of hazardous materials*, 350**,** 10-18.