



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la
disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei***

**ARMIJOS FLORES CHRISTOPHER ALEXANDER
INGENIERO ACUICOLA**

**VACACELA CAJAMARCA LUIS DAVID
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA
2022**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la
disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón *Penaeus
vannamei***

**ARMIJOS FLORES CHRISTOPHER ALEXANDER
INGENIERO ACUICOLA**

**VACACELA CAJAMARCA LUIS DAVID
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA
2022**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la
disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón *Penaeus
vannamei***

**ARMIJOS FLORES CHRISTOPHER ALEXANDER
INGENIERO ACUICOLA**

**VACACELA CAJAMARCA LUIS DAVID
INGENIERO ACUICOLA**

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

**MACHALA
2022**

Tesis-revisión

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	adoc.site Fuente de Internet	1%
2	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	cicese.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	1%
4	doczz.net Fuente de Internet	1%
5	ri.ues.edu.sv Fuente de Internet	<1%
6	explore.openaire.eu Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	<1%
8	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
9	aes.ucf.edu.cu Fuente de Internet	<1%

10	aprenderly.com Fuente de Internet	<1 %
11	1library.co Fuente de Internet	<1 %
12	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
13	www.uco.es Fuente de Internet	<1 %
14	qdoc.tips Fuente de Internet	<1 %
15	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	<1 %
16	M González, G Arenas. "Characterization of the immune response of the north scallop <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia)", <i>Ciencias Marinas</i> , 2002 Publicación	<1 %
17	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, ARMIJOS FLORES CHRISTOPHER ALEXANDER y VACACELA CAJAMARCA LUIS DAVID, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



ARMIJOS FLORES CHRISTOPHER ALEXANDER
0704559244



VACACELA CAJAMARCA LUIS DAVID
0705581742

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis primeros agradecimientos a Dios y mi familia, sin la bendición y el cuidado de ellos no hubiera podido llegar al lugar donde estoy ahora. Son mi más grande motivación para seguir esforzándome en este camino lleno de desafíos y quiero expresarles toda mi gratitud por todo lo que han hecho por mí con este trabajo.

Agradezco a los grandes amigos que hice en mi etapa universitaria. Alberto, Heidy y Bryan en este trabajo dejo expresado toda la gratitud que siento por sus amistades brindadas hacia mi persona y que ha sido de las más sinceras y desinteresadas que he podido tener. Sin sus apoyos, conocimientos y risas durante todos estos años no hubiera podido seguir adelante, han marcado una gran diferencia en mi vida y espero que Dios nos permita contar el apoyo de uno hacia el otro; siempre atesoraré nuestra amistad. También a mi grupo de siempre por su eterna compañía, consejos y cariño hacia mi persona, este triunfo también es de ustedes.

Así mismo doy gracias a mi tutora, Dra Lita Sorroza, por todo el apoyo y guía brindada en el transcurso de este trabajo, le quedo totalmente agradecido y espero algún día poderle devolver todo lo brindado. A mi compañero de tesis por su confianza y apoyo, a la Ing. Ivanna Tuz, Ing. Irán Rodríguez y a la Universidad Técnica de Machala por el apoyo y el espacio brindado para la realización de este trabajo.

Christopher Alexander Armijos Flores

Agradezco a mi familia por su constante apoyo y motivación en mi proceso de formación académica, por creer en mí y darme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas.

También quiero expresar mi gratitud a la directora de mi tesis, Dra. Lita Sorroza, por su guía, orientación y enseñanzas valiosas en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Asimismo, quiero reconocer y agradecer a los profesores como el Dr. Roberto Santacruz, el Ing. Irán Rodríguez, la Ing. Ivana Tuz, y a mis amigos de la universidad, como Ana Zambrano, Christopher Armijos y Bryan Pindo, por su colaboración, retroalimentación y por compartir sus conocimientos y experiencias. Esto ha enriquecido mi formación y me ha permitido crecer tanto académica como personalmente.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que participaron en mi investigación, por su tiempo y disposición para brindarme información y datos importantes para la elaboración de este proyecto. Sus aportes fueron fundamentales para alcanzar los objetivos propuestos en esta tesis de grado.

Luis David Vacacela Cajamarca

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado especialmente al esfuerzo de mis queridos padres, Bladimir Armijos y María Flores, que en todos estos años han hecho lo imposible para brindarme una excelente educación académica y gracias a ello soy lo que soy. Todos mis logros siempre se los dedicaré a ellos, mis amados padres.

Dedico este trabajo también a mis hermanos Bryan y Erick, que de una forma u otra siempre me han podido ayudar en este largo camino. Que Dios siga derramando bendiciones en nosotros para que nuestra hermandad perdure por siempre.

Por último, dedico este trabajo aquellas personas que no confían en su capacidad o tienen el miedo de no salir adelante, está claro que el camino no es fácil pero con esfuerzo, dedicación y la fe en Dios se puede lograr cualquier cosa que uno se propone.

Christopher Alexander Armijos Flores

Esta tesis representa un logro importante en mi vida académica y personal, y no habría sido posible sin la guía divina de Dios y el apoyo incondicional de mi familia.

En particular, quiero agradecer a mi hermano Angel por ser mi constante motivación y mi ejemplo a seguir. También quiero expresar mi gratitud a mis padres por su amor y sacrificio, quienes siempre han estado a mi lado, brindándome su apoyo y sus sabios consejos.

Este trabajo es un testimonio de la importancia del esfuerzo, la perseverancia y la fe en Dios, quien ha sido mi roca en los momentos de dificultad y mi fuente de inspiración en todo momento.

Espero que este trabajo sea un tributo a la dedicación y al amor que he recibido de mi familia y a la misericordia y bondad de Dios en mi vida. Que este logro sea solo el comienzo de un camino lleno de éxitos y bendiciones.

Luis David Vacacela Cajamarca

RESUMEN

La producción camaronera es una industria que ha logrado en los últimos años un buen crecimiento, principalmente ocasionado por el incremento en cuanto a la demanda de alimento en el mundo, con lo cual se ha generado diferentes sistemas de cultivos con el afán de cubrir las necesidades existentes, la intensificación de los cultivos y su inadecuado manejo ha sido el principal responsable de la aparición de nuevas enfermedades ocasionadas principalmente por microorganismos oportunistas los cuales pueden ocasionar innumerables pérdidas en este sector productivo.

Uno de los microorganismos que normalmente suelen estar presentes son los *Vibrios* y pueden ocasionar la enfermedad denominada vibriosis en donde para contrarrestarlos se ha utilizado a los antibióticos como la oxitetraciclina donde en sus primeros inicios se obtenían buenos resultados, pero con el pasar del tiempo estas bacterias han ido generando resistencia a dichos fármacos ocasionando que algunos de ellos se restrinja su uso en la acuicultura.

Actualmente la industria acuícola busca alternativas al uso de antibióticos, y se han encontrado innumerables opciones al uso de las mismas llegando a ser uno de los más interesantes el uso de aceites esenciales como el de orégano (*Origanum vulgare*) en la disminución de bacterias.

En este trabajo se llegó a evaluar el efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) en la presencia bacterias heterótrofas, *Vibrios* y su influencia sobre la concentración de hemocitos en el camarón (*Penaeus vannamei*), en donde se empleó al aceite de orégano con una concentración del 85% de carvacrol y 15% de timol. En el experimento se usaron 9 gavetas con un volumen total de 30 litros en el que colocaron 5 camarones con un peso promedio de 10,5g. Se usaron 2 dosis de 50 y 100 µg/ml de carvacrol mezclado con el alimento por un periodo de 10 días alimentando a los animales en dos raciones diarias con el 5% de su biomasa.

En los resultados el antibiograma mostro un efecto intermedio en la reducción de *Vibrios*, el análisis microbiológico mostro que la dosis de 50 µg fue efectiva para reducir la carga de *Vibrios* así mismo esta dosis mostro diferencia significativa en la concentración de hemocitos

con respecto al control. Esto sugiere que se podría utilizar el aceite esencial de orégano como tratamiento frente a la vibriosis y mejorar el estado de salud de estos animales

Palabras clave: bacterias heterotróficas, hemocitos, *Vibrios*, aceites esenciales

ABSTRACT

Shrimp production is an industry that has experienced significant growth in recent years, mainly due to an increase in global food demand. This has led to the development of various production systems in order to meet existing needs. However, the intensification of these systems and their inadequate management have been the main responsible for the appearance of new diseases caused mainly by opportunistic microorganisms, which can cause countless losses in this productive sector.

One of the microorganisms that is usually present in shrimp culture is *Vibrio sp.*, which can cause the disease known as vibriosis. In order to counteract it, antibiotics such as oxytetracycline have been used, which initially gave good results. However, over time, these bacteria have developed resistance to such drugs, causing some of them to be restricted in aquaculture.

Currently, the aquaculture industry is seeking alternatives to the use of antibiotics, and countless options have been found, with one of the most interesting being the use of essential oils from plants such as oregano (*Origanum vulgare*) to reduce bacteria.

In this study, the effect of oregano essential oil on the presence of heterotrophic bacteria and *Vibrios*, and its influence on the concentration of hemocytes in shrimp (*Penaeus vannamei*), was evaluated. The oregano essential oil that was used had a concentration of 85% carvacrol and 15% thymol. The experiment used nine buckets with a volume of 30 liters each, in which five shrimp with an average weight of 10.5g were placed. Two doses of 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of carvacrol mixed with the feed were used for a period of 10 days, feeding the animals twice a day with 5% of their biomass.

The results showed an intermediate effect in the reduction of *Vibrio sp.*, and the microbiological analysis showed that the 50 μg dose was effective in reducing the *Vibrio sp.* load. Additionally, this dose showed a significant difference in the concentration of hemocytes being higher compared to the control. This suggests that oregano essential oil could be used as a treatment against vibriosis and thus improving the health status of these animals.

Keywords: heterotrophic bacteria, hemocytes, *Vibrios*, essential oils.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	vi
1 Introducción.....	1
2 Planteamiento del problema	3
3 Justificación.....	4
4 Objetivos.....	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos específicos	5
4.3 Hipótesis.....	5
5 Revisión bibliográfica	6
5.1 Bacterias que afectan al cultivo de camarón	6
5.1.1 Bacterias heterótrofas.....	6
5.1.2 Bacterias del Género Vibrio que afectan al cultivo camarón.....	12
5.1.3 Tratamientos.....	17
5.2 Respuesta inmune.....	21
5.3 Orégano	23
5.3.1 Generalidades.....	23
5.3.2 Aceite esencial	23
6 Materiales y Métodos	25
6.1 Ubicación del experimento	25
6.2 Materiales.....	25

6.2.1	Insumos	25
6.2.2	Equipos.....	26
6.2.3	Materiales.....	26
6.3	Variables a medir	27
6.3.1	Variables dependientes.....	27
6.3.2	Variables intervinientes aleatorias	27
6.4	Métodos.....	28
6.4.1	Ensayo in vitro frente a <i>Vibrios</i>	28
6.4.2	Obtención de los animales	28
6.4.3	Preparación del alimento con las respectivas dosis de los tratamientos	29
6.4.4	Ensayo in vivo.....	29
6.4.5	Extracción de muestras de hepatopáncreas (HP) para análisis microbiológico 30	
6.4.6	Extracción de hemolinfa para conteo total de hemocitos (CTH).....	30
6.5	Diseño experimental.....	31
6.5.1	Modelo matemático.....	31
6.6	Análisis estadístico.....	31
7	Resultados y discusión	33
7.1	Efecto inhibitorio frente a <i>Vibrios</i>	33
7.2	Influencia del aceite esencial de orégano contra bacterias heterótrofas.....	34
7.3	Influencia de las dosis del aceite esencial de orégano contra bacterias <i>Vibrios</i>	36
7.4	Influencia de las dosis del aceite esencial de orégano en las concentraciones de hemocitos.....	38
8	Conclusiones.....	41
9	Recomendaciones	42

10	Bibliografía.....	43
11	ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 Presencia de signos clínicos de estreptococosis (opacidad muscular) en <i>P. vannamei</i>	10
Figura 2 Hepatopáncreas con desprendimiento celular severo, túbulos vacíos, necrosis tubular con células muertas en el interior del lumen de juvenil de <i>P. vannamei</i> con infección de <i>Streptococcus sp.</i>	11
Figura 3 Lesiones de necrosis multifocal en el exoesqueleto de camarón <i>P. vannamei</i>	12
Figura 4 Ubicación de Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA).....	25
Figura 5 Antibiograma del aceite esencial de orégano.....	33
Figura 6 Concentración de bacterias heterótrofas (UFC/g de HP) en función a las diferentes dosis (test de Duncan).....	35
Figura 7 Efecto de las dosis del aceite esencial de orégano en las Unidades Formadoras de Colonia de <i>Vibrios</i>	37
Figura 8 Efecto de las dosis del aceite esencial de orégano en las concentraciones de hemocitos (cel/ml)	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos con su respectiva dosis de EO	29
Tabla 2 Croquis del experimento.....	31
Tabla 3 ANOVA de un factor intergrupos en los datos obtenidos de bacterias heterótrofas	34
Tabla 4 Contraste de prueba de hipótesis para verificar diferencias entre las dosis del aceite esencial de orégano en bacterias <i>Vibrios</i>	36
Tabla 5 Contraste de prueba de hipótesis para verificar diferencias entre las dosis del aceite esencial de orégano en concentración de hemocitos	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A Obtención de camarones en la camaronera LIGFA	56
Anexo B Unidades experimentales con sus camarones.....	56
Anexo C Medición de amonio.....	56
Anexo D Aceite esencial de orégano.....	56
Anexo E Pegante acuícola Acuapega.....	56
Anexo F Materiales utilizados en la preparación de los tratamientos con el pegante.	57
Anexo G Preparación del pegante con el aceite esencial	57
Anexo H Dosis de alimento diario	57
Anexo I Preparación de alimento con las dosis.....	57
Anexo J Extracción de hemocitos	57
Anexo K Extracción de hepatopáncreas.....	57
Anexo L Conteo de hemocitos	58
Anexo M Siembra en placas.....	58
Anexo N Desarrollo de los Vibrios en agar TCBS.....	58
Anexo O Desarrollo de bacterias heterotróficas en agar Marino.	58

1 INTRODUCCIÓN

La actividad acuícola en las últimas décadas ha tenido crecimientos progresivos que alcanzaron un 3,2% en la tasa media anual, lo que le permitió obtener en el año 2015 una producción (106 millones de TM) mucho más alta que la actividad de pesca y captura (93,7 millones de TM). Una de las principales especies representante de esta actividad es el camarón blanco *Penaeus vannamei*, siendo producido a nivel mundial con un porcentaje de volumen total de 79,5% y, que a nivel general en la industria de producción de camarones marinos en cautividad llegó a una marca de 4,8 millones de TM en 2015 (Vieira *et al.*, 2017).

La camaronicultura actualmente es la actividad acuícola con mayor crecimiento en Latinoamérica, en donde se posiciona a Ecuador entre los más grandes exportadores de camarón a nivel mundial (Pulgarín & Mora, 2022), y a nivel de continente la producción de este crustáceo se posiciona y sobresale en mercados nacionales como en los internacionales (Molina *et al.*, 2021).

Con el crecimiento de la demanda se ha visto, entre los productores, la necesidad de generar nuevos sistemas de cultivos, los cuales posibiliten una mayor producción en la misma área, creándose así los sistemas semi-intensivo, intensivos y super-intensivos (Pérez *et al.*, 2020). Con la innovación de los sistemas de cultivos también se dio la aparición de enfermedades, esto relacionado con un mal manejo y altas densidades de cultivo (Castellano, 2021).

Con la aparición de nuevas enfermedades en el sector productivo también se generaron diferentes tratamientos los cuales buscan en la mayoría de los casos controlar al patógeno causal. Las bacterias totales son grupos de microorganismos oportunistas que están presentes en los estanques de producción y afectan al cultivo de camarón, entre estos se destacan los *Vibrios* y bacterias heterótrofas, ocasionando grandes pérdidas económicas a los productores (Varela & Choc, 2020).

Para controlar las diferentes enfermedades que pueden presentarse se ha utilizado diferentes tipos de fármacos como la oxitetraciclina. La utilización de los fármacos ha logrado tener muy buenos resultados en la eliminación o reducción de los patógenos bacterianos, pero también han generado innumerables problemas en cuanto a la resistencia que han adquirido

las bacterias patógenas a dichos antibióticos, esto se debe principalmente a la mala dosificación de los mismos y al abuso que se les ha dado a estas sustancias (Campoverde, 2015).

El aumento de la resistencia en las poblaciones bacteriana hacia los antibióticos ha posibilitado que las autoridades pertinentes pongan restricciones en cuanto al uso de estos (Peralta *et al.*, 2021). Con la restricción de estos medicamentos utilizados para incentivar el crecimiento de los organismos en producción y mitigar enfermedades, se ha buscado diferentes alternativas que tengan la misma o mayor efectividad frente a estas enfermedades, teniendo opciones como el tratamiento de fagos, probióticos y aceites esenciales, mismos que se han propuesto en diferentes investigaciones obteniendo excelentes resultados (Saucedo *et al.*, 2020).

Algunos de los aceites esenciales como de hierba luisa (*Cymbopogon Citratus*) (Al-Sagheer *et al.*, 2017), orégano (*Origanum vulgare*) (Melgaço-Heluy, 2019), manzanilla (*Matricaria recutita*) (Fazelan *et al.*, 2020), han surgido como una alternativa eficaz ante brotes bacterianos en acuicultura. Además se ha comprobado su efectividad en humanos, teniendo excelentes resultados en problemas relacionados con acné (Pájaro *et al.*, 2019), algunas enfermedades bacterianas (Gil-Hoyo, 2018) y afecciones de carácter mental como depresión, ansiedad y estrés (Soto-Vásquez & Alvarado-García, 2018).

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En acuicultura la obtención de métodos menos invasivos para contrarrestar la concurrencia de agentes bacterianos patógenos es fundamental el adecuado uso de antibióticos ya que sino ocasiona la aparición de bacterias resistentes a los mismos, los cuales ya no tendrían tratamiento. Las consecuencias de llegar a tal punto son desastrosas, puesto que la demanda de alimento sigue en aumento y de ser el caso el desabastecimiento del mismo sería inevitable en el mundo.

Las bacterias como las del género *Vibrio* son patógenos, los cuales pueden afectar desde la etapa larvaria hasta el engorde, estos son microorganismos oportunistas que pueden coexistir con el hospedador, pero al existir un debilitamiento del sistema inmune ya sea por estrés o por otro factor, los *Vibrios* pueden atacar al organismo ocasionándole graves daños y subsecuentemente posibilitando la aparición de enfermedades como la vibriosis en el cultivo, provocando pérdidas económicas al productor camaronero.

Asimismo, las bacterias heterótrofas a pesar de generar beneficios dentro de los estanques por sus capacidades de descomponer y asimilar desechos orgánicos e incluso participar en la transformación de nitrógeno amoniacal en compuestos menos tóxicos, también pueden ocasionar problemas en la salud del crustáceo debido a que pasan a ser bacterias oportunistas por la acumulación de MO en el sedimento.

En los últimos años se han utilizado diferentes antibióticos para contrastar a este tipo de bacterias, en donde uno de los más utilizados es la oxitetraciclina. No obstante, dado al mal uso de los antibióticos las bacterias patógenas fueron adquiriendo resistencia a los mismos, provocando la restricción en cuanto al uso de los fármacos en las producciones acuícolas.

El problema en cuanto al uso de antibióticos no solo va dirigido al ámbito productor o del área de salud del animal, sino también al medioambiental debido a que existe una contaminación al ecosistema exterior de la granja acuícola por los residuos de los mismos, es por ello que el uso de tratamientos alternativos como extracto de plantas en forma de aceites con componentes antibacteriales sería una buena opción para combatir a bacterias patógenas como los *Vibrios* y heterótrofas en el cultivo de camarón.

3 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación es realizada con el propósito de evaluar el efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la disminución de bacterias totales presentes en el camarón, lo que permitiría reducir el uso de antibióticos que al pasar de los años sólo ha demostrado ser perjudicial al medio ambiente por los residuos que logran llegar a los ecosistemas externos a la granja camaronera y por la resistencia que esto genera en los microorganismos bacterianos causando un problema al momento de tratar enfermedades bacterianas.

Es por ello que surge como un tratamiento alternativo el uso de productos naturales como los aceites esenciales, ya que han demostrado tener propiedades antibacterianas por los compuestos activos de las plantas donde son extraídos logrando disminuir la presencia de bacterias patógenas y a su vez reducir el índice de enfermedades dentro del cultivo, mejorando la salud del crustáceo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) a través de las mediciones de la carga de bacterias totales y hemocitos en *Penaeus vannamei* como posible alternativa profiláctica.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar las propiedades antibacterianas *in-vitro* del aceite esencial de orégano como alternativa profiláctica para el control de *Vibrios*
- Evaluar la influencia de las dosis del aceite esencial de orégano (50 y 100 µg/ml) mezclado con alimento balanceado en las comunidades de bacterias heterótrofas y *Vibrios* dentro del hepatopáncreas del *P. vannamei*
- Determinar la incidencia de las diferentes dosis del aceite esencial de orégano mezcladas con el alimento balanceado en las concentraciones de hemocitos presentes en la hemolinfa de los camarones.

4.3 Hipótesis

La aplicación del aceite esencial de orégano mezclado con el alimento podría beneficiar al cultivo de camarón *Penaeus vannamei* por la disminución que generaría en la carga de las bacterias totales presentes en el hepatopáncreas, mejorando así la supervivencia y el estado salud durante el periodo de cultivo en los diferentes sistemas de producción de la camaronicultura.

5 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 Bacterias que afectan al cultivo de camarón

Son microorganismos procariotas unicelulares capaces de multiplicarse a través de fisión binaria, donde poseen diferentes formas como bacilos, espirilos, cocos, y con un tamaño que puede ir desde los 0.5 a 3 μm . La mayoría de las bacterias no requieren de otros organismos para vivir pero hay algunas excepciones que sí necesitan y son conocidos como intracelulares obligados, siendo unos ejemplos las clamidias y rickettsias. Su estructura está comprendida de pared celular conformado por peptidoglucano, no poseen membrana nuclear porque no disponen de compartimientos intracelulares determinado por membranas y algunos de ellos pueden o no tener flagelos. Se encuentran divididos en 2 grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas.

De igual importancia es la versatilidad metabólica de las bacterias basado en 3 criterios: los donados de electrones (litótrofos y organotrofos), los de fuente de energía (foto y quimiosintéticas) y los de fuentes de carbono (autótrofas y heterótrofas). En las bacterias heterótrofas se destaca sus divisiones: probióticas, saprófitas (fermentativas y recicladoras) y parásitas (patógenos en animales, personas e incluso plantas) (Garcia, 2017).

5.1.1 *Bacterias heterótrofas*

Las bacterias heterótrofas u organotrofas son microorganismos que se caracterizan por sintetizar, partiendo de los compuestos orgánicos carbonados complejos, sus propias biomoléculas, pero también pueden asimilar elementos inorgánicos distintos al carbono; aunque algunas necesitan ser huésped de organismos superiores para su sobrevivencia. Estas bacterias poseen funciones muy favorecedoras para el medio pues permiten la descomposición y al mismo tiempo la asimilación de la materia orgánica sedimentada en el fondo como las heces, animales muertos y el alimento no consumido. Otras en cambio logran reducir los niveles tóxicos del nitrógeno amoniacal por la transformación del compuesto, y que todo esto permite aumentar la biomasa microbiana (Montes *et al.*, 2021).

Sin embargo, la intensificación ha provocado que haya una mayor carga en los estanques de producción por el incremento en la densidad de cultivo y alimento suministrado, reducción

en las tasas de recambio y adición de abonos orgánicos, dando como resultado una mayor acumulación de MO (materia orgánica) lo que favorece que las bacterias presentes en el medio se conviertan en agentes oportunistas (Parrado *et al.*, 2014).

5.1.1.1 Variedad de bacterias heterótrofas

✓ *Streptococcus*

En el grupo de estas bacterias encontramos a las especies *Streptococcus uberis* y *S. parauberis* que son los posibles agentes causales de la enfermedad estreptococosis (Varela & Choc, 2020). Timón y Jiménez (2006) exponen que el *S. uberis* fue descrito por Diemhofer por primera vez en el año de 1932, y se distingue dos especies: *S. uberis* tipo I y *S. uberis* tipo II (también conocido como *S. parauberis*). Estos dos tipos son complicados de diferenciar por lo que ambos poseen infestación similar.

Estas bacterias forman parte de las Gram positivas, formando cadenas de un tamaño moderado e inmóviles, y al igual que los demás estreptococos catalasa pueden hidrolizar la esculina y algunos azúcares como manitol, manosa, etc. Entre las diferencias que poseen el tipo I con el tipo II es que las cepas del segundo son negativas al factor CAMP (proteína extracelular causante de la hemólisis) y es apto para crecer de una forma débil a 10°C; en cambio, el primer tipo es capaz de hidrolizar el hipurato y varias cepas son positivas al CAMP (Timón & Jiménez, 2006).

✓ *Aeromonas*

Este género perteneciente a la familia Aeromonadaceae es un bacilo móvil Gram negativo, catalasa y oxidasa generalmente positivos, ubicuos que se lo puede encontrar en diferentes partes como mamíferos, aves, artrópodos, insectos, peces, suelo y agua (Silva, 2011); como también se las puede encontrar en diferentes tipos de cuerpos de agua: subterráneas, superficiales, embotelladas, de consumo, residuales (sean o no tratadas), de estuarios y marinas, debido a que son autóctonas de este medio (Latif, 2015).

Su crecimiento, a nivel de laboratorio, puede darse fácilmente en agar de sangre y MacConkey y su identificación en cuestión de género puede darse a través de sistemas

comerciales, interpretando con precaución los resultados de la identificación de especies, pues presenta problemas (Silva, 2011).

En la década de los 70 muchas especies de *Aeromonas* estaban comprendidas por dos grupos principales que estaban definidos con base a diversas características las cuales eran la temperatura de crecimiento, producción de pigmento en TSA, motilidad y producción de indol; los grupos eran:

-Cepas mesófilas: causantes de varias infecciones en humanos, su crecimiento óptimo se encontraba en el rango de 35-37 °C y responden bajo el nombre de *A. hydrophila*

-Cepas psicrófilas: definidas como *A. salmonicida* son bacterias patógenas principalmente de peces y crecen bajo un rango óptimo de 22-28 °C (Latif, 2015).

Cabe destacar que las *Aeromonas* y *Vibrios* constituyen el 85% de la flora bacteriana intestinal del camarón que corresponde a un aproximado de 10^9 UFC/g de tejido del intestino (Moss *et al.*, 2000, como se citó en Burgos, 2005), y que pueden ser susceptibles a la azitromicina, tetraciclinas, quinolonas, entre otras; y en cambio ser resistentes a la ampicilina (Silva, 2011).

✓ *Pseudomonas*

Los microorganismos de este género son bacilos rectos y semicurvos, pertenecientes al grupo de los Gram negativos y oxidasa positivos. Presentan movilidad debido a la presencia de flagelos polares y logran medir de 1,5 a 5 μm de longitud con 0,5 a 1 μm de diámetro. *Pseudomona sp.* se lo puede encontrar con mayor frecuencia en cultivos donde el aporte de nitrógeno orgánico es mayor, también consiguen crecer en condiciones donde existe disposición de iones de NO_3^- (fuente de nitrógeno) y requiere un solo compuesto orgánico como reserva de C y energía; son considerados microorganismos muy ubicuos ya que se los puede hallar tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres pero ninguna de las especies de este género soporta un pH que esté por debajo de 4,5 (Calva, 2020).

Una de las especies, *Pseudomona aeruginosa*, lograr persistir en ambientes con requerimiento nutricional mínimo y que posean una temperatura de 20 y 43 °C, lo que la hace

destacar de las demás especies de *Pseudomonas* que no toleran altas temperaturas (Paz *et al.*, 2019).

Las *Pseudomonas* pueden infectar tanto peces y crustáceos en ambientes acuáticos dulces o marinos, donde actúan como oportunistas por las malas condiciones que se presentan en el suelo y agua llegando a afectar a los animales que poseen las defensas bajas. Este grupo de bacterias generan exotoxinas causando una alteración y necrosis tisular en el epitelio de ciertos órganos (túbulos hepatopancreáticos) (Argüello, 2014).

✓ *Flavobacterium*

Es un género que comprende a más de 225 especies nombrados y publicados y, que fue establecido por primera ocasión por Bergey y sus colaboradores. Son bacilos Gram negativos, con características móviles por deslizamiento o inmóviles, y sus colonias tienen una pigmentación amarillenta. Las especies de *Flavobacterium* presentan diversidad fisiológicamente y sus cepas pueden estar presentes en algunos hábitats: terrestres (en animales, plantas), acuáticos (algas, agua dulce y marina, lagunas), sedimentos, lodo activado, plantas de tratamientos de aguas residuales, entre otras (Chen *et al.*, 2020).

En piscicultura, las especies que generan enfermedades son: *F. branchophilum*, causante de la enfermedad de branquias; *F. columnare*, causante de la enfermedad de la columna; y *F. psychrophilum*, causante del síndrome del alevín de la trucha o enfermedad de aguas frías. Esta última especie tiene una medición de 0,2 a 0,75 μm de diámetro y 1,5 a 7,5 μm en su longitud (Castillo, 2017).

✓ *Cianobacterias*

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos procariotas que se caracterizan porque su morfología y fisiología son muy variados, a esto se suma su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y cambios en las condiciones del ambiente (temperatura, salinidad, humedad, pH e irradiación solar) (Merchán, 2017). De modo que el único factor limitante en el crecimiento de este grupo bacteriano es la humedad, logra habitar ambientes acuáticos como terrestres con ambientes hipersalinos extremos, geisers, ventanas hidrotermales; su proliferación y diversidad es en medios alcalinos pero algunas especies pueden estar presentes en localidades con 4 de pH (Pérez J. , 2003).

Algunos géneros como *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Microcystis* pueden proliferarse en la parte superficial de los estanques de cultivo con salinidad <10 UPS y crear capas lo que reduciría el O₂ y producir olorosos metabolismo como en el caso de las *Anabaena sp.* y *Oscillatoria sp.* que liberan toxinas como el metilisoborneol (sabor a moho) y geosmina (sabor a tierra) (Merchán, 2017).

5.1.1.2 Enfermedades causadas por bacterias heterótrofas

✓ Estreptococosis

Esta enfermedad es causada por *Streptococcus sp.* (donde se relaciona especies como *S. uberis* y *S. parauberis*) la cual provoca una mortalidad del 80% en el cultivo de camarón blanco. Entre los signos clínicos se encuentran: fase inicial, el ciego hepático posterior opaco y musculatura blanquecina; fase aguda, nado errático, letargia, la coloración del organismo completamente blanca, estancia en el fondo y mortandad masiva (Morales & Gomez, 2014).

Figura 1 Presencia de signos clínicos de estreptococosis (opacidad muscular) en *P. vannamei*



Fuente: Morales & Gomez, 2014

En un estudio realizado por Morales *et al.* (2011) sobre estreptococos detectados en Guatemala observaron que los camarones *P. vannamei* presentaban infiltración de hemolinfa (presencia: 10⁴ UFC/ml), necrosis tubular, desprendimiento a nivel cecular y que en el hepatopáncreas (presencia: 10⁶ UFC/g) habían nódulos hemocíticos grado 1 y 2; mientras

que en el músculo se observó presencia de masas de bacterias, necrosis licuefactiva e infiltración de hemocitos. De igual manera en México durante los años 2011 y 2012 en las altas mortalidades de juveniles de dicho crustáceo por *Streptococcus sp.*, presentaron atrofia tubular con una infiltración hemocítica y desprendimiento celular en los túbulos del hepatoáncreas de una manera severa lo que provocó una mortalidad de 40% (Morales & Gomez, 2014).

Figura 2 Hepatopáncreas con desprendimiento celular severo, túbulos vacíos, necrosis tubular con células muertas en el interior del lumen de juvenil de *P. vannamei* con infección de *Streptococcus sp.*



Fuente: Morales & Gomez, 2014

✓ **Erosión bacteriana del caparazón o camarón manchado**

Es una enfermedad que provoca manchas a nivel del exoesqueletos de color cafés o negras en las etapas de juvenil y adulto en crustáceos peneidos. Las lesiones comienzan cuando los organismos pelean por el espacio debido a que están sembrados a altas densidades en los estanques, lo cual genera heridas a nivel cuticular y como respuesta a esto se activa su mecanismo de defensa (producción de melanina) provocando un impedimento en la penetración de ciertas bacterias (*Vibrio sp.* y bacterias oportunistas como: *Aeromona sp.*, *Spirillum sp* y *Flavobacterium sp.*). Las infecciones que puede producir esta enfermedad son a nivel de branquias, apéndices y cutícula, donde la última se puede producir una erosión; pueden desaparecer a través de la muda siempre y cuando no hayan llegado al músculo y

membranas internas, caso contrario produciría una enfermedad más severa conocida como “astillas negras” (Medina, 2018).

Figura 3 Lesiones de necrosis multifocal en el exoesqueleto de camarón *P. vannamei*



Fuente: Morales & Gomez, 2014

✓ **Enteritis hemocítica**

Es una enfermedad que provoca problemas en el intestino del camarón como la inflamación del epitelio y una proliferación hemocítica en su parte media (Gutiérrez *et al.*, 2015). Algunos autores citados en Morales (2011) mencionan que para que se dé esta enfermedad es necesario que el camarón ingiera bacterias *Leucothrix mucor*, *Schizothrix calcícola* y algunos géneros de cianobacterias como *Anabaena sp.* y *Chroococcus* y, que van a estar presentes en concentraciones mayores a 500.000 cc/ml; las toxinas de estas bacterias provocan un daño en las células que revisten el intestino dando como consecuencia los signos clínicos anteriormente mencionados.

5.1.2 Bacterias del Género Vibrio que afectan al cultivo camarón

Los *Vibrios* forman parte de la familia Vibrionaceae, en donde se pueden encontrar los géneros *Photobacterium*, *Vibrio*, *Plesiomonas* y *Aeromonas*. Dentro del género *Vibrio* se encuentran 100 especies identificadas, 12 de ellas son patógenas para el hombre; en acuicultura se incluyen a los principales como: *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi* y *V. fischeri* (Aguirre, 2019).

Los *Vibrios* son bacterias Gram negativas del tipo anaeróbico facultativo (Rentería, 2018) e incapaces de formar esporas, se caracteriza por su flagelo polar, su forma de bastón curvo (García, 2017) y su longitud aproximada es de 1,4 a 2,6 μm (Aguirre, 2019).

Se lo puede encontrar con frecuencia en ambientes costeros marinos (García, 2017) y con mayor abundancia en salinidades promedio de 7.1 UPS (Gyraite *et al.*, 2019); su distribución radica principalmente en la temperatura, nutrientes y la salinidad (Bernal, 2020).

Su reproducción se da entre 24 y 48 horas a una temperatura que puede ir de 30 a 37°C, dado a su capacidad de multiplicarse en pocos minutos puede utilizar eficazmente los diferentes nutrientes que se encuentren en el medio. Es heterótrofa debido a que depende de la materia orgánica para vivir; puede desplazarse mediante su flagelo en la columna de agua o para introducirse en el organismo a contagiar (Bernal, 2020).

Pertenece al conjunto de bacterias de doble membrana, también conocidas como Gram negativas, las cuales tienen la capacidad de producir endotoxinas mismas que al entrar en contacto con el hospedador es capaz de generar resistencia a diferentes fármacos (Bernal, 2020).

5.1.2.1 Variedad de Vibrios

✓ *V. parahaemolyticus*

Son bacterias Gram Una negativas halófilas con capacidad móvil (1 a 2 flagelos ubicados polarmente), su metabolismo es fermentativo facultativo, pertenecen a las bacterias mesófitas y su tamaño puede ir de 1 a 3 µm (Licona, 2022). Tiene un mayor crecimiento en aguas con pH de 7,5 a 8,5 y pueden vivir en temperaturas iniciando de 15°C hasta llegar a los 45°C, pero su temperatura óptima es de 37 °C. La salinidad puede oscilar entre los 5 hasta los 35 ppt, con un promedio óptimo para su crecimiento de 22 ppt (Campoverde, 2015).

Su presencia naturalmente se da en sectores costeros alrededor del mundo o incluso en los tractos digestivos tanto de crustáceos, peces y moluscos. Además posee la capacidad de traspasar el epitelio de los hospedadores y colonizarlos mediante diferentes rutas como; vía oral (alimentación), lesiones externas y branquias (Licona, 2022).

V. harveyi

La clasificación de este microorganismo se dio gracias a la exhaustiva investigación, pasando por diferentes nombres como; *Achromobacter harveyi* (su primer nombre), *Lucibacterium*

harveyi, *Beneckea harveyi* y por último *V. harveyi* su nombre actual, mismo que es aceptado por la comunidad científica (Zhang *et al.*, 2020).

Se caracterizan por ser bacterias Gram negativas del tipo fermentadoras; su movilidad se da mediante la utilización de flagelos polares, su forma es de bastón y requieren CINa para su crecimiento (Zhang *et al.*, 2020). Estas bacterias pueden responder a la inmunidad del hospedador para la supervivencia y proliferación por medio de la formación de biopelículas, con la comunicación célula-célula, la producción de factores de la virulencia y la bioluminiscencia (Karnjana *et al.*, 2019).

En la camaronicultura es asociado con la enfermedad denominada como: Bacterias luminiscentes (Tenecota *et al.*, 2018), Síndrome de Zoea II (Sarango, 2021) y AHPND (Muthukrishnan *et al.*, 2019) a pesar que esta enfermedad hasta el momento solo había sido asociada con el *V. parahaemolyticus* (Zhang *et al.*, 2020).

✓ *V. vulnificus*

Es una bacteria halófila con capacidad móvil Gram-negativa, alcalófilo (Leng *et al.*, 2019) y con un tamaño de 2-3µm (Pita *et al.*, 2018). Se lo puede encontrar ampliamente distribuido en zonas marinas (mar del golfo, sedimento submarino y mariscos) (Li *et al.*, 2019), con mayor incidencia en ostras, a temperaturas que pueden oscilar entre los 15 a 27°C, alcanzado su mayor crecimiento a temperaturas de 18- 26°C; puede habitar en salinidades que puede ir desde los 5 a 20 ppt, llegando a un máximo de tolerancia de 33 a 36 ppt (Leng *et al.*, 2019).

Su primera detección se dio en un cultivo de anguilas en España a finales de los años 80 . Posteriormente también se dio su aparición en ostras, almejas, peces y camarones (Li *et al.*, 2019).

✓ *V. alginolyticus*

Pertencen a las bacterias Gram negativas y se encuentran distribuidas ampliamente por los estuarios marinos, costas y ambientes acuáticos a nivel mundial. Estos microorganismos pueden habitar como parásitos de vida libre o a su vez asociados a organismos tales como vertebrados-invertebrados marinos y flora en general, llegando incluso hasta afectar a los humanos (Shunmugam *et al.*, 2021). Es halófilo debido a que puede crecer en

concentraciones que pueden ir de desde los 3, 6, 8 y 10% NaCl, y se lo puede encontrar mayoritariamente a temperaturas mayores a 17°C (Campoverde, 2015).

La patogenicidad de este microorganismo se da gracias a una interacción compleja de factores abióticos y bióticos, incluyendo bajas salinidades, altas temperaturas, genotipos bacterianos y el hospedador (Chibani *et al.*, 2020). En el cultivo de camarón puede ocasionar altas tasas de mortalidad (80%), retrasos en el crecimiento, poca actividad y blanqueamiento muscular, etc. (Huang *et al.*, 2022).

5.1.2.2 Enfermedades causadas por Vibrios

✓ Vibriosis o síndrome de la gaviota

Esta enfermedad es ocasionada por los *Vibrios*, en donde posiblemente el causante sea *V. parahaemolyticus*; su presencia se puede dar desde la etapa larval hasta el engorde, en cada uno de estos casos tienden a ser diferentes. En la etapa larval estas bacterias comienzan colonizando la región bucal y los apéndices, conforme la afección avanza pueden causar daño al intestino y al hepatopáncreas (Sarango, 2021).

En animales contagiados se pueden presentar sintomatologías como coloración rojiza, cromatóforos extendidos y septicemia, en tanto que a nivel de análisis interno se puede presentar túbulos atrofiados y una abundante presencia de bacterias en el hemocele (Sarango, 2021). El desarrollo de esta enfermedad está asociada con elevadas temperaturas, altos niveles de nitrógeno y alteraciones repentinas de la salinidad (Moncada, 2022).

En los estanques de producción con organismos contagiados se da la presencia de camarones moribundos en la parte superficial del cuerpo de agua, lo que a su vez atrae a las gaviotas, mismas que se alimentan con facilidad de los camarones enfermos, llegando a ocasionar hasta un 90% de mortalidad (Moncada, 2022).

✓ Síndrome de la Zoea II o bolitas blancas

Esta enfermedad es de origen bacteriano y se presentan en el hepatopáncreas en forma de bolitas blancas (células descamadas) en el lumen, además pueden llegar a ser observadas en el tracto digestivo (Sarango, 2021).

Esta enfermedad está asociada con dos tipos de patógenos, el *V. harveyi* y el *V. alginolyticus*, aunque este último puede causar síntomas similares a la enfermedad, su implicación aún no se ha confirmado de manera definitiva (Moncada, 2022).

Esta afección se da principalmente en los primeros estados larvarios, partiendo de zoea-1 en donde se puede generar intestinos vacíos en las larvas, debido a la falta de apetito ocasionado por la enfermedad (Wiradana *et al.*, 2022). Los principales signos clínicos que se presentan en esta enfermedad son el nado errático, baja alimentación (Moncada, 2022), reducción de la capacidad de muda y una elevada mortalidad (Sarango, 2021).

✓ **Necrosis hepatopancreática aguda (AHPND/EMS)**

El síndrome de mortalidad temprana (EMS) fue identificada por primera vez en China en el 2009 y su nombre se dio debido al desconocimiento del agente causal, en el 2011 se dio a conocer con un nombre más característico para el estado agudo de la enfermedad, necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), con esta enfermedad se podía llegar a altas tasas de mortalidad del 60-80% o incluso al 100% en las larvas de camarón, afectando principalmente después de los 20 a 35 día de cultivo (Medina, 2018).

Posterior a su aparición en China, pasando por Vietnam, Malasia, Tailandia, Filipinas y por último llegando a América en el 2013, afectando drásticamente los cultivos mexicanos (Saavedra-Olivos *et al.*, 2018). En este mismo año se dio a conocer el patógeno causante de la enfermedad mismo que era perteneciente a las bacterias Gram negativas *Vibrio parahaemolyticus* y una vez contagiado por el bacteriófago es capaz de generar toxinas que pueden ocasionarle la muerte al camarón (Medina, 2018).

La enfermedad de AHPND se le atribuye a una de las cepas del *V. parahaemolyticus* que contiene el plásmido denominado Pva1 o Pvpa3-1 de 70 kpb, el cual posee genes capaces de codificar toxinas del tipo *Photobacterium insect related* (Pir): PirvpA y PirvpB, que provocan la muerte celular (Saavedra-Olivos *et al.*, 2018). Por lo cual cabe destacar que no todos los *V. parahaemolyticus* son capaces de generar la enfermedad del AHPND, debido a que deben contener el plásmido necesario para generar las toxinas los cuales dan lugar a la enfermedad (Trujillo, 2016).

✓ **Enfermedad de luminiscencia**

Es una enfermedad ocasionada por el *V. harveyi* y el *V. splendidus* los cuales pueden generar mortalidades de hasta un 70%. Los organismos infectados con esta enfermedad se caracterizan por presentar una abundante colonización en el tracto digestivo, apéndices y la región oral de las larvas, la infección puede avanzar hasta el hepatopáncreas e intestino medio llegando al punto de ocasionar una septicemia generalizada (Sarango, 2021).

Una de las características que se puede constatar a simple vista en horas de la noche es la luminiscencia de los camarones infectados, en este punto es crucial constatar si la luminiscencia proviene de la larva o de alguna partícula adherida (Sarango, 2021).

5.1.3 Tratamientos

5.1.3.1 Antibióticos

Los antibióticos son descritos por Mota (1996) como aquellas sustancias químicas provenientes de microorganismos con la capacidad de no permitir o incluso eliminar el desarrollo de microorganismos perjudiciales. Surgieron como soluciones terapéuticas ante los problemas bacterianos y después se presentó la incursión de sustancias naturales que también poseen antagonismo contra bacterias (Varela & Alfaro, 2018).

Estos fármacos son utilizados en la medicina humana y como tratamientos en las distintas industrias dedicadas a la producción de organismos como ganadera, acuícola (donde puede ser aplicada mezclado con el alimento en la etapa de engorda o directo al agua en larvicultura), e incluso en la agricultura moderna (Redrován, 2017).

Debido a la rápida resistencia que desarrollan las bacterias, los antibióticos deben ser utilizados exclusivamente para tratamientos terapéuticos y no como medida profiláctica puesto que volverían ineficiente al fármaco. Las cepas de *Vibrio* poseen cierta resistencia lo que lo convierte en un peligro para la salud de las personas como el medio ambiente porque pueden llegar a las personas por medio del consumo de camarón y provocar una transferencia de genes de resistencia a las cepas patógenas para humanos (Aguirre *et al.*, 2021).

La resistencia de las bacterias surge como una herramienta natural para la sobrevivencia y reproducción a través de la capacidad de las mismas para su adaptación a condiciones

ambientales. Por otra parte, cuando se da por genética los genes poseedores de la resistencia pueden transmitirlo de manera horizontal, interviniendo 3 procesos (conjugación, transducción, transformación). Un ejemplo de esto es la resistencia de bacterias a las tetraciclinas, que se da por la modificación enzimática codificada por transposones (Varela & Alfaro, 2018).

✓ **Oxitetraciclina**

La oxitetraciclina pertenece a la familia de las tetraciclinas y es un antibiótico muy utilizado como tratamiento terapéutico frente a patologías de origen bacteriano, tanto Gram positiva como Gram negativo, e incluso contra micoplasmas, rickettsias, etc. Es de amplio espectro y usualmente utilizado para tratar la enfermedad NHP (Necrosis Hepatopancreática) (Redrován, 2017).

Con respecto a su mecanismo de acción, se infiltra al interior de la célula por medio de una difusión pasiva (poros hidrofílicos) hasta llegar al núcleo donde se integra en la subunidad 30S de los ribosomas y niega el paso del aminoacil ARNt a este organelo, causando un faltante en el adicionamiento de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Otero, 2018).

En el estudio realizado por Martínez *et al.*, (2016) Los camarones se dividieron en cuatro grupos y se distribuyeron en acuarios de plástico con la misma densidad considerando tres unidades por tratamiento. Tres de los grupos estaban infectados con bacteria hepatopancreatitis necrotizante (NHP-B) por alimentación forzada con 40 μ L de un homogeneizado de hepatopáncreas (1:1 p/v, hepatopáncreas: glicerol) de camarón confirmado como PCR positiva a NHP-B. Después de la infección, los organismos se mantuvieron durante 20 días en las condiciones antes mencionadas para alcanzar la etapa aguda.

Transcurrido el período de 20 días después de la fase aguda de la enfermedad, se inició la administración de antibióticos. Uno de los grupos infectados fue tratado con OXI (oxi-blend® AQUA), el segundo con FF (flor-blend® AQUA) y el tercero no fue tratado (control positivo). La dosis se estimó considerando los protocolos realizados por granjas camaroneras semi-intensivas y se utilizaron 3 mg de antibiótico / kg camarón / día. Cada antibiótico se

disolvió en una mezcla de agua + glicerol (1: 1). La mezcla de antibióticos se aplicó a cada grupo mediante alimentación forzada durante tres días consecutivos. Los camarones de los controles positivos y negativos se alimentaron con la mezcla de agua + glicerol sin el antibiótico (Martínez *et al.*, 2016).

La infección por NHP-B se detectó con éxito mediante PCR en todos los tratamientos. La bacteria no se eliminó mediante el uso de OXI y FF y aún se detectó después de 15 días de la administración de antibióticos (daa). Aún se detectó NHP-B a los 20 daa en camarones con tratamiento de FF, pero no se detectó en camarones tratados previamente con OXI. Como era de esperar, los camarones del tratamiento testigo presentaron una mortalidad del 100% a los 22 días de la infección. Se plantea la hipótesis de que a pesar de que ninguno de los antibióticos eliminó la bacteria per se, los dos obtuvieron efecto negativo sobre su virulencia. OXI parece tener un efecto mayor, permitiendo que los camarones integren una mejor respuesta inmune a los 15 daa (Martínez *et al.*, 2016).

✓ **Florfenicol**

Este antibiótico se deriva del tianfenicol y constituye a la familia de los fenicoles, es de amplio espectro y su difusión por todo el organismo puede ser de una manera rápida. Algunas de las características del florfenicol es que es un compuesto neutro y liposoluble, y además logra atravesar de manera fácil la barrera celular. Al igual que la oxitetraciclina, es usado para rickettsias y bacterias Gram (+) y Gram (-) (Coronel, 2019).

En cuanto a su mecanismo de acción se caracteriza porque penetra en las células bacterianas por medio de difusión facilitada e inhibe la síntesis de proteínas (se introduce en la subunidad ribosomal 50S), y provoca la no transferencia de aminoácidos a las cadenas peptídicas (Otero, 2018).

En un estudio realizado por Parmar *et al.* (2018) se procedió hacer un experimento para averiguar la dosis efectiva de florfenicol en *Litopenaeus vannamei* (con un peso medio de 22g) contra la infección por *Vibrio harveyi*. Primero fue infectado por el patógeno a una concentración de 2×10^6 UFC/g y después tratados con dosis de 0, 10, 20 y 30 mg de florfenicol/kg de peso corporal durante 10 días.

El florfenicol en forma pura se obtuvo de Sigma-Aldrich. Para la preparación de los piensos medicados se utilizaron pellets comerciales (Avanti Feeds Ltd.). Las dosis seleccionadas de florfenicol (10, 20 y 30 mg/kg de peso corporal) se recubrieron en la superficie del pienso con aceite comestible, posteriormente secados y almacenados a una temperatura de 4°C. Para la preparación de los piensos, se tomó en cuenta que había pérdida del 50% del antibiótico debido a la lixiviación y del 25% debido a la reducción de la ingesta de pienso durante las enfermedades. Por lo tanto, se prepararon piensos con 17,5, 35 y 52,5 mg de florfenicol/kg de peso corporal, de modo que los camarones consumieron 10, 20 y 30 mg de florfenicol/kg de peso corporal (Parmar *et al.*, 2018).

Como resultado la tasa de supervivencia de los camarones en todos los grupos de tratamiento con florfenicol fueron mejores frente al grupo control (53,33% supervivencia), donde se demostró que 10 mg de florfenicol/kg de peso corporal puede utilizarse como tratamiento eficaz (80% supervivencia) de la infección por *V. harveyi* en *L. vannamei* (Parmar *et al.*, 2018).

5.1.3.2 Productos naturales para el tratamiento de enfermedades bacterianas

Los productos naturales se pueden presentar de diferentes formas, una de ellas son los aceites esenciales mismos que se ha venido usando hasta en la medicina debido a sus características como inhibidores bacterianos en la mayoría de los casos.

Los aceites esenciales y sus principios activos pueden ser obtenidos mediante extracción o destilación de las plantas, flores, raíces, hojas, entre otros (Cerdá, 2020). Se caracterizan por su elevada volatilidad y sus propiedades antifúngicas, antibacterianas e insecticidas los cuales son parte de la función que ejecutan los principios activos (Cerna-Chávez *et al.*, 2019). Cada uno de los aceites puede contener 100 compuestos químicos desemejantes, que pueden ser: óxidos, cetonas, aldehídos, alcoholes, etc., (Cerdá, 2020).

Los aceites esenciales al contener características antimicrobianas, antioxidantes y analgésicas podrían ser utilizados para inhibir la patogenicidad mediante la utilización de diferentes métodos. En camarones se han evaluado diferentes aceites esenciales con las cepas patogénicas de mayor impacto en acuicultura como el *V. campbelli*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*, en donde se comprobaron que las dosis de los aceites esenciales de

orégano y árbol de té pueden reducir la mortalidad y no alcanzan a ser tóxicos en los organismos (Reyes & Valle, 2021).

✓ **Árbol de té (*Melaleuca alternifolia*)**

Este tipo de aceite está compuesto principalmente de hidrocarburos terpenos que a su vez contienen radicales de alcohol, mismos que están asociados a la estructura química. Además, contiene compuestos antivirales, aromáticos volátiles, desinflamatorios y antimicrobianos en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Reyes & Valle, 2021).

✓ **Neem (*Azadirachta indica*)**

Es una planta con presencia a nivel mundial, la cual se ha dado a conocer por sus propiedades antifúngicas, antiinflamatorias e insecticidas, debido principalmente a sus compuestos activos como meliantriol, azadiractina y salinnina (Aguirre, 2019). Actualmente en acuicultura se han utilizado los extractos de neem en larvas mediante el alimento obteniendo excelentes resultados en reducción de infecciones con *Vibrios* obteniendo una mayor sobrevivencia (Reyes & Valle, 2021).

✓ **Albahaca (*Ocimum basilicum*)**

Es catalogada como una planta aromática constituida en su mayoría por linalol, cinamato de metilo, eugenol e isoestragol. Actualmente es utilizado en la medicina, alimentación y cosméticos a causa de sus propiedades antibacterianas, en la acuicultura se puede emplear como un método alternativo al uso de antibióticos. El compuesto al cual se le atribuye el efecto inhibitorio es el isostragol (Reyes & Valle, 2021).

5.2 Respuesta inmune

El sistema inmunológico de los crustáceos se basa en una combinación de efectores celulares y humorales para combatir microorganismos que pueden causar infecciones. Los hemocitos desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria, ya que tienen la capacidad de llevar a cabo diversas acciones como la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y citotoxicidad. Estas células forman parte de la fracción celular de la hemolinfa, que es el equivalente a la sangre y la linfa en los vertebrados. En los crustáceos, la circulación es abierta y los hemocitos se encargan de la fagocitosis y eliminación de partículas extrañas y

agentes infecciosos en la hemolinfa (Rendón & Balcázar, 2003). Estas células inmunitarias están conformadas por tres grupos:

- ✓ **Hemocitos hialinos:** Los hemocitos hialinos son células con un delgado citoplasma basófilo y un núcleo amplio y céntrico que se adhieren y se extienden fácilmente, y no contienen gránulos densos. En los cangrejos de río, estos hemocitos se distinguen por su falta de gránulos, aunque contienen inclusiones en el citoplasma, y tienen la capacidad de fagocitar. Además, estas células participan en la coagulación y no son refringentes en el microscopio de contraste de fases. Es importante destacar que los hemocitos hialinos han sido identificados como capaces de llevar a cabo la fagocitosis (Rendón & Balcázar, 2003).
- ✓ **Hemocitos semigranulosos:** Los hemocitos semigranulares de los camarones se caracterizan por tener un núcleo esférico o en forma de herradura y muchos gránulos pequeños y redondos. En estos crustáceos, estas células desempeñan un papel importante en la fagocitosis, encapsulación y liberación del sistema profenoloxidasa proPO (melanización), además de sintetizar y liberar las peneidinas, péptidos antimicrobianos. Cuando se observan al microscopio de contraste de fases, los hemocitos granulares tienen una moderada refringencia (Rendón & Balcázar, 2003).
- ✓ **Hemocitos granulosos:** Se caracterizan por ser células de gran tamaño con grandes gránulos, una alta relación citoplasma-núcleo excéntrico, inclusiones citoplasmáticas, un retículo endoplásmico liso y ribosomas libres en el citoplasma. En los crustáceos, estos hemocitos almacenan las enzimas que conforman el sistema proPO a un nivel más alto que los semigranulares, y liberan estas enzimas mediante exocitosis cuando son estimulados por la peroxinectina y la proteína fijadora de β -glucanos. Además, al igual que los hemocitos semigranulares, los hemocitos grandes sintetizan y almacenan las peneidinas, y participan en el mecanismo de encapsulación. Cuando se observan al microscopio de contraste de fases, los hemocitos grandes tienen mucha refringencia (Rendón & Balcázar, 2003).

5.3 Orégano

5.3.1 Generalidades

Pertenece a las plantas aromáticas medicinales de la familia Lamiaceae del género *Origanum*, distribuida ampliamente en la región del mediterráneo y Asia (Luo *et al.*, 2022). Normalmente se las puede encontrar en zonas montañosas y cálidas. Su uso en la medicina tradicional está direccionada a dolores de estómago, problemas respiratorios, trastornos nutricionales, problemas urinarios, entre otros (Soltani *et al.*, 2021).

Desde las dos últimas décadas y tras el aumento en la resistencia bacteriana a los antibióticos, los científicos se han enfocado en los estudios antimicrobianos con la finalidad de tener alternativas para evitar el uso de los mismos. Obteniendo excelentes resultados con el *Origanum vulgare* pudiendo llegar a inhibir el crecimiento de levaduras, bacterias y mohos (Soltani *et al.*, 2021).

Dado a las características del aceite de orégano como ausencia de residuos, rápida acción baja fitotoxicidad y dificultad para producir resistencia tiene un alto potencial para el uso en acuicultura (Luo *et al.*, 2022).

5.3.2 Aceite esencial

El aceite esencial proveniente del orégano posee propiedades antimicrobianas frente a bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas (Aguirre, 2019) (*V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi* a causa de su composición química de derivados del fenilpropanol y bases de flavonoides, en donde se han conocido compuesto activos como el timol y carvacrol, siendo estos los causantes de su actividad antimicrobiana (Reyes & Valle, 2021). Además también puede encontrar el β -cariofileno, β -mirceno, Terpinen-4-ol, linalool y el hidrato de trans sabineno (Luo *et al.*, 2022).

El efecto antibacteriano se debe principalmente a la interacción con los fosfolípidos de la membrana celular de la bacteria, lo que resulta en alteraciones en la estructura de los ácidos grasos en la parte externa de dicha membrana (Aguirre, 2019).

En el estudio realizado por Domínguez (2020), evaluó el efecto antivirulencia del aceite de orégano frente al *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* en el camarón. Para el desafío contra

el *V. campbellii* (tuvo una duración de 96 h) utilizaron a 100 larvas sanas de camarón (PL8) por cada unidad experimental en donde posteriormente inocularon al *Vibrio* y al aceite a una concentración de 1,0 y 2,5 µg/ml, como resultado obtuvieron una disminución de la mortalidad acumulada en un $23,3 \pm 7,5\%$ (1.0 µg/ml) y un $35,7 \pm 9,1\%$ (2,5µg/ml).

Para el desafío contra *V. parahaemolyticus* utilizaron a juveniles (peso $2,52 \pm 0,36$) sanos de camarón a una densidad de 15 camarones por unidad experimental en el cual posterior a la inoculación del *Vibrio* añadieron al aceite esencial a una concentración de 1,0 y 2,5 µg/ml, como resultado obtuvieron una disminución de la mortalidad acumulada en un $55,7 \pm 12,4\%$ (Domínguez, 2020) .

En cuanto a la inclusión del aceite de orégano en alimento de *Penaeus vannamei* (engorde), obtuvieron los mejores resultados en las dosis de 2,5 mg/kg y 5,0 mg/kg, obteniendo así un 92,2% y 93% de supervivencia esto en comparación con el control en donde se dio solo un 72,0% y en cuanto al rendimiento obtuvieron 953,7 kg/ha y 1041,4 kg/ha respectivamente, en comparación con el control que solo consiguieron 715,9 kg/ha. El estudio tuvo una duración de 102 días con una densidad de siembra de 12 camarones/m², en estanques de 400 m² y con los parámetros bajo los rangos aceptables para el cultivo de *P. vannamei* (Domínguez, 2020).

Por otro lado, en el estudio realizado por Domínguez-Borbor *et al.*, (2020) confirmaron la dosis aplicada en el estudio de Domínguez (2020) en donde volvieron a obtener los mejores resultados en las dosis de 2,5 mg/kg y 5,0 mg/kg esto relacionado en cuanto a la supervivencia de *Penaeus vannamei* mediante la inclusión del aceite esencial de orégano en el alimento.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del experimento

La parte experimental se llevó a cabo en los laboratorios de Citogenética y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Técnica de Machala. Se encuentra ubicada en el Km 5½ vía Machala-Pasaje; con las siguientes coordenadas: 3°15'52"S 79°57'04"O / -3.264525, -79.951195

Figura 4 Ubicación de Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA)



Fuente: Google Earth (2023)

6.2 Materiales

6.2.1 *Insumos*

Simbiótica para control de amonio

Insumos

- Agar TCBS
- Agar marino
- Solución salina al 1,5%
- Agua destilada
- Alcohol industrial

- Alcohol potable
- Citrato de sodio al 10%
- Formol
- Pegante acuicola orgánico
- Agua de mar filtrada
- Balanceado comercial extruido 30%
- Agua de piscina camaronera a 25 UPS

Producto a probar

- Aceite esencial de orégano (carvacrol 85%)

6.2.2 Equipos

- Autoclave
- Cocineta eléctrica
- Incubadora
- Cabina de flujo laminar
- Microscopio

6.2.3 Materiales

- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Vasos de precipitado
- Pipeta de 10 ml
- Micropipetas (100 y 1000 μ l)
- Puntas para micropipetas
- Gavetas
- Pinzas
- Tijeras
- Mechero de alcohol
- Azas de Dygraski

- Tubos Eppendorf
- Marcador permanente
- Gradilla para tubos de ensayo
- Piedras difusoras de oxígeno
- Plástico negro
- Mangueras de oxígeno
- Discos de prueba de sensibilidad antimicrobiana
- Balanza (gramera)
- Oxigenometro
- Multiparámetros
- Aireadores
- pH-metro
- Kit de amonio
- Mandil
- Mascarilla
- Gorro quirúrgico

6.3 Variables a medir

6.3.1 *Variables dependientes*

- **Cuantificación de bacterias totales:** variable cuantitativa realizado por medio de diluciones sucesivas 1/10 hasta 1/1000 y posterior sembrado en caja de Petri se deja 24 horas a 30 °C y se cuenta las unidades formadoras de colonias.
- **Concentración de hemocitos (cel/ml):** variable cuantitativa medido a través del conteo en cámara de Neubauer con 0,1 mm de alto y observado en microscopio.

6.3.2 *Variables intervinientes aleatorias*

- **Lectura de temperatura y pH:** variables cuantitativas medidas con un multiparámetro marca RCYAGO, modelo EZ-9909
- **Lectura de amonio total:** variable cualitativa medida por kit comercial

- **Lectura de oxígeno disuelto:** variable cuantitativa medido con un oxigenometro marca RYAGO, modelo DO9100.

6.4 Métodos

6.4.1 *Ensayo in vitro frente a Vibrios*

Para la prueba de antibiograma se utilizó el medio de cultivo Mueller-Hinton mismo que fue preparado según lo prescrito en el producto y puestas en la caja Petri para su secado. Luego, con ayuda de un hisopo estéril se inoculo el hepatopáncreas del camarón. Posteriormente, se colocó 50 ul del aceite esencial de orégano sobre un disco y una gota del mismo para determinar su halo de inhibición. Por último, se procedió a dejarlo en la incubadora a una temperatura promedio de 30°C por 24 horas, en donde se pudo determinar la sensibilidad del producto.

6.4.2 *Obtención de los animales*

Las muestras de camarón fueron recolectadas en la camaronera “LIGFA” ubicada en el cantón Santa Rosa, provincia de El Oro, en la vía a Puerto Jelí. Se obtuvieron 120 camarones de la piscina y fueron transportados a las unidades experimentales. La cantidad camarones seleccionados fue de 80 organismos con un peso promedio de 10,5 g; se procuró que no presenten síntomas de alguna enfermedad de cualquier tipo. Cabe destacar que los camarones obtenidos no fueron previamente medicados durante sus días de cultivo.

En cuanto al agua utilizada primero fue recolectada de la misma piscina donde se obtuvieron los camarones, con un volumen total de recolección de 300 litros y parámetros de 7,5 pH - 5 ppm OD - 0,5 ppm de amonio – salinidad de 25 UPS. Después la cantidad de agua requerida para los días de experimentación fue abastecida por un laboratorio ubicado en la vía Balosa, dicha agua contaba con parámetros de 7,1 pH - 26 °C - 0 ppm de amonio – 30 UPS; el agua de laboratorio fue almacenada en un tanque de 250 litros de capacidad con aireación para su uso constante después de cada recambio.

6.4.2.1 *Aclimatación de los camarones*

Los camarones fueron aclimatados durante 5 días en las unidades experimentales, repartiendo 5 organismos por pecera y en condiciones óptimas. Los parámetros físicos y químicos del

mesocosmo fueron: $26 \pm 0,5$ °C, 6,4 ppm de oxígeno, $7,75 \pm 0,15$ de pH y una concentración de amonio total de 1 ppm; el amonio no ionizado se encontraba siempre por debajo de 0,15 ppm.

6.4.3 Preparación del alimento con las respectivas dosis de los tratamientos

El producto seleccionado para utilizarlo como tratamiento fue un aceite esencial (EO) comercial de orégano. El aceite cuenta con los compuestos activos de carvacrol y timol a una concentración de 85% y 15% respectivamente, mismos que cuentan con propiedades antibacterianos. El EO fue aplicado al balanceado de forma extra pellet por medio de aspersión hasta que el alimento quedó totalmente humectado. Las dosis empleada en cada tratamiento están representadas en la siguiente tabla.

Tabla 1 Tratamientos con su respectiva dosis de EO

Tratamientos	Dosis: concentración de carvacrol ($\mu\text{g/ml}$)
TC	0
T1	50
T2	100

Fuente: Autores

Con respecto al alimento utilizado para la experimentación fue un balanceado extruido comercial con 30% de proteína donado por la misma camaronera. Se dosificó al 5% de la biomasa de cada gaveta repartido en dos dosis diarias.

6.4.4 Ensayo in vivo

Las dosis de los diferentes tratamientos fueron suministradas a las 8:30am y a las 13:30pm, por un lapso de 10 días de experimentación. Se trabajó con 3 réplicas por tratamiento y se mantuvieron todos los parámetros óptimos de calidad de agua.

Con respecto al manejo del mesocosmo, se hizo un recambio de agua con sifoneo del 35% del volumen del líquido cada 3 días y se renovaba con el agua de mar filtrada del laboratorio. En cuanto a la toma de parámetros se lo realizó diariamente para evitar algún cambio en las

condiciones del ambiente y perjudique la experimentación por el efecto que estos generan en el organismo.

6.4.5 Extracción de muestras de hepatopáncreas (HP) para análisis microbiológico

Después de haber cumplido los 10 días de aplicación de los tratamientos, se procedió a obtener muestras de los organismos para su respectivo análisis y posterior verificación de una posible reducción de concentración de bacterias en el hepatopáncreas. La obtención de las muestras se basó en recolectar los HP de todos los camarones por gaveta. Después se realizó un macerado de los HP para poder extraer 1 g de muestra y hacer diluciones seriadas para su respectivo sembrado por duplicado.

La siembra de dicha muestra fue llevada a cabo en una cámara de flujo laminar, donde se colocó en tubos que fueron preparados con solución salina al 1,5% (Agua destilada + NaCl) y esterilizados en autoclave. Con ayuda de un asa de Dygraski se sembraron 100 µl de cada dilución con diferentes medios de cultivo: agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS; *Vibrio*) y agar marino (bacterias marinas heterótrofas). Una vez hecha la siembra, se los llevó a incubar por un lapso de 24 horas a una temperatura de 30 °C, como indica Ron *et al.* (2020) para bacterias *Vibrio*.

6.4.6 Extracción de hemolinfa para conteo total de hemocitos (CTH)

Se escogieron dos camarones por cada gaveta, en la cual se extrajo la muestra de hemolinfa de cada uno y fueron colocadas en tubos Eppendorf con formol al 4%. La hemolinfa se obtuvo de la parte ventral del crustáceo entre el tercer y cuarto par de pereiópodos, usando jeringas de 1 ml que contenían 0,2 ml de solución anticoagulante como indica van de Braak *et al.* (1996); la solución anticoagulante utilizada para este ensayo fue citrato de sodio al 10% estéril. El volumen de formol aplicado para la conservación de los hemocitos es de acuerdo al cálculo realizado por Rubio *et al.* (2014) donde colocaron 50 µl de la mezcla entre hemolinfa y anticoagulante en 150 µl de formol al 4%, y posteriormente almacenados a 4 °C. Para el conteo de hemocitos se utilizó la cámara de Neubauer y microscopio que, por medio del lente de 25x se centraron las cuadrículas de la cámara y con el lente de 40x se procedió a contar las células inmunitarias.

6.5 Diseño experimental

En el desarrollo del experimento se hizo uso de un diseño completamente al azar (DCA), donde se manipuló un factor de estudio que fue el aceite esencial de orégano y estuvo segmentado en tres tratamientos con sus respectivas replicas (tres veces), dando un total de nueve unidades experimentales.

Tabla 2 Croquis del experimento

TRATAMIENTOS		
TC	T2	TC
T1	T1	T2
T2	TC	T1

Las unidades experimentales fueron gavetas de plástico transparentes con capacidad de volumen total de 45 litros pero sólo se colocó 30 litros por gaveta para evitar perdida de agua por rebose.

6.5.1 Modelo matemático

Modelo estadístico lineal para un diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental

μ =Efecto de la media general

t_i =Efecto del i-esimo tratamiento

ε_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

6.6 Análisis estadístico

Los datos recolectados al finalizar el experimento fueron evaluados con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para determinar qué tipo de prueba estadística

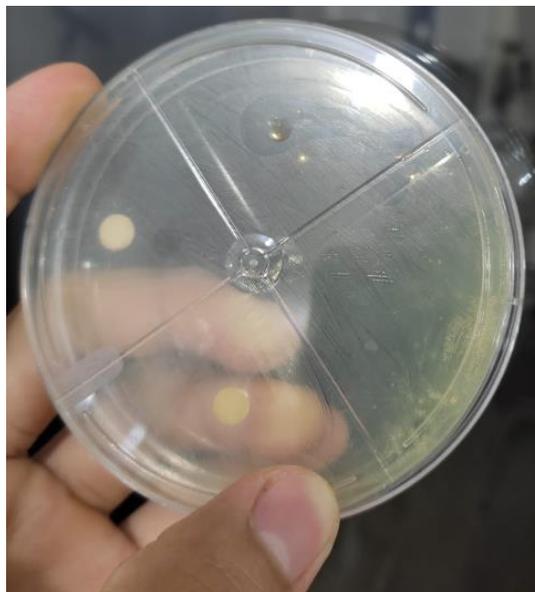
aplicar en la comparaciones de los tratamientos. Con respecto a los datos de *Vibrios* y hemocitos, ya que no cumplieron con los supuestos anteriormente mencionados, se procedió a analizarlos a través de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes. En los datos de bacterias heterótrofas se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad, por lo tanto se lo analizó a través de la prueba paramétrica de ANOVA de un factor intergrupos. Los datos se analizaron en el programa estadístico SPSS Statistics versión 22 para Windows, con un nivel de confiabilidad del 95% ($\alpha=0,05$).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto inhibitorio frente a *Vibrios*

El resultado obtenido del aceite esencial de orégano para determinar su efecto antibacteriano contra patógenos *Vibrios* en la prueba de antibiograma fue un halo de inhibición de 16 mm.

Figura 5 Antibiograma del aceite esencial de orégano



Es importante realizar la prueba de antibiograma porque nos permite observar cuan efectivo es el producto natural que se va a ocupar sobre la bacteria al cual se quiere disminuir o combatir; esta efectividad se mide a través del diámetro de halo de inhibición. Los datos obtenidos en la presente investigación coinciden con Aguirre (2019) quien demostró efecto inhibitorio frente a 4 cepas de *Vibrios spp.* (HP2-V, HP4-V1, Im-Alg, Im-Tum) con el tratamiento de 100% de extracto de orégano sin ninguna dilución, donde obtuvo halos de inhibición con diámetros entre $8,4 \pm 2,6$ mm y $14,0 \pm 3,2$ mm, siendo el último 3 veces mayor al generado por la oxitetraciclina ($5,4 \pm 0,9$ mm) en la cepa Im-Alg. En otra investigación de Morales-Covarrubias *et al.* (2016) también encontró grado inhibitorio en la hoja de orégano contra *Vibrio spp.* donde se produjo halos entre 9,2 y 18,8 mm.

En la investigación realizada por Chávez *et al.* (2008) donde se mezcló 5 μ l de Gentamicina y 5 μ l de aceite esencial de orégano al 75% produjo un halo de inhibición de 22,37 mm que

comprobó el efecto antimicrobiano del aceite frente a *E. coli*. De igual manera, Lopez (2018) al evaluar la concentración de 60% diluido del aceite esencial de orégano (+ tween 80) contra *E. coli* se produjo un halo de 17,62 mm que lo convierte en el tratamiento antimicrobiano más efectivo.

Por lo tanto, el halo obtenido en la presente investigación con 16 mm es similar a los resultados de las investigaciones citadas anteriormente, con lo cual, se considera que el aceite esencial de orégano utilizado en esta experimentación puede cumplir actividad antimicrobiana.

7.2 Influencia del aceite esencial de orégano contra bacterias heterótrofas

El resultado obtenido a partir del análisis de ANOVA de un factor inter-grupos en las bacterias heterótrofas establece que no existió una diferencia significativa de los tratamientos (T1: 50 µg/ml carvacrol y T2: 100 µg/ml carvacrol) con respecto al tratamiento control (sin aplicación de EO), dado que el p-valor fue $>0,05$ (0,695) (tabla 3).

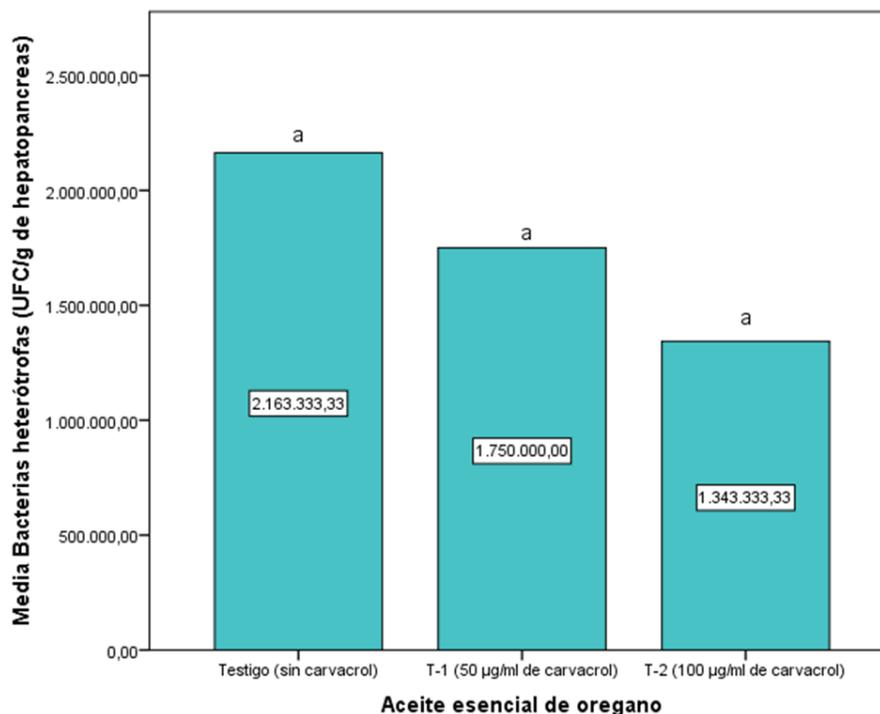
Tabla 3 ANOVA de un factor intergrupos en los datos obtenidos de bacterias heterótrofas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	1,0E+12	2	5,0E+11	,387	,695
Dentro de grupos	7,8E+12	6	1,3E+12		
Total	8,8E+12	8			

Nota: gl=grados de libertad. F=Estadístico F.

En cuanto a la prueba post hoc no hubo subconjuntos diferentes como se puede observar en la figura 6.

Figura 6 Concentración de bacterias heterótrofas (UFC/g de HP) en función a las diferentes dosis (test de Duncan)



Nota: Las letras minúsculas indican diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0,05$) (prueba de Duncan).

En la figura 6 sobre las diferentes concentraciones de bacterias heterótrofas después de la aplicación de las distintas dosis del EO de orégano, a pesar de que no se puede observar una reducción significativa de los tratamientos 1 y 2 en comparación al testigo, sí existe una diferencia práctica, lo cual se aprecia una disminución progresiva de 19,1% en T1 y 37,9% en T2 con respecto al control ($2,16 \times 10^6$). Por medio de los resultados presentados se puede inferir que el efecto del aceite esencial de orégano en la carga bacteriana de microorganismos heterótrofos es positivo, presentándose mayor reducción al momento que va aumento la dosis del aceite, lo cual se puede apreciar también en los resultados obtenidos por Parra & Paredes (2022) que a las 24 horas se realizó un análisis donde se obtuvo una concentración de bacterias heterótrofas de $2,92 \times 10^5$ (AE orégano a 0,04 ppm) pero al transcurrir el tiempo y volver hacer un análisis después de 96 horas se obtuvo una concentración de $2,54 \times 10^5$ (AE orégano a 0,04 ppm), en cambio con una dosis de 0,4 ppm del AE a las 24 horas se obtuvo $1,25 \times 10^5$ y a las 96 horas se obtuvieron $3,88 \times 10^4$; que si bien es cierto existe una disminución

práctica de la carga bacteriana, este es mínimo como los datos obtenidos en esta experimentación

7.3 Influencia de las dosis del aceite esencial de orégano contra bacterias *Vibrios*

Los resultados obtenidos después del análisis de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en concentraciones de bacterias *Vibrios* demostraron que no existió diferencia significativa estadísticamente por el p-valor $>0,05$ (0,113). Por consiguiente, se mantiene la hipótesis nula la cual determina que las medias de la carga de *Vibrios* con respecto a las diferentes dosis de aceite esencial de orégano son iguales (tabla 4).

Tabla 4 Contraste de prueba de hipótesis para verificar diferencias entre las dosis del aceite esencial de orégano en bacterias *Vibrios*

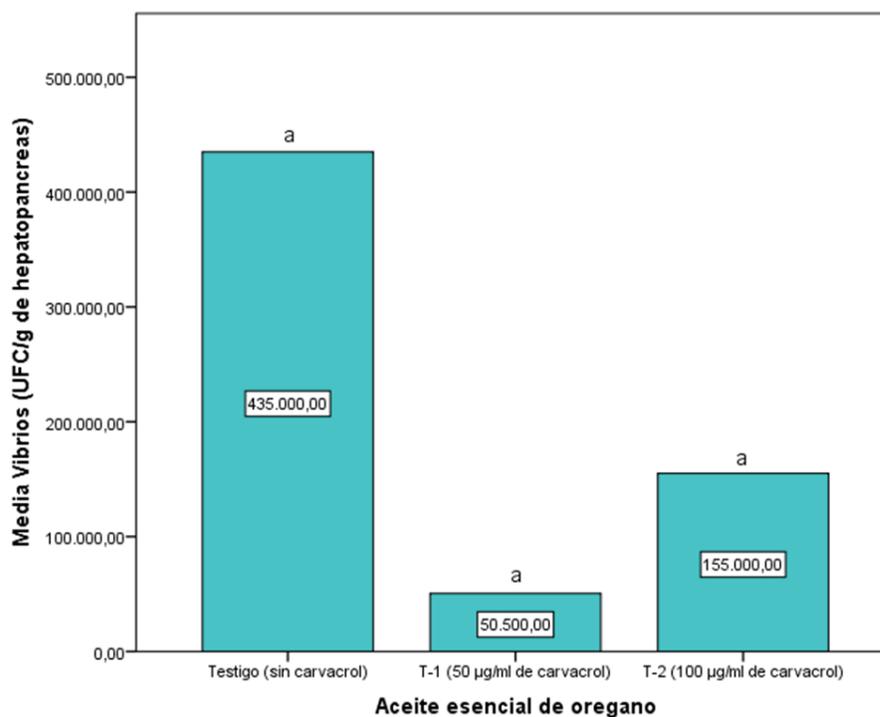
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de <i>Vibrios</i> (UFC/g de hepatopancreas) es la misma entre las categorías de Aceite esencial de orégano.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,113	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Nota: Sig= p-valor

En la figura 7 se puede observar diferencia práctica entre los tratamientos, donde el tratamiento 1 (50 $\mu\text{g/ml}$ carvacrol) en comparación con los demás hubo mayor reducción de la carga bacteriana.

Figura 7 Efecto de las dosis del aceite esencial de orégano en las Unidades Formadoras de Colonia de *Vibrios*



Nota: Las letras minúsculas indican diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0,05$) (prueba de Duncan).

En los resultados del experimento se puede apreciar en la figura 7 que existe una reducción del 88,4% y 64,37% en la carga bacteriana *Vibrio* de los tratamientos 1 y 2 respectivamente con respecto al control, debido a las propiedades antibacterianas de los compuestos activos de carvacrol y timol presentes en el aceite esencial, lo que se concuerda con Sorroza *et al.* (2017) que hacen mención que al estar presente en gran abundancia los componentes de carvacrol y timol tienen eficacia contra bacterias Gram positivas y negativas. También se corrobora con Sotomayor *et al.* (2019) donde indica que el aceite esencial de orégano tiene eficacia en la inhibición bacteriana con bacterias Gram negativas.

En la investigación realizada por Gracia *et al.* (2014) demuestran un efecto antimicrobiano ante las bacterias Gram-negativas como los *Vibrios* con el uso del aceite esencial de orégano por lo que lograron disminuir los recuentos de *V. vulnificus*, *V. cholerae* y *V.*

parahaemolyticus en hepatopáncreas y músculo de juveniles de *P. vannamei*. Por lo anteriormente mencionado, los resultados de la presente investigación se lo pueden relacionar con los de Gracia y colaboradores que, a pesar de no haber sido identificadas las especies de *Vibrios* en este experimento se argumenta sí pudieron estar presentes ya que los materiales para esta experimentación fueron recolectados de una camaronera y como menciona Aguirre (2019) los principales patógenos para la actividad acuícola son *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* y *V. harveyi*.

7.4 Influencia de las dosis del aceite esencial de orégano en las concentraciones de hemocitos

Mediante el análisis llevado a cabo por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se demuestra que existió diferencia significativa por p-valor <0,05 (0,000) entre los tratamientos con respecto a las concentraciones de hemocitos en la hemolinfa de los camarones. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la del investigador, la cual determina que al menos una de las medias de la concentración de hemocitos con respecto a las dosis de aceite esencial de orégano es diferente (tabla 5).

Tabla 5 Contraste de prueba de hipótesis para verificar diferencias entre las dosis del aceite esencial de orégano en concentración de hemocitos

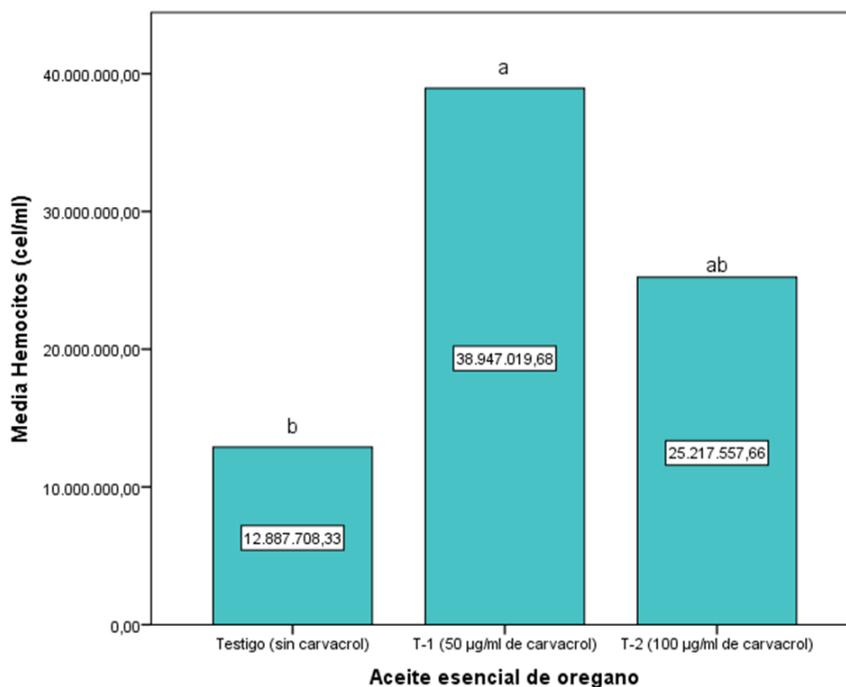
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Hemocitos (cel/ml) es la misma entre las categorías de Aceite esencial de oregano.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Nota: Sig= p-valor

En la figura 8 se puede observar que en el tratamiento 1 (subconjunto a) existe diferencia significativa al obtener mayor concentración de células hemocíticas por mililitro de hemolinfa en comparación al tratamiento control (subconjunto b). Por otro lado, el tratamiento 2 (subconjunto ab) presenta igualdad estadística con respecto a los demás tratamientos.

Figura 8 Efecto de las dosis del aceite esencial de orégano en las concentraciones de hemocitos (cel/ml)



Nota: Las letras minúsculas indican diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0,05$) (prueba de Duncan).

En la actividad acuícola las plantas medicinales son usadas porque presentan algunas características beneficiosas, entre ellas inmunoestimulantes, anti estrés, antibacterianas, logrando ser efectivas contra enfermedades (Hai, 2015). Existe mayor concentración de hemocitos en el tratamiento 1 ($3,8 \times 10^7$ cel/ml) porque las células inmunitarias actúan contra las bacterias *Vibrios*. Esta relación es explicada por Camacho (2012) donde menciona que el incremento de los hemocitos, especialmente de los hialinos, se da por la presencia de un agente patógeno lo cual activa los efectores de la parte inmunológica celular para la eliminación de los microorganismos invasores.

Todo lo contrario se observa en los resultados del tratamiento 2, a pesar de que la dosis aplicada tiene una mayor concentración en comparación al tratamiento 1, se presencia una reducción del 35,25%, equivalente a $2,5 \times 10^7$ cel/ml. Por lo tanto se plantea que la concentración máxima evaluada (100 µg/ml carvacrol) logra afectar la cantidad de hemocitos como se menciona en la investigación realizada por Sotomayor *et al.* (2019) por más que los

aceites esenciales tienen un alto potencial frente al crecimiento bacteriano, tienden a ser tóxicos en concentraciones altas, y con lo cual concuerda con Domínguez (2020) donde reporta que la dosis máxima empleada (10 $\mu\text{g/ml}$) de los EOs afectó la viabilidad de los hemocitos presentes en la hemolinfa de las postlarvas de camarón blanco.

8 CONCLUSIONES

La eficiencia del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) en la disminución *Vibrios* y bacterias heterotróficas no fue del todo efectiva debido que estadísticamente no se encontró diferencias entre los tratamientos, pero si una diferencia práctica, teniendo como la mejor dosis al tratamiento 1 (50 µg/ml).

Sin embargo, en la concentración de hemocitos si se pudo observar una diferencia significativa entre los tratamientos, identificando a la dosis de 50 µg/ml como la más efectiva en el aumento de estas células

In-vitro se pudo evaluar que el aceite esencial de orégano tuvo un efecto inhibitorio intermedio frente a bacterias del género *Vibrio* lo que sugiere que podría tener un efecto bacteriostático sobre estos microorganismos pudiendo ser utilizadas frente enfermedad producidas por los *Vibrios*.

Los resultados en relación con las dosis sugieren que a una mayor concentración no se reduce la carga bacteriana y además se observó una reducción en las células sanguíneas lo que indica que estos aceites esenciales podrían ser tóxicos para los hemocitos.

Finalmente se sugiere que la adición de aceites esenciales en una concentración adecuada puede tener un impacto positivo en la salud de los animales en especial sobre el sistema inmune.

9 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre la hidroestabilidad de los balanceados posterior a la adición de los aceites en modo de extrapellet y como sería su eficiencia al añadirlo de manera intrapellet.
- Evaluar la eficacia de la combinación de aceite esencial de orégano con otros aditivos alimentarios para determinar si se pueden obtener efectos sinérgicos.
- Evaluar otros parámetros de salud además de la presencia de *Vibrios*, bacterias heterotróficas y hemocitos, lo cual puede proporcionar una comprensión más completa de los efectos del aceite esencial de orégano en la salud de camarón.
- Evaluar una dosis intermedia entre los tratamientos estudiados para verificar si tiene un efecto positivo en el animal.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Chibani, C., Roth, O., Liesegang, H., & Wendling, C. (2020). Genomic variation among closely related *Vibrio alginolyticus* strains is located on mobile genetic elements. *BMC Genomics*, 354, 21. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6735-5>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Li, X., Zhou, Y., Jiang, Q., Yang, H., Pi, D., Liu, X., Gao, X., Chen, N., & Zhang, X. (2019). Virulence properties of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased zoea of freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Microbial Pathogenesis*, 127, 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.002>
- Zhang, X.-H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Mar Life Sci Technol*, 2, 231–245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>
- Aguirre, L. (2019). *Efecto del neem (Azadirachta indica) y orégano (Origanum vulgare) en el crecimiento de Vibrio spp resistentes a antibióticos, aislados de Litopenaeus vannamei [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Tumbes]*. Repositorio Institucional. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/487/TESIS%20-%20AGUIRRE%20CHANTA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aguirre, L., Sánchez, H., & Ordinola, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio spp* aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú*, 32(4). <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Al-Sagheer, A., Mahmoud, H., Reda, F., Mahgoub, S., & Ayyat, M. (13 de Octubre de 2017). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities.

Aquaculture Nutrition, 24(3), 1006-1014.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/anu.12637>

Argüello, B. (2014). *Identificación molecular de comunidades bacterianas Gram negativas en agua de un sistema de Pre-criadero de Litopenaeus vannamei [tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]*. Repositorio Institucional. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25053/1/bolivar%20arguello.pdf>

Bernal, C. (2020). *Análisis bibliográfico de la bacteria del genero Vibrio spp. en America del Sur y su relación con la acuicultura [tesis de pregrado, Universidad Católica de la Santísima Concepción]*. Repositorio Institucional. http://repositoriodigital.ucsc.cl/bitstream/handle/25022009/2125/Bernal_Constanza_Memoria-An%c3%a1lisis%20bibliogr%c3%a1fico%20de%20la%20bacteria%20del%20g%c3%a9nero.pdf?sequence=4&isAllowed=y

Burgos, F. (2005). *Efecto de las cepas probióticas P62 (Vibrio sp.) y P64 (Bacillus sp.) en un sistema de cultivo del camarón Litopenaeus vannamei [tesis de posgrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]*. Repositorio Institucional. <http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/Burgos%20Paquita.pdf>

Calva, B. (2020). *Prevalencia de Pseudomona sp. en nauplios Litopenaeus vannamei en el laboratorio Aquatropical de Salinas [tesis de pregrado, Universidad Agraria del Ecuador]*. Repositorio Institucional. <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/CALVA%20PACHECO%20BIANCA%20PIERINA.pdf>

Camacho, M. (2012). *Efecto de la aplicación de probióticos en diastas para camarón blanco Litopenaeus vannamei, mediante indicadores de crecimiento y respuesta inmune [tesis de posgrado, Instituto Tecnológico de Sonora]*. Repositorio institucional, Obregón. http://biblioteca.itson.mx/dac_new/tesis/516_camacho_marcela.pdf

- Campoverde, M. (2015). *Evaluación del efecto de dos plantas medicinales sobre la presencia de vibrios en agua de piscina camaronera [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala]*. Repositorio Institucional. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3040/1/CD00019_TRABAJOD ETITULACION.pdf
- Castellano, F. (2021). *Efecto de dietas con Spirulina SP contra bacterias patógenas de tipo vibrio en camarón blanco Litopenaeus Vannamei) [tesis de pregrado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]*. Repositorio Institucional. <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/6157/1/T-UTEQ-293.pdf>
- Castillo, A. (2017). *Caracterización fenotípica, bioquímica y genética de Flavobacterium psychrophilum. Obtenidas de casos de Síndrome del Alevín de la trucha arcoíris (RTFS) [tesis de posgrado, Universidad Autónoma del Estado de México]*. Repositorio Institucional. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/71044/Tesis%20Maestria%20Alma%20Castillo%20RTFS%20%20-%20%202017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cerdá, R. (2020). *Encapsulación de aceites esenciales para obtención de films de PLA funcionales para el sector envase y embalaje. [tesis de posgrado, Univesidad Politécnica de Valencia]*. Repositorio Institucional. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/149586/Cerd%c3%a1%20-%20Encapsulaci%c3%b3n%20de%20aceites%20esenciales%20para%20obtenci%c3%b3n%20de%20films%20de%20PLA%20funcionales%20para%20el%20se....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cerna-Chávez, E., Alejandro-Rojas, G., Ochoa-Fuentes, Y., Aguirre-Uribe, L., Landeros-Flores, J., & Hernández-Bautista, O. (2019). Evaluación *in vitro* de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos. *Scientia fungorum*, 49, e1245. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1245>
- Chávez, L., Díaz, F., Escalante, G., & Estrada, E. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *CIMEL*

- Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 13(2), 45-48.
<https://www.redalyc.org/pdf/717/71720916003.pdf>
- Chen, W.-M., Yang, C.-C., Sheu, C., Kwon, S.-W., & Sheu, S.-Y. (2020). *Flavobacterium ichthyis* sp. nov., isolated from a fish pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(9). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004384>
- Coronel, J. (2019). *Uso de fármacos utilizados para tratamiento profiláctico y terapéutico de la vibriosis en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei [Examen complejo, Universidad Técnica de Machala]*. Repositorio Institucional. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13765/1/DE00001_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Domínguez, C. (2020). *Aceites esenciales como inhibidores de la virulencia de Vibrio spp. patógenos de camarón P. vannamei [tesis de posgrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]*. Repositorio Institucional. <http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/2020/Publicaciones/tesis/2020%20Cristobal%20Dominguez.pdf>
- Fazelan, Z., Akrami, R., & Morteza, S. (25 de Agosto de 2020). Effects of different levels of chamomile extract on growth and antioxidant parameters of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Biology*, 8(4), 288-295. <http://ij-aquaticbiology.com/index.php/ijab/article/view/947>
- Garcia, M. (2017). *Calidad bacteriológica del agua en sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi* [tesis de posgrado, CICESE]*. Repositorio Institucional, Baja California. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1594/1/tesis_Garcia_Mendoza_Miriam_Esther_12_sep_2017.pdf
- García, P. (2017). *Acción y control de los vibrios en el ciclo de engorde de los camarones Litopenaeus vannamei [Examen Complejivo, Universidad Técnica de Machala]*. Repositorio Institucional. http://186.3.32.121/bitstream/48000/11350/1/DE00012_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf

- Gil-Hoyo, L. (2018). *Uso de aceites esenciales como alternativa antimicrobiana contra infecciones de tipo bacteriano-revisión de literatura [Monografía, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]*. Repositorio Institucional. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3651/Monografia%20aceites%20esenciales%20final.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Gracia, M., Vergara, M., Baez, M., & Cabrera, F. (2014). Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1367-1370. <https://doi.org/10.2298/ABS1404367G>
- Gutiérrez, G., Galaviz, L., Guzmán, F., Hernández, M., & Roy, L. (2015). Enteritis Hemocítica en *Litopenaeus vannamei* (Crustácea Decápoda) en cultivo de baja salinidad en Tamaulipas, México. *Hidrobiológica*, 25(1). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972015000100014
- Gyraite, G., Katarzyte, M., & Schernewski, G. (2019). First findings of potentially human pathogenic bacteria *Vibrio* in the south-eastern Baltic Sea coastal and transitional bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110546. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110546>
- Hai, N. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*(119), 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Huang, H.-T., Liao, Z.-H., Wu, Y.-S., Lin, Y.-J., Kang, Y.-S., & Nan, F.-H. (2022). Effects of *Bidens alba* and *Plectranthus amboinicus* dietary supplements on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white leg shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 546, 737306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737306>
- Karnjana, K., Soowannayan, C., & Wongprasert, K. (2019). Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.058>

- Latif, F. (2015). *Aeromonas, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal [tesis doctoral, Universitat Rovira i Virgili]*. Repositorio Institucional. [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/334686/Tesi%20Fadua.pdf?sequence=1&isAllowed=\\$=\\$y](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/334686/Tesi%20Fadua.pdf?sequence=1&isAllowed=$=$y)
- Leng, F., Lin, S., Wu, W., Zhang, J., Song, J., & Zhong, M. (2019). Epidemiology, pathogenetic mechanism, clinical characteristics, and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: a case report and literature review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(11), 1999–2004. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03629-5>
- Licona, A. (2022). *Efecto de la suplementación de inmunoestimulantes sobre parámetros inmunológicos, expresión de genes y resistencia a Vibrio parahaemolyticus en camarón blanco Penaeus vannamei [tesis doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.]*. Repositorio Institucional. http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3106/licona_a%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Lopez, E. (2018). *Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) sobre cepas certificadas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]*. Repositorio institucional, Cevallos. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis%20130%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568.pdf>
- Luo, K., Zhao, P., He, Y., Kang, S., Shen, C., Wang, S., Guo, M., Wang, L., & Shi, C. (2022). Antibacterial Effect of Oregano Essential Oil against *Vibrio vulnificus* and Its Mechanism. *Foods*, 11(3), 403. <https://doi.org/10.3390/foods11030403>
- Martínez, L., Gollas, T., Garibay, E., Valenzuela, R., Martínez, M., Porchas, M., Sánchez, A., & Mendoza, F. (2016). Physiological and immune response of *Litopenaeus vannamei* undergoing the acute phase of the necrotizing hepatopancreatitis disease and after being treated with oxytetracycline and FF. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(3), 535-545. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue3-fulltext-12>

- Medina, D. (2018). *Evaluación de alimento enriquecido con Dunaliella sp. para incrementar la resistencia del camarón blanco (Litopenaeus vanamei) a infecciones experimentales por Vibrio parahaemolyticus*[tesis doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste,S.C.]. Repositorio Institucional. http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2811/medina_d%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Melgaço-Heluy, G. (2019). *Óleo essencial de orégano (Origanum vulgare) como aditivo em dieta para alevinos de tilápia Oreochromis niloticus criadas em água salinizada* [tesis de posgrado, Universidad Federal Rural de Río de Janeiro]. Repositorio Institucional. <https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/jspui/5261/2/2019%20-%20Guilherme%20Melga%C3%A7o%20Heluy.pdf>
- Merchán, F. (2017). *Relación de la materia orgánica con la comunidad bacteriana en suelos de piscinas de cultivo de Litopenaeus vannamei* [Examen complejo, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio Institucional. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11353/1/DE00015_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Molina, Z., Cázares, G., Ibarra, J., & Galaviz, L. (2021). Actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a *vibrio parahaemolyticus* AHPND como patógeno de camarón en cultivos. *AquaTechnica*, 3(2), 78-90. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5279224>
- Moncada, A. (2022). *Importancia de la tinción de gram en la identificación de patógenos presentes en el cultivo de Litopenaeus vannamei* [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18554/1/ECUACA-2022-IAC-DE00006.pdf>
- Montes, G., Mátal, V., & Segovia, J. (2021). Bacterias heterótrofas de la zona arrecifal del Área Natural Protegida Complejo Los Cóbanos, Sonsonate, El Salvador. *Realidad y Reflexión*(54), 17-35. <https://www.camjol.info/index.php/RyR/article/view/12054/13980>

- Morales, M., & Gomez, B. (2014). Enfermedades bacterianas de camarones. En V. Morales, & J. Cuéllar, *Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos* (págs. 167-192). <https://doi.org/978-9962-8500-7-6>
- Morales, M., Ruiz, A., Moura, A., Solís, V., & Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 21(5), 434-446. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95919362010>
- Morales-Covarrubias, M., García-Aguilar, N., Bolan-Mejía, M., & Puello-Cruz, A. (2016). Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122(1), 57-65. <https://doi.org/10.3354/dao03060>
- Mota, M. (1996). *Farmacología veterinaria*. 1ra ed. Universidad Veracruzana. <https://doi.org/9789688343593>
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M., Md- Yusof, F., Shariff, M., Ismail, S., & Natrah, I. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, 511, 734227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734227>
- Otero, J. (2018). *Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) y sus métodos de control [Examen complejo, Universidad Técnica de Machala]*. Repositorio Institucional. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12225/1/DE00002_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Pájaro, N., Méndez, G., Osorio-Fortich, M., Granados-Conde, C., & Torrenegra-Alarcón, M. (11 de Marzo de 2019). Potencialidades de una mezcla de aceites esenciales frente a bacterias implicadas en el acné. *Revista Cubana de Farmacia*, 51(4). <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/257/174>

- Parmar, P., Yusufzai, S., Parmar, H., & Nanjiyani, R. C. (2018). Therapeutic potentiality of florfenicol against vibriosis in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(5), 463-467.
<https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue5/PartH/6-5-12-915.pdf>
- Parra, C., & Paredes, A. (2022). Uso de aceites esenciales frente a antibióticos empleados en larvas de *Anadara tuberculosa* [tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. *Guayaquil*. Repositorio institucional.
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/55844/1/T-112343%20%20Parra-Paredes.PDF>
- Parrado, M., Salas, M., Hernández, G., Ortega, J., & Yossa, M. (2014). Variedad bacteriana en cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. *ORINOQUIA SUPLEMENTO*, 18(2). <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v18s1/v18s1a11.pdf>
- Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonaa aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena Infectol*, 36(2), 180-189.
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v36n2/0716-1018-rci-36-02-0180.pdf>
- Peralta, J., Rabelo, M., Perez, C., Martín, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Baños, A., Ariza, J., & Martínez, M. (2021). Alternativa al uso de antibióticos en animales de granja y acuicultura. *Biosaia*, 14-18.
<https://www.upo.es/revistas/index.php/biosaia/article/view/5829/4993>
- Pérez, J. (2003). *Caracterización de las secuencias ribosomales 16s (ADNr) de cianobacterias asociadas a eventos de toxicidad [tesis de posgrado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.]*. Repositorio Institucional.
https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/505/1/perez_j.pdf
- Pérez, M., Alvarez, Y., Soriano, J., & Pérez, M. (abril de 2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/Perez>

- Pita, W., Julyta, E., Wulansarie, R., & Suryantob, A. (2018). Ozone Disinfection of *Vibrio vulnificus* in Shrimp Pond Water. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 316(1), 012067. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/316/1/012067>
- Pulgarín Sánchez, R. J., & Mora Coello, R. A. (10 de Febrero de 2022). Comportamiento de las exportaciones de camarón y su incidencia en el crecimiento económico del Ecuador en el periodo 2011-2021. *Polo del conocimiento*, 7(2), 810-837. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i1.3620>
- Redrován, K. (2017). *Medidas terapéuticas para el control de vibriosis en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei [Examen Complexivo, Universidad Técnica de Machala]*. Repositorio Institucional. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11355/1/DE00017_EXAMENC OMPLEXIVO.pdf
- Rendón, L., & Balcázar, J. (2003). Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *AquaTIC*(29), 27-33. http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_4.pdf
- Rentería, F. (2018). *Obtención y evaluación de fagos para el control de bacterias patógenas tipo Vibrio en camarón blanco Litopenaeus vannamei [tesis de posgrado, Universidad Estatal de Sonora]*. Repositorio Institucional. <http://investigacionyposgrado.ues.mx/archivos/repositorio/07182018%20Renter% C3%ADa-Flores.pdf>
- Reyes, R., & Valle, C. (2021). *Diseño de un protocolo de inclusión de aceites esenciales, como profiláctico y nutraceutico, para la optimización del proceso de producción de camarón blanco (Penaeus vannamei). [tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]*. Repositorio Institucional. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/51438/1/T-76724.pdf>
- Ron, E., Tamayo, M., & Plua del Valle, F. V. (2020). Técnicas eficientes para el monitoreo y evaluación de biorremediación. *Panorama Acuicola Magazine*, 25(3), 90-93. https://issuu.com/designpublications/docs/panorama_acuicola_25-3_marzo_abril_2020_digital

- Rubio, D., Valenzuela, W., Parra, G., & Santamaria, A. (2014). Respuesta de metabolitos en hemolinfa y desempeño productivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en laboratorio. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(3), 601-606. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000300017>
- Saavedra-Olivos, K., Peralta-Ortiz, T., Ordinola-Zapata, A., Sandoval-Ramayoni, J., Vieyra-Peña, E., Zapata-Cruz, M., Hidalgo-Mogollón, A., Morán-Ávila, B., Mendoza-Neyra, O., Mendoza-Dioses, M., & Campoverde-Peña, S. (2018). Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 328-338. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>
- Sarango, E. (2021). *Identificación de microorganismos patógenos que afectan en el estado larval de camarón blanco (Litopenaeus vannamei) (Examen Complexivo, Universidad Técnica de Machala)*. Repositorio Institucional. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/17520/1/ECUACA-2021-IAC-DE00019.pdf>
- Saucedo, J., Honorio, C., Vallenas, Y., & Acuña, A. (octubre de 2020). Bacteriófagos: aliados para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura. Un primer punto de partida en la acuicultura ecológica. (S. A. Society, Ed.) *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(2), 107-121. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2020.070200107>
- Shunmugam, R., Balusamy, S., Kumar, V., Menon, S., Lakshmi, T., & Perumalsamy, H. (2021). Biosynthesis of gold nanoparticles using marine microbe (*Vibrio alginolyticus*) and its anticancer and antioxidant analysis. *Journal of King Saud University - Science*, 33(1), 101260. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101260>
- Silva, F. (abril de 2011). *Aeromonas* spp. *Revista Chilena de Infectología*, 28(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000200008>
- Soltani, S., Shakeri, A., Iranshahi, M., & Boozari, M. (2021). A Review of the Phytochemistry and Antimicrobial Properties of *Origanum vulgare* L. and

- Subspecies. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 20(2), 268–285.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.113874.14539>
- Sorroza, L., Campoverde, M., & Santacruz, R. (2017). Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para su uso en acuicultura. *AquaTIC*(49), 1-7.
<http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/285/303>
- Sotomayor, M., Reyes, J., Restrepo, L., Domínguez, 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(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Soto-Vásquez, M., & Alvarado-García, P. (2018). Efecto del aceite esencial de *Peperomia dolabriformis* y meditación mindfulness en niveles de ansiedad y estrés académico de estudiantes universitarios. *Medicina Naturista*, 12(1), 9-14. <https://doi.org/1576-3080>
- Tenecota, R., Mite, J., & Alcívar, S. (2018). Enfermedades, tratamientos y recomendaciones en el cultivo del camarón. *Espirales*, 2(22), 94-107.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.31876/re.v2i22.379>
- Timón, R., & Jiménez, L. (2006). Mastitis causada por *Streptococcus uberis*. Situación en España. *Revista Frisona Española*(156).
https://www.revistafrisona.com/Portals/0/articulos/n156/A15604.pdf?ver=V5xU5D3xbp_TF8JDxf4gbQ%3d%3d
- Trujillo, E. (2016). *Neutralización de la toxinas PirA y PirB de Vibrio parahaemolyticus asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos [tesis de posgrado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.]*. Repositorio Institucional.
https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/36/1/trujillo_e.pdf

- van de Braak, C., Faber, R., & Boon, J. (1996). Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comparative Haematology International*, 6, 194-203. <https://doi.org/10.1007/BF00378110>
- Varela, A., & Alfaro, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000100001
- Varela, A., & Choc, L. (11 de Agosto de 2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>
- Vieira, F., Bolivar, N., Chamorro, E., Dias, D., Quadros, W., & Hayashi, L. (2017). Aditivos alimentarios para camarones marinos: salud y nutrición. En L. Cruz, D. Ricque, M. Tapia, M. Nieto, D. Villarreal, J. Gamboa, L. López, & M. Galaviz, *Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola* (págs. 78-105). Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/download/4/4/6>
- Wiradana, P., Sani, M., Mawli, R., Ashshoffa, F., Widhiantara, I., & Mukti, A. (2022). Monitoring the occurrence of Zoea Syndrome (ZS) in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larval from several hatcheries in East Java, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1036, 012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1036/1/012003>

11 ANEXOS

Anexo A Obtención de camarones en la camaronera LIGFA



Anexo B Selección de camarones



Anexo B Unidades experimentales con sus camarones



Anexo C Medición de amonio



Anexo D Aceite esencial de orégano



Anexo E Pegante acuícola Acuapega



Anexo F Materiales utilizados en la preparación de los tratamientos con el pegante.



Anexo G Preparación del pegante con el aceite esencial



Anexo H Dosis de alimento diario



Anexo I Preparación de alimento con las dosis



Anexo J Extracción de hemocitos



Anexo K Extracción de hepatopáncreas



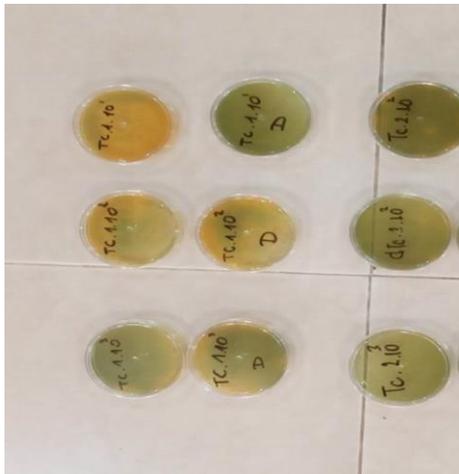
Anexo L Conteo de hemocitos



Anexo M Siembra en placas



Anexo N Desarrollo de los Vibrios en agar TCBS



Anexo O Desarrollo de bacterias heterotróficas en agar Marino.

