



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Efecto del extracto de oreganón (*Plectranthus amboinicus*) en fresco,  
aplicado sobre la dieta para la reducción *Vibrios* spp en *Litopenaeus*  
*vannamei***

**BARROS CAMARGO OMAR GERONIMO  
INGENIERO ACUICOLA**

**CORREA ROSALES YULIANA MISHHELL  
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA  
2024**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Efecto del extracto de oregán (Plectranthus amboinicus) en fresco,  
aplicado sobre la dieta para la reducción Vibrios spp en  
Litopenaeus vannamei**

**BARROS CAMARGO OMAR GERONIMO  
INGENIERO ACUICOLA**

**CORREA ROSALES YULIANA MISHHELL  
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA  
2024**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**Efecto del extracto de oreganón (*Plectranthus amboinicus*) en fresco, aplicado sobre la dieta para la reducción *Vibrios* spp en *Litopenaeus vannamei***

**BARROS CAMARGO OMAR GERONIMO  
INGENIERO ACUICOLA**

**CORREA ROSALES YULIANA MISHHELL  
INGENIERA ACUICOLA**

**SORROZA OCHOA LITA SCARLETT**

**MACHALA  
2024**

# TESIS\_CORREA-BARROS- 2024.docx

*por* Yuliana Correa

---

**Fecha de entrega:** 06-ago-2024 03:16p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2427823456

**Nombre del archivo:** TESIS\_CORREA-BARROS-2024.docx (1.63M)

**Total de palabras:** 5461

**Total de caracteres:** 29572

# TESIS\_CORREA-BARROS-2024.docx

## INFORME DE ORIGINALIDAD

7%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://ri.ues.edu.sv">ri.ues.edu.sv</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="http://www.scielo.org.pe">www.scielo.org.pe</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://repositorio.untumbes.edu.pe">repositorio.untumbes.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://investigacionyposgrado.ues.mx">investigacionyposgrado.ues.mx</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://aes.ucf.edu.cu">aes.ucf.edu.cu</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://ojs.unemi.edu.ec">ojs.unemi.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="http://pesquisa.bvsalud.org">pesquisa.bvsalud.org</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="http://www.prnewswire.com">www.prnewswire.com</a> Fuente de Internet	<1%
9	<a href="http://repositorio.ucv.edu.pe">repositorio.ucv.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%

10	<a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://tesis.pucp.edu.pe">tesis.pucp.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://repositorium.sdum.uminho.pt">repositorium.sdum.uminho.pt</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://repositorio.unap.edu.pe">repositorio.unap.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
14	ALTERNATIVAS DE DESARROLLO SOSTENIBLE SOCIEDAD ANONIMA CERRADA. "EIA-SD para el Desarrollo de la Actividad de Acuicultura del Recurso de Langostino en un Predio de 150.193946 ha Ubicado en el Sector El Bendito, Distrito de Zarumilla, Tumbes-IGA0005051", R.D. N° 420-2016-PRODUCE/DGCHD, 2020 Publicación	<1 %
15	<a href="http://issuu.com">issuu.com</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://repository.unad.edu.co">repository.unad.edu.co</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://www.przetargi.info">www.przetargi.info</a> Fuente de Internet	<1 %
18	Sjefke J. H. M. Allefs. "Erwinia soft rot resistance of potato cultivars transformed	<1 %

with a gene construct coding for antimicrobial peptide cecropin B is not altered", American Potato Journal, 08/1995

Publicación

19

[www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

Fuente de Internet

<1 %

20

[www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)

Fuente de Internet

<1 %

21

[www.theinsightpartners.com](http://www.theinsightpartners.com)

Fuente de Internet

<1 %

22

[aprenderly.com](http://aprenderly.com)

Fuente de Internet

<1 %

23

[www.fao.org](http://www.fao.org)

Fuente de Internet

<1 %

24

[www.hortomallas.com](http://www.hortomallas.com)

Fuente de Internet

<1 %

25

[qdoc.tips](http://qdoc.tips)

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

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

Los que suscriben, BARROS CAMARGO OMAR GERONIMO y CORREA ROSALES YULIANA MISHELL, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Efecto del extracto de oreganón (*Plectranthus amboinicus*) en fresco, aplicado sobre la dieta para la reducción *Vibrios* spp en *Litopenaeus 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.

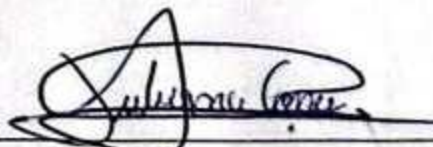
Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio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



---

BARROS CAMARGO OMAR GERONIMO

0704222751



---

CORREA ROSALES YULIANA MISHELL

0107054090



## **DEDICATORIA**

Este trabajo dedico a Dios que ha estado en todo momento guiándome, cuidándome y dándome fuerzas para seguir con mis sueños, y a mi pilar fundamental mis padres, Jorge Correa y Liliana Rosales quien han sido mi mayor apoyo y fuente de inspiración durante este camino académico, haciendo sacrificios en sus vidas para lograr que pueda cumplir mis metas.

También quiero dedicar este trabajo a mis hermanas que siempre estuvieron a mi lado durante mis años de estudio y mi pareja Dennis P., que me ha brindado su apoyo y confianza desde un inicio y siempre dándome fuerza para no rendirme durante toda la carrera.

Yuliana Mishell Correa Rosales

En primer lugar, le dedico a Dios por darme la sabiduría y su guía para poder realizarla, también agradezco a mis abuelos que han sido mis modelos para seguir de ser perseverante, que todo se puede conseguir con el esfuerzo, dedicación y el cariño que me han dado, le dedico a mis padres que me han formado con la mejor educación y los valores recibidos.

Dedico también a mis hermanos que cierta manera ha estado pendiente de mis estudios y de mi trabajo de tesis. Por último y no menos importante, dedico a todos mis familiares y que este trabajo se refleje a la dedicación y el esfuerzo, sea el primer paso para una vida llena de logros y éxitos junto de la mano de Dios todo se puede lograr.

Omar Gerónimo Barros Camargo

## **AGRADECIMIENTO**

Para la culminación de esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de muchas personas. En primer lugar, quiero dar gracias a Dios por ser mi guía en este largo camino y llenarme de confianza y sabiduría. Un agradecimiento especial a mis padres, Jorge y Liliana, por su amor, paciencia y apoyo incondicional. A mis hermanas por su comprensión y motivación. A mi pareja Dennis quien ha estado desde el día uno dándome su apoyo y confianza para cumplir esta meta.

A mis compañeros y amigos Karelys, María José, Sara, Omar, Joao, gracias por los momentos compartidos, su compañía ha sido una de las mejores durante los años de estudio, a mi compañero de tesis, Omar Barros, gracias por la confianza y dedicación en este trabajo de investigación.

También agradecer a nuestra tutora de tesis Dra. Lita Sorroza, por su paciencia y enseñanza la cual nos ayudó a mejorar cada aspecto de este trabajo, a los especialistas Biol. Milton Cun, Dr. Colon Velázquez, Ing. Patricio Quizhpe y al Ing. Cesar Valarezo por su asesoría.

Finalmente, a la Universidad Técnica de Machala, por facilitar los recursos y el ambiente adecuado para llevar a cabo nuestro trabajo de investigación.

Yuliana Mishell Correa Rosales

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por la vida y la sabiduría, de siempre estar a mi lado en cada momento, cada propósito, objetivo y decisión que he tomado y más en esta etapa universitaria que estoy concluyendo. También agradecer a mis pilares que han sido en toda mi carrera a mis abuelitos su amor incondicional, la confianza que con sus enseñanzas y educación me han criado para poder sobrellevar, su mejor herencia que es la educación que siempre me lo tenía presente.

Agradezco a mis padres por la formación, valores, ética que me han dado de la misma manera del apoyo en toda mi vida universitaria de la misma manera de su apoyo incondicional y de seguir cada paso que daba. A mis hermanos por estar pendientes de mí. Una persona muy especial que estuvo presente y pendiente en todo mi proceso de la tesis.

Agradezco también a tres amigas que han estado presente y que hemos hecho una bonita amistad llena de anécdotas Sara, María José y Yuliana. Mi compañera de Tesis Yuliana Correa agradecer primero de tenerme paciencia y la confianza para poder llevar a cabo esta investigación y que hemos hecho un buen equipo.

También agradecer a los docentes que han estado presentes en toda esta etapa universitaria en especial. A mi tutora de tesis la Dra. Lita Sorroza por todas sus enseñanzas, guías y directrices, también a los especialistas Biol. Milton Cun, Dr. Colon Velázquez, Ing. Patricio Quizhpe y al Ing. Cesar Valarezo por su asesoría.

Omar Gerónimo Barros Camargo

## RESUMEN

En los últimos años se ha evidenciado el aumento de la producción en el sector acuícola, en 2018 se obtuvo un total de 82,1 millones de toneladas de organismos acuáticos de producción en el mundo, donde 9,4 millones de toneladas fueron de crustáceos y el 52,9 % de camarón blanco. Uno de los principales desafíos en el cultivo de camarón es la vibriosis, una enfermedad bacteriana causada por el género *Vibrio*, que ha llevado a pérdidas económicas considerables. *Vibrio harveyi* es identificado como el patógeno más agresivo son responsables de la necrosis hepatopancreática aguda, conocida como síndrome de mortalidad precoz, una de las amenazas más persistentes en la industria camaronera. En cuanto al uso de antibióticos en acuicultura, se ha regulado según estándares internacionales.

En Ecuador, se utilizan antibióticos como florfenicol y oxitetraciclina para combatir la vibriosis. Sin embargo, el uso inadecuado de oxitetraciclina ha llevado a la resistencia bacteriana. Como alternativa, se están utilizando aceites esenciales de plantas medicinales, que poseen propiedades antimicrobianas y son biodegradables. Una planta destacada es *Plectranthus amboinicus*, conocida por su actividad antimicrobiana y propiedades terapéuticas, que se encuentra en regiones tropicales y subtropicales. Esta planta contiene compuestos bioactivos que ofrecen beneficios en la lucha contra enfermedades en el cultivo de camarón, representando una opción viable frente a los antibióticos.

La presente investigación tiene como objetivo Evaluar el efecto del extracto de oreganón (*Plectranthus amboinicus*) en fresco, aplicado sobre la dieta para la reducción *Vibrio spp* en *L. vannamei*. Para alcanzar el objetivo planteado, se llevarán a cabo una serie de experimentos tanto en condiciones in vitro como in vivo. Esto incluirá investigaciones exhaustivas sobre la dosis óptima de los compuestos en cuestión, evaluando tanto su toxicidad como su capacidad inhibitoria. El propósito de estos estudios es determinar la dosificación adecuada que prevenga efectos dañinos para los camarones, mientras se mantiene la eficacia en el tratamiento de enfermedades.

Para este experimento se implementaron dos tratamientos y un grupo de control, cada uno con tres réplicas, (**T0**: Solo se suministró alimento balanceado; **T1**: Alimento balanceado con el 0,25% de extracto de oreganón + pegante; **T2**: Alimento balanceado con el 0,50% de extracto de oreganón + pegante.) Se colocaron 45 organismos de *L. vannamei* al azar, los cuales fueron alimentados al 4 % de su biomasa, dos veces al día. Se realizó recambios de agua cada 3 días al 30 % y se monitorearon parámetros como la temperatura ( $26.5\pm 0.5$  °C), amonio

( $0.010 \pm 0.004$  mg/L) y pH ( $6.28 \pm 0.08$ ). Los resultados obtenidos del experimento donde ambos tratamientos obtuvieron una reducción del 98.8% y 83,33% en la carga bacteriana de *Vibrio*. Así mismo, se observó un óptimo crecimiento con la utilización del extracto de orégano donde el tratamiento Control mostró un crecimiento promedio 3.07g, el T1 del 3.12g y el T2 de un 3.23g.

Finalmente se comprobó que el extracto de orégano en fresco (tallo y hojas) podría ser una buena alternativa para combatir la vibriosis en el cultivo de camarón.

**Palabras claves:** *Oreganón, Bacterias, Cultivo, Vibrios y Litopenaeus vannamei*

## ABSTRAC

In recent years, there has been evidence of increased production in the aquaculture sector, where in 2018 a total of 82.1 million tons of production aquatic organisms were obtained in the world, of crustaceans obtained 9.4 million tons and 52.9% were white shrimp. One of the main challenges in shrimp farming is vibriosis, a bacterial disease caused by the genus *Vibrio*, which has led to considerable economic losses. *Vibrio harveyi* is identified as the most aggressive pathogen responsible for acute hepatopancreatic necrosis, known as early mortality syndrome, one of the most persistent threats in the shrimp industry. The use of antibiotics in aquaculture has been regulated according to international standards.

In Ecuador, antibiotics such as florfenicol and oxytetracycline are used to combat vibriosis. However, inappropriate use of oxytetracycline has led to bacterial resistance. As an alternative, essential oils from medicinal plants, which possess antimicrobial properties and are biodegradable, are being used. One prominent plant is *Plectranthus amboinicus*, known for its antimicrobial activity and therapeutic properties, which is found in tropical and subtropical regions. This plant contains bioactive compounds that offer benefits in the fight against diseases in shrimp farming, representing a viable option to antibiotics.

The objective of this research is to evaluate the effect of oreganon (*Plectranthus amboinicus*) extract in fresh form, applied on the diet for the reduction of *Vibrio spp* in *L. vannamei*. To achieve the stated objective, a series of experiments will be carried out under both in vitro and in vivo conditions. This will include extensive investigations on the optimal dosage of the compounds in question, evaluating both their toxicity and inhibitory capacity. The purpose of these studies is to determine the appropriate dosage that will prevent harmful effects to the shrimp, while maintaining efficacy in disease treatment.

For this experiment, two treatments and a control group were implemented, each with three replicates, (T0: Only balanced feed was provided; T1: Balanced feed with 0.25% oreganon extract + glue; T2: Balanced feed with 0.50% oreganon extract + glue). Forty-five *L. vannamei* organisms were randomly placed and fed at 4% of their biomass twice a day. Water was changed every 3 days at 30 % and parameters such as temperature ( $26.5\pm 0.5$  °C), ammonium ( $0.010\pm 0.004$  mg/L) and pH ( $6.28\pm 0.08$ ) were monitored. The results obtained from the experiment where both treatments obtained a reduction of 98.8% and 83.33% in the bacterial load of *Vibrio*. Likewise, an optimal growth was observed with the use of oregano

extract where the Control treatment showed an average growth of 3.07g, T1 of 3.12g and T2 of 3.23g.

Finally, it was proved that fresh oregano extract (stem and leaves) could be a good alternative to combat vibriosis in shrimp culture.

**Key words:** *Oregano, Bacteria, Culture, Vibrios and Litopenaeus vannamei.*

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRAC</b> .....	<b>VIII</b>
I. INTRODUCCIÓN.....	- 14 -
1.1. Planteamiento del problema.....	- 15 -
1.2. Justificación .....	- 16 -
1.3. Objetivos.....	- 17 -
1.3.1. Objetivo general.....	- 17 -
1.3.2. Objetivos específicos .....	- 17 -
1.4. Hipótesis de investigación .....	- 17 -
1.5. Revisión Bibliográfica .....	- 18 -
1.5.1. Acuicultura .....	- 18 -
1.5.2. Camarón blanco <i>L. vannamei</i> .....	- 18 -
1.5.3. Sistemas de producción.....	- 19 -
1.5.4. Enfermedades más comunes en la camaronicultura .....	- 19 -
1.5.5. Tratamientos para controlar <i>Vibrios</i> en cultivo de camarón .....	- 20 -
1.5.6. Métodos alternativos: uso de plantas medicinales en la acuicultura.....	- 21 -
1.5.7. Interacción entre el Extracto de Orégano y <i>Vibrios</i> .....	- 23 -
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 25 -
2.1. Ubicación del experimento.....	- 25 -
2.2. Materiales y Equipos.....	- 25 -
2.2.1. Insumos.....	- 25 -
2.2.2. Materiales biológicos.....	- 25 -
2.2.3. Equipos .....	- 26 -
2.2.4. Materiales .....	- 26 -
2.3. Metodología .....	- 27 -
2.3.1. Obtención de los extractos.....	- 27 -
2.3.2. Tratamiento <i>in vitro</i> .....	- 27 -
2.3.3. Obtención de los animales .....	- 27 -
2.3.4. Aclimatación de los camarones .....	- 28 -
2.3.5. Preparación del alimento con las dosis establecidas .....	- 28 -
2.3.6. Ensayo in vivo .....	- 28 -
2.3.7. Diseño experimental.....	- 29 -



2.3.8. Análisis estadísticos.....	- 29 -
III.    RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	- 31 -
3.1.    Efecto inhibitorio frente a Vibrios .....	- 31 -
3.2.    Evaluación <i>in vivo</i> de el extracto de oreganón en la disminución de vibrios .....	- 32 -
3.3.    Comparación del crecimiento del camarón.....	- 35 -
IV.    CONCLUSIONES.....	- 37 -
V.    RECOMENDACIONES .....	- 38 -
BIBLIOGRAFIA .....	- 39 -
ANEXOS .....	- 44 -

## ÍNDICE DE TABLAS

### TABLA

1: Taxonomía del Oreganón.....	22
2: Tratamiento con la respectiva dosis .....	28
3: Replica de los tratamientos .....	29
4: Diámetro de los halos de inhibición evaluados durante 48 horas.....	31
5: Número total de bacterias.....	33

## INDICE DE FIGURAS

### FIGURA

1: Ubicación de Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA).....	25
2: Resultado de los tratamientos en el antibiograma .....	31
3: Conteo inicial de Unidad formadora de colonias.....	32
4: Prueba de hipótesis Kruskal-Wallis.....	33
5: Crecimiento entre los tratamientos.....	35

## INDICE DE GRAFICOS

### GRAFICO

1: Carga bacteriana (Vibrios spp) obtenidas en el análisis.....	34
2: Crecimiento entre los tratamientos.....	35

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO

1: Recolección de los animales .....	- 44 -
2: Diseño de la unidad experimental.....	- 44 -
3: Dosis del extracto para la mezcla en el alimento .....	- 45 -
4: Recambio de agua.....	- 45 -
5: Diluciones seriadas por triplicado de la hepatopáncreas .....	- 46 -
6: Preparación de diluciones seriadas del HP por triplicado.....	- 46 -

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha demostrado el aumento de la producción en el sector acuícola, así que en 2018 se dio un total de 82,1 millones de toneladas en producción mundial en organismos acuáticos, lo cual, los crustáceos obtuvieron 9,4 millones de toneladas y el 52,9 % fueron de camarón blanco (FAO, 2020). La importancia del aumento de la producción del sector acuícola radica en que esta actividad ayuda a la contribución de proteína animal para la población humana, que va aumentando y así mismo por la alta demanda se ha convertido en unos de los sistemas de producción de mayor crecimiento (Parajales *et al.*, 2018).

Una principal enfermedad en el cultivo de camarón que está presente en los diferentes estadios es el género bacteriano la cual provoca la enfermedad de la Vibriosis donde ha sido el promotor de muchas pérdidas económicas en el sector acuícola así mismo se puede considerar al microorganismo *Vibrio harveyi* como el patógeno bacteriano más agresivo en los camarones (Kumar *et al.*, 2018). Una cepa especial de este tipo *Vibrio harveyi* y el *V. parahaemolyticus* son los principales patógenos causante de la necrosis hepatopancreática aguda, conocida comúnmente como el síndrome de la mortalidad precoz, esta enfermedad se la considera como una de las amenazas más constantes en el sector camaronero (Vikash *et al.*, 2021).

El uso de antibióticos en la acuicultura se ha regulado bajo estándares internacionales. En Ecuador los antibióticos se utilizan para controlar enfermedades como la vibriosis las cuales los más utilizados son el florfenicol y oxitetraciclina. Años atrás se usaba la oxitetraciclina para controlar los *vibrios*, pero debido a su mal uso esta bacteria ha generado resistencia a este antibiótico (Redrován, 2017). Como alternativa al uso de los antibióticos se ha usado los aceites esenciales extraídas de las plantas medicinales para combatir la vibriosis ya que contiene propiedades antimicrobianas (Liu *et al.*, 2020).

*Plectranthus amboinicus* o también conocida como oreganón, y este tipo de planta es utilizada en el ámbito medicinal debido a su bioactividad antimicrobiana. Entre sus propiedades medicinales y terapéuticas se atribuyen debido a los compuestos fitoquímicos naturales están presentes especialmente en los aceites esenciales o en el extracto de la planta (Ashaari *et al.*, 2020). Este tipo de planta aparece en las zonas tropicales como subtropicales y su origen es de Asia, África y Australia. Lo que caracteriza a esta especie son los tejidos que contiene compuesto bioactivos volátiles y no volátiles que presenta varias propiedades terapéuticas, actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, etc. (Sawant *et al.*, 2023).

### **1.1. Planteamiento del problema**

Los *Vibrios* son bacterias Gram (-) que se los puede encontrar en ambientes marinos y sedimentos alrededor del mundo, afecta a los crustáceos y en específico a los camarones, la vibriosis puede influir desde cualquier fase que se encuentre el cultivo ya sea en larvicultura o en la etapa de engorde. Y este tipo de bacterias pueden aparecer cuando existen cambios bruscos o alteraciones en los factores ambientales provocando que estas mismas se reproduzcan de una manera muy rápida. Este tipo de bacterias puede afectar a los organismos ocasionando grandes mortalidades y pérdidas económicas, y por lo tanto se debe buscar alternativas para contrarrestar este tipo de *Vibrios*.

En la acuicultura en los últimos años para eliminar este tipo de bacteria se ha utilizado diferentes tipos de antibióticos, donde los más utilizados han sido, la Oxitetraciclina y Florfenicol, pero con el paso del tiempo, el mal uso ha ocasionado que los organismos se vuelvan resistentes a los mismos, provocando la restricción del uso de fármacos en la actividad acuícola. El problema del uso de antibióticos también implica daños al medio ambiente.

## 1.2. Justificación

Una de las enfermedades más comunes en los crustáceos es el género *Vibrios*, este tipo de bacterias se encuentran en ambientes marinos que puede afectar a todo el cultivo, así ocasionado problemas en el medio ambiente de cultivo hasta una mortalidad total. Es por eso, que la investigación es realizada con la intención de evaluar el uso del oreganón (*Plectranthus amboinicus*) como un método natural.

Los antibióticos ha sido uno de los más utilizados para controlar y prevenir enfermedades en los organismos acuáticos, tanto en camarones como en peces, Pero así mismo el uso excesivo de antibióticos en la acuicultura ha causado preocupaciones al desarrollo de la resistencia bacteriana, esto significa que las bacterias se vuelven menos sensibles a los antibióticos, lo que va a restringir la efectividad a los medicamentos.

Por eso, durante muchos años se utilizó diferentes tipos de plantas naturales como un método natural para el ser humano, y para el tratamiento de diversas enfermedades, sabemos que las plantas tienen como prioridad los principios activos que actúan de una manera eficiente en el organismo y lo más importante que se puede procesarlo de diferente manera para su uso en camarones.

Para el tratamiento de distintas enfermedades se comenzó a utilizar un sin número de productos naturales elaborados a base de plantas medicinales, de esta manera ha sido empleado desde la antigüedad y no solo en la parte acuícola, sino también en la veterinaria, para el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente las bacterianas, las plantas más utilizadas son: Hierbaluisa (*Lippia citriodora*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*), Neem (*Azadirachta indica*), estos tipos de plantas pueden ayudar a inhibir o eliminar la propagación de bacterias en los organismos, y también están asociados como herbicidas, desinfectantes y desparasitantes.

Una de las plantas más utilizadas en la acuicultura es el Oreganón (*Plectranthus amboinicus*), es que se puede conseguir de una manera muy fácil, y es conocida por su rápido crecimiento, su aroma y su efecto frente a patógenos. Durante muchos años se ha empleado en las industrias alimenticias como una hierba culinaria para condimentar diferentes platillos. Además, también se ha utilizado en la medicina natural, y es reconocida para calmar dolores o diferentes tipos de infecciones causadas por hongos y bacterias.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto del extracto de oreganón (*Plectranthus amboinicus*) en fresco, aplicado sobre la dieta para la reducción *Vibrio spp* en *Litopenaeus vannamei*

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Obtener los extractos a partir de la hoja y del tallo del Oreganón (*Plectranthus amboinicus*).
- Analizar el efecto inhibitorio *in vitro* del oreganón frente a *Vibrios spp*.
- Determinar la concentración optima del extracto de oreganón en la reducción de la carga bacteriana (*Vibrios spp.*) en *L. vannamei*

#### **1.4. Hipótesis de investigación**

El uso del extracto de oreganón en fresco durante 10 días adicionado en el alimento balanceado va a reducir la carga bacteriana y obtener una mejor respuesta en el sistema inmune.

## **1.5.Revisión Bibliográfica**

### **1.5.1. Acuicultura**

La acuicultura es la cría de peces, moluscos, crustáceos y algas marinas, se la puede definir como una industria que produce alimentos importantes y de muy rápido crecimiento en el mundo. Es un sistema de producción de alimento, donde se requiere espacio y recursos sustentables debido a esto puede crear impactos ambientales negativos que pueden influir al medio ambiente y en el bienestar humano (Weitzman, 2019).

Así mismo como la acuicultura es un sistema de producción que ha generado mucho empleo y un crecimiento económico, la aplicación de la tecnología ha sido primordial para tener un mayor conocimiento y desarrollo, también ha demostrado ser un área sostenible donde apoyan la intensificación para satisfacer la demanda mundial de alimentos acuáticos y de su debida distribución (FAO, 2022).

### **1.5.2. Camarón blanco *L. vannamei***

La especie *L. vannamei* o también conocido camarón blanco del pacifico, es una de las más cultivadas en el mundo debido a su alta demanda, supervivencia, resistencia, tolerancia a enfermedades y su rápido crecimiento. También se puede cultivar en diferentes sistemas de producción para mejorar su potencial desarrollo (Amelia *et al.*, 2021).

#### ***1.5.2.1. Origen y distribución***

La especie *L. vannamei* es originario de la costa oriental del pacifico, desde el norte de México en Sonora, en Centroamérica hasta llegar al Sur en Perú, en hábitats marinos. Se comenzó a cultivar a mediados de la década de los 70 en Sudamérica países como Brasil, Ecuador, Perú, Centroamérica y en Estados unidos. La especie también es dominante en el Asia como en China, Vietnam, Tailandia e India (Albalat *et al.*,2022).

#### ***1.5.2.2. Descripción de la especie***

De todos los crustáceos lo que caracteriza al camarón blanco es su exoesqueleto rígido que facilitan su movimiento. Esta especie realiza un proceso de muda el cual cambia su exoesqueleto. Las partes del cuerpo consiste en: Cefalotórax y abdomen, donde el cefalotórax es fusión de la cabeza con el tórax y donde se encuentra los apéndices sensoriales como la antena, anténula y ojos pediculados. Por otra parte, el abdomen está dividido por 6 segmentos donde cada uno posee un par de apéndices natatorios conocidos como pleópodos y en la región terminal por 4 pares llamados urópodos y el telson (Orrala, 2021).



### **1.5.3. Sistemas de producción**

Los sistemas de producción están divididos dentro de un mapa de funciones donde se los puede clasificar según el nivel de intensidad de producción, en la actualidad se lo puede dividir como los siguientes semi-intensivo, intensivo y híper intensivo sin embargo antes en sus inicios se consideraba el sistema extensivo (Oddsson, 2020).

#### ***1.5.3.1. Sistema semi-intensivo***

Este tipo de sistema de cultivo tiene un rango de densidad de siembra entre 10 a 30 cam/m<sup>2</sup>. Por lo general estos sistemas se cultivan en estanques de tierra y mantienen recambios de agua entre 5 a 10 % diarios. Estos recambios son necesarios debido que diluyen los compuestos tóxicos, debido al poco recambio de agua esto provoca un crecimiento lento del camarón (Rojas, 2018).

#### ***1.5.3.2. Sistemas intensivos***

Este sistema se trata de obtener la mayor cantidad de organismos por m<sup>2</sup> es decir por la unidad de volumen, donde se coloca altas densidades de organismos, para esto se requiere un buen manejo, tecnificaciones, bastante inversión. Este sistema se lo está practicando en muchas partes del mundo y su enfoque de tener un producto de mayor valor y calidad. Y así mismo tener mayores ingresos. Para este sistema se realizan procesos de selección genética, con un exhaustivo control sanitario y alimento de calidad (Berger, 2020).

#### ***1.5.3.3. Sistema hiperintensivo***

En este sistema se necesita un manejo riguroso en el proceso de producción y en cada uno de los parámetros tanto fisicoquímicos y calidad del agua, se pueden realizar en estanques pequeños de concreto o plástico, donde no se realiza recambio de agua, se utilizan aireadores donde deben alcanzar niveles de oxígeno disuelto entre 4 a 6 mg/L y una densidad de siembra superior de 120 organismos/m<sup>2</sup> (Villarreal, 2022).

### **1.5.4. Enfermedades más comunes en la camaronicultura**

Entre las enfermedades más frecuentes en el sector acuícola principalmente en la camaronicultura han sido ocasionados por agentes patógenos como las bacterias, virus, protozoos y hongos. De las más notorias son las virales como IHHNV (virus de la necrosis

hipodérmica y hematopoyética infecciosa), TSV (virus del síndrome de Taura), WSSV (virus de la mancha blanca), YHV (virus de la cabeza amarilla), e IMNV (virus de la myonecrosis infecciosa). Luego están las de origen bacteriano, de estas enfermedades el género *Vibrio* es un problema en el cultivo de camarón (Santos, 2019).

#### **1.5.4.1. *Vibriosis***

Esta bacteria es un patógeno que ocasiona una de las enfermedades más importantes causadas por el género *Vibrio sp.* Afecta directamente en todas las fases de cultivo de camarón y a la economía teniendo grandes pérdidas en el sector camaronero. Entre las principales especies de vibriosis son las siguientes: *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *V. harveyi* (Ishaque, 2018).

### **1.5.5. Tratamientos para controlar *Vibrios* en cultivo de camarón**

#### **1.5.5.1. *Aplicación de antibióticos en acuicultura***

En la actividad acuícola el uso de antibióticos se ha utilizado para tratar animales enfermos o como uso preventivo como animales asintomáticos que conviven con los animales enfermos. El uso de fármacos antimicrobianos ha dado resultados erróneos y por su uso excesivo, problemas en el ambiente haciendo que las bacterias tomen resistencia por la aplicación de estos antibióticos (Varela, 2018).

Debido a las diferentes enfermedades de origen bacteriano se han utilizado diversos tipos de antibióticos para contrarrestar este tipo de bacterias, los antibióticos más utilizados en el campo acuícola son los siguientes: Florfenicol, oxitetraciclina, ormetoprim – sulfamatoxazol, sarafloxacina y enrofloxacina, quinolonas, clortetraciclina, ácido oxolínico, perfloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, sulfametazina, gentamicina y tiamulina, de los cuales no todos son permitidos en la actualidad (Correa, 2018).

#### **1.5.5.2. *Oxitetraciclina***

Este antibiótico es uno de lo más utilizados en el sector acuícola, este tipo de fármaco lo manejan más para la prevención y manejo de infecciones bacterianas en peces y camarones, como la *furunculosis*, la *aeromonosis*, la *pseudomonosis*, la *lactococosis* y la vibriosis, donde son suministrados en alimento balanceado, por baño o inyección (Lu *et al.*, 2021).

En el camarón, el antibiótico oxitetraciclina es utilizado para tratamiento de infecciones como las de NHP, forunculosis y la Vibriosis. Pero en la actualidad ya no se está utilizando como

tratamiento de Vibriosis, sino para un tratamiento de bacterias intracelulares, como NHP-B donde ha sido una buena opción para tratar esta bacteria así mismo ha tenido resultados exitosos en la eliminación y disminución de esta enfermedad (Bustamante, 2018).

#### **1.5.5.3. Florfenicol**

Este antibiótico es admitido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para el uso en el sector acuícola, está registrado en varios países como Japón, Noruega, Chile, Corea del Sur, Reino Unido, Canadá y Ecuador para tratar y prevenir enfermedades bacterianas, ha sido eficaz tanto en peces como camarones en ambientes de agua dulce como salada (Parmar *et al.*, 2018). Se ha usado para disminuir la mortalidad en los camarones por su efecto contra las bacterias patógenas. También, según estudios se ha demostrado que la absorción de este antibiótico desde el intestino tiene una reacción rápida y amplia distribución, a su vez elimina bacterias de manera rápida en el camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei* (Shakweer *et al.*, 2023).

#### **1.5.6. Métodos alternativos: uso de plantas medicinales en la acuicultura**

El sector acuícola se ha beneficiado con el uso de las plantas medicinales, que se las conoce por su nombre común: palo maría, resina maría, la grosella, cerezo occidental y la albahaca morada, que han mostrado resultados positivos contra el virus de la cabeza amarilla del camarón. Entre los aceites esenciales de plantas que han mostrado propiedades antimicrobianas están: Bálsamo, albahaca, hisopo, lavanda, orégano, neem, sage y tomillo (Aguirre, 2019).

##### **1.5.6.1. Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Es una planta medicinal que han utilizado como alternativa en la reducción de la vibriosis en camarones debido a su poder de sus propiedades antimicrobianas como el timol (79%), carvacrol (5%), siendo efectiva contra las bacterias Grampositivas y Gramnegativas (Maksimov, 2017).

De igual modo, el tomillo (*Thymus vulgaris*) se comprobó que su efecto antibacteriano contra agentes como: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Quynh, 2019).

### 1.5.6.2. Orégano (*Plectranthus amboinicus*)

### 1.5.6.3. Propiedades de *Plectranthus amboinicus*

La planta oreganón es utilizada en la medicina para tratar o prevenir de enfermedades por sus propiedades como monoterpenos, carvacol y timol, donde estos compuestos son bactericidas contra los diferentes tipos de bacterias patógenas. Aguirre (2019) nos indica que el aceite esencial tiene una acción en la capa externa de la membrana celular bacteriana donde actúa sobre los fosfolípidos, causando modificaciones en la composición de los ácidos grasos. Según estudios es muy eficaz contra las bacterias Gram- positivas *S. epidermidis* y *Staphylococcus aureus* también contra las bacterias Gram- negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Silva et al., 2023).

*Plectranthus amboinicus*, esta planta medicinal tiene presencia de alrededor de 76 compuestos volátiles y de 30 no volátiles este le atribuye propiedades farmacológicas como acciones antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas, cicatrizantes, antioxidantes, antiepilépticas y larvicidas. Estudios realizados han demostrado que esta planta ha sido beneficiosa contra enfermedades cutáneas, cardiovasculares, digestivas, urinarias y orales en seres humanos. (Swamy et al., 2017).

#### Tabla 1:

#### *Taxonomía del Oreganón*

TAXONOMIA	
<b>Dominio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Pantae
<b>Filo</b>	Espermatofita
<b>Subfilo</b>	Angiospermas
<b>Clase</b>	Dicotiledóneas
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Género</b>	<i>Plectranthus</i>
<b>Especie</b>	<i>Plectranthus amboinicus</i>

**Nota:** Fuente: (Gundu, 2020)

#### **1.5.6.4. Composición química de *Plectranthus amboinicus***

En la composición química de la planta *Plectranthus amboinicus*, se han detectado un total de 43 compuestos, donde predominaron los monoterpenos oxigenados 52,5%, seguido de los hidrocarburos monoterpenicos 26,5%, los hidrocarburos sesquiterpénicos 16,4% y los sesquiterpenos oxigenados 3,7%. En el caso de los monoterpenos oxigenados el principal compuesto es el carvacol 50%, de los hidrocarburos monoterpenicos, el principal compuesto es el el  $\gamma$ -terpineno 13,1% y del hidrocarburo sesquiterpenico el principal compuesto  $\beta$ -cariofileno 11,3% (Hsu, 2019).

#### **1.5.6.5. Antecedentes de uso en medicina tradicional**

El oregánón es una planta estudiada por sus propiedades, antimicrobiana y antioxidante, en estudios previos también se determinó propiedades antitumoral, digestiva, tónica y antiséptica. En la medicina popular, el té de orégano se ha empleado como un apoyo en el alivio de la tos. En la antigüedad los griegos la utilizaban como un antiséptico, para curar el estómago y enfermedades respiratorias (Gómez *et al.*, 2018).

También hay estudios sobre el uso del orégano se ha comprobado que tiene propiedades digestivas, donde se ha empleado para tratar dolores como cólicos, espasmos en el abdomen, dolores de cabeza, también se ha empleado en tratamientos en la piel, trastornos del sistema respiratorio e infecciones virales entre otros (González, 2019).

#### **1.5.6.6. Otros usos del *Plectranthus amboinicus***

Se lo utiliza como uso medicinal y aditivo alimentario, las hojas se consumen como verdura, en cosméticos, aromatizantes, repelente de insectos, plantas ornamentales, etc. En países como Brasil se lo cultiva para el sector agrícola y en lo medicinal para tratamiento de úlceras, quemaduras, cataplasma y el jugo de las hojas para alergias cutáneas (Datiles, 2020).

#### **1.5.7. Interacción entre el Extracto de Orégano y Vibrios**

Según estudios sobre el efecto del extracto del oregánón en organismos acuáticos principalmente en los camarones mediante un ensayo in vivo para evaluar la actividad la citotoxicidad, fagocítica, actividad fenoloxidasa y el anión superóxido en los hemocitos del *L.vannamei*. Se determinó que su uso potencia la respuesta inmune en los camarones, mejora crecimiento y también aumenta la resistencia ante el *V. alginolyticus* (Huang *et al.*, 2022).

En los peces como la tilapia se ha utilizado el aceite esencial de oreganón como suplemento en las dietas alimenticias; se demostró que algunos géneros de bacterias fueron afectados debido a la relación de carvacol y timol, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Klebsiella*, por lo tanto, se determinó que puede ser una alternativa al uso de antibiótico en el cultivo de la especie mencionada. (Sorrosa, 2018).

En otro estudio realizado se demostró la interacción del extracto de la hoja del oreganón con una dieta balanceada y una concentración de 25, 50 y 100% en el camarón *L. vannamei* con vibriosis donde se logró inhibir el desarrollo de las cepas de *Vibrio spp*, incluido las que son resistentes a los antibióticos. La concentración de mayor efecto fue la del 100%, donde según un estudio de (Morales *et al.*, 2016). ensayando con infusiones de hojas de oreganón dieron como resultado halos con un diámetro 9.2 y 18.8 mm, que son similares a los encontrados en otra investigación ( $8.4 \pm 2.6$  mm a  $14.0 \pm 3.2$  mm) (Aguirre *et al.*, 2021).

Según Domínguez *et al.* (2019) la dosis de 1.0 µg/ml de extracto de oreganón afectó significativamente la carga de bacterias reduciendo la virulencia de los vibrios patógenos, una supervivencia respectivamente favorable y no mostraron toxicidad en las larvas de *L. vannamei*.

Otros estudios demostraron que concentraciones de extracto de oreganón inferiores a  $5,0 \mu\text{gmL}^{-1}$  no afectan a los hemocitos en comparación a las concentración de  $10,0 \mu\text{gmL}^{-1}$ , también comprobaron que se tendrá una mayor vulnerabilidad en los primeros estadios de la etapa larvaria, por ejemplo en zoea se utilizarán dosis de  $0,25 - 1 \mu\text{gmL}^{-1}$  para no afectar la supervivencia de las larvas, en mysis tuvo un efecto negativo con la dosificación de  $5,0 - 10,0 \mu\text{gmL}^{-1}$ , mientras que en Pl,s afectaron en la dosificación  $10,0 \mu\text{gmL}^{-1}$  (Reyes *et al.*, 2021)

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación del experimento

El experimento se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Técnica de Machala. Está 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 1:

*Ubicación de Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA)*



Nota: Fuente: (Google maps, 2024)

### 2.2. Materiales y Equipos

#### 2.2.1. Insumos

- Balanceado comercial
- Agar TCBS
- Agar MH
- Agua destilada
- Agua de piscina camaronera a 18 mg/L
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Solución salina
- Alcohol industrial
- Pegante acuícola

#### 2.2.2. Materiales biológicos

- Oreganón (*Plectranthus amboinicus*)
- Camarón (*Litopeneus vannamei*)
- *Vibrios spp.*

### **2.2.3. Equipos**

- Microscopio
- Cocineta
- Incubadora
- Cabina de flujo laminar
- Auto clave
- Balanza
- Aireadores
- Medidor de pH
- Kit de amonio

### **2.2.4. Materiales**

- Caja Petri
- Tubo de ensayo
- Micropipetas (100 y 1000  $\mu$ l)
- Puntas para micropipetas
- Vasos de precipitación
- Mechero de alcohol
- Pinzas
- Tijeras
- Azas de Dygraski
- Tubos Eppendorf
- Gavetas
- Marcador permanente
- Piedras difusoras
- Mangueras de oxígeno
- Fundas plásticas negras
- Mandil
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos
- Discos
- Mortero
- Espátula



- Papel Aluminio
- Varilla de vidrio
- Pipeta de 10 ml

## **2.3. Metodología**

### **2.3.1. Obtención de los extractos**

Para la obtención del extracto se trabajó en un ambiente aséptico. Se ocupó la hoja y tallo del oreganón, con la ayuda de un mortero se logró tener el extracto del oreganón en fresco. Se realizó una prueba de oxidación del extracto durante 8 días, en cual se verificó que no hubo variación en el pH evaluado diariamente, lo cual no se utilizó ningún aditivo para conservar el producto.

### **2.3.2. Tratamiento *in vitro***

Para realizar la prueba de antibiograma, se preparó el medio de cultivo agar Mueller-Hinton el cual fue preparado con las indicaciones establecidas por el producto, Posterior, se utilizó un hisopo se tomó una muestra de cepa de *Vibrio spp.* y se sembró en una placa mediante el método de estriado. Cada placa se la dividió en 4 partes, y en cada una se colocó un disco absorbente. Con una micropipeta, se añadió 80  $\mu$ L del extracto de oreganón de cada tratamiento **A** (Hoja), **B** (Tallo), **C** (Hoja + Tallo). Se realizó la prueba de sensibilidad y, tras pasar 24 horas, se observó el diámetro del halo de inhibición de cada extracto para determinar el efecto antagónico.

### **2.3.3. Obtención de los animales**

La obtención de las muestras de camarón fue recolectada en una camaronera ubicada en la parroquia Barbones, cantón El Guabo, provincia El Oro. Se recolectaron 100 camarones de la piscina y se trasladaron a Facultad de Agronomía de la UTMACH. Los camarones utilizados para el experimento fueron 45 organismos, con un peso promedio de 3 a 4 gramos, asegurando que no mostraran síntomas de ninguna enfermedad. Los camarones no se medicaron antes de trasladarlos a la piscina de engorde.

El agua utilizada se recogió de la misma piscina de donde se obtuvieron los camarones, con un volumen de 300 litros y salinidad de 18 mg/L. El agua necesaria para los siguientes días del experimento la proporcionó la misma camaronera, donde se almacenó en un tanque de 1000 litros con aireación.

#### 2.3.4. Aclimatación de los camarones

En las unidades experimentales se aclimataron los camarones por 3 días, donde se repartieron 5 organismos en cada gaveta y con aireación. Los parámetros evaluados en el mesocosmos fue pH ( $6.28\pm 0.08$ ), temperatura ( $26.5\pm 0.5$  °C) y amonio ( $0.010\pm 0.004$ ).

#### 2.3.5. Preparación del alimento con las dosis establecidas

Para el alimento se utilizó balanceado comercial en donde fue mezclado con el extracto del oreganón el cual tiene como principio activo el carvacol, se utilizó dos dosis: **T1** (0.25%) y **T2** (0.50%) y fueron adheridas al balanceado con la ayuda de un pegante. Las dosis aplicadas se representan en la siguiente tabla.

**Tabla 2:**

*Tratamiento con la respectiva dosis*

Tratamientos	Dosis de oreganón (%)
<b>TC</b>	0
<b>T1</b>	0.25
<b>T2</b>	0.50

#### 2.3.6. Ensayo in vivo

En la prueba se utilizó el extracto que mostro un halo de inhibición más significativo en la prueba de antibiograma, el cual fue el **tratamiento C** (tallo y hoja de oreganón).

Para las unidades experimentales (UE) se utilizaron 9 recipientes plásticos con una capacidad de 40 L donde solo se llenó hasta los 30L de agua con una salinidad de 18mg/L. Se colocó 5 camarones juveniles de 3g (biomasa 15g) por cada UE. Para el mantenimiento del agua, se realizó sifoneo y un recambio del 30% del volumen de agua cada 3 días y se controló parámetros como pH de ( $6.28\pm 0.08$ ), temperatura ( $26.5\pm 27$  °C) y amonio ( $0.010\pm 0.004$ ).

Se trabajó con 2 tratamientos y el control con 3 réplicas cada tratamiento: **T0**: Solo se suministró alimento balanceado; **T1**: Alimento balanceado con el 0,25% de extracto de oreganón + pegante; **T2**: Alimento balanceado con el 0,50% de extracto de oreganón + pegante. Se utilizó 1mL por cada 100g de alimento balanceado del pegante, se alimentó con el 4% de su biomasa que fueron distribuidas en dos dosis en el día (08H00 y 15H00). Se utilizó un total de 54g de alimento por tratamiento durante los 10.

Después de 10 días, se llevó a cabo un análisis microbiológico para cada tratamiento siguiendo el método de Garza et al. (2021). Se realizó un pool con la hepatopáncreas de los camarones (1 g) para realizar diluciones seriadas por triplicado utilizando 100 µL en agar TCBS obteniendo resultados después de 24-48 horas.

### 2.3.7. Diseño experimental

Para el desarrollo del experimento se realizó un diseño completamente al azar (DCA), donde se manipuló un factor de estudio que fue el extracto de oreganón y estará segmentado en tres tratamientos con sus respectivas réplicas.

**Tabla 3:**

*Replica de los tratamientos*

<b>TRATAMIENTOS</b>		
<b>TC</b>	T1	T2
<b>T2</b>	TC	T1
<b>TC</b>	T1	T2

**TC:** Alimento Balanceado

**T1:** Extracto de hoja y tallo al 0.25%

**T2:** Extracto de hoja y tallo al 0,50%

### 2.3.8. Análisis estadísticos

Al terminar el experimento los datos recolectados fueron analizados estadísticamente con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad para definir qué tipo de prueba se debe utilizar para la comparación de los tratamientos. Debido que los datos de Vibrios, no cumplieron los supuestos mencionados, se procedió a realizar el análisis de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes. En cambio, los datos de bacterias heterótrofas si cumplieron los supuestos de homogeneidad y normalidad, por lo tanto, se lo analizó a través de la prueba paramétrica de ANOVA de un factor Inter-grupos. Los datos se

analizaron en el programa estadístico SPSS Statistics versión 25 para Windows, con un nivel de confiabilidad del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los Fitobióticos son derivados de plantas naturales Ordoñez (2021) indica que estos contienen compuestos activos que tienen un efecto positivo en la salud como el crecimiento de los animales, su uso se lo realiza por medio de aceites esenciales, extractos de plantas y en polvo. Tiene un efecto inmunomodulador, en la salud intestinal, en la actividad antimicrobiana y estimulación de secreciones endógenas. Se han utilizado plantas como las siguientes: Orégano, Noni, Guanábana, Guayaba y otras.

#### 3.1. Efecto inhibitorio frente a Vibrios

Entre los tratamientos evaluados, se pudo observar que el tratamiento C (hoja y tallo) presentó un mejor halo de inhibición 9mm, por lo tanto, fue el tratamiento utilizado para evaluarlo en el tratamiento *in vivo* y comprobar su efectividad en *L. vannamei*. (Tabla 4)

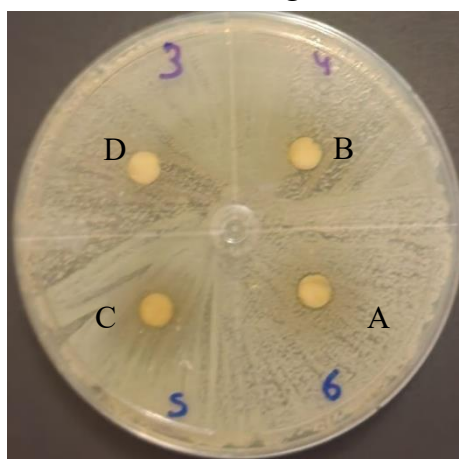
**Tabla 4:**

*Diámetro de los halos de inhibición evaluados durante 48 horas*

Tratamientos	Halo de inhibición
A Hoja	7 mm
B Tallo	6 mm
C Hoja y Tallo	9 mm
D Hoja y tallo esterilizado	-

**Figura 2**

*Resultado de los tratamientos en el antibiograma*



**Nota:** En la placa se pueden observar los siguientes halos de inhibición de los tratamientos A, B, C, D.

Es trascendental realizar la prueba de antibiograma debido que permite observar la efectividad del productor natural que se va a aplicar sobre la bacteria que se quiere controlar, mediante la medición del diámetro de halo de inhibición se puede ver su efecto. (Fig. 2)

Los datos obtenidos del tratamiento C coinciden con Aguirre (2019) quien en su investigación demostró el efecto inhibitorio frente a 4 cepas de *Vibrios spp.* (Im-Tum, HP2-V, HP4-V1, Im-Alg) donde obtuvo halos de inhibición con diámetros de  $8,4 \pm 2,6$  mm y  $14,0 \pm 3,2$  mm, con el tratamiento de 100% de extracto de oreganón sin ninguna dilución.

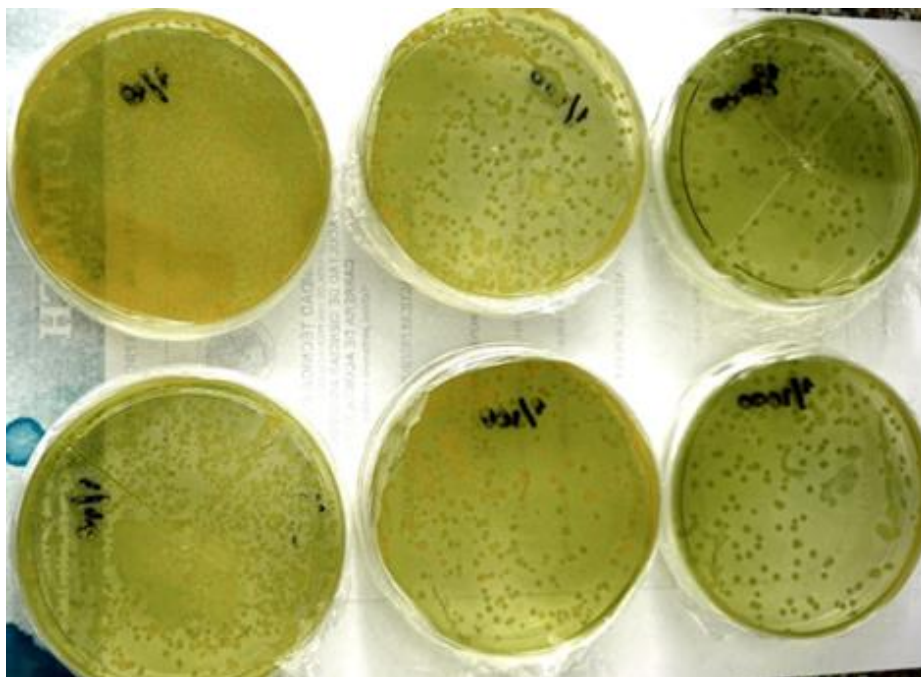
En otro estudio de Morales et al. (2016) encontró efecto inhibitorio en las hojas de oreganón frente al *Vibrio spp* dieron como resultado halos con diámetros entre 9.2 y 18.8 mm

### 3.2. Evaluación *in vivo* de el extracto de oreganón en la disminución de vibrios

Para abordar con el experimento *in vivo* se efectuó un análisis bacteriológico a los camarones, donde se obtuvo una carga total inicial de *Vibrios* de  $1.5 \times 10^6$  UFC/gr hepatopáncreas (Fig. 3) Con los resultados obtenidos, se puede decir que los organismos tenían un alto porcentaje de bacterias, y por ende se considera que podrían enfermar en un corto plazo.

#### Figura 3

*Bacteriología inicial: Conteo inicial de Unidad formadora de colonias*



En figura 3 se observa la bacteriología inicial realizada mediante diluciones seriadas por triplicado provenientes de la hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei* utilizados antes de aplicar los tratamientos a evaluar.

**Figura 4**

*Bacteriología final: de Unidad formadora de colonias*



En figura 4 se observa la bacteriología final realizada mediante diluciones seriadas por triplicado provenientes de la hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei* aplicada para el tratamiento **T0** (tratamiento control), **T1** (Extracto de hoja y tallo al 0.25%) y **T2** (Extracto de hoja y tallo al 0,50%).

**Tabla 5:**

*Número total de bacterias*

<b>BACTERIAS</b>				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
Subconjunto para alfa = 0.05				
TRATAMIENT_	N	1	2	3
T2 0,50	3	1200.00		
T1 0,25	3		16666.67	
CONTROL	3			100000.00
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

En la prueba estadística post hoc se determinaron las diferencias estadísticas donde en la siguiente tabla se puede observar el conteo total de bacterias, comparando el control con los

dos tratamientos donde: El T1: dio un total de 16666,67 y el T2: 1,200 este siendo el mejor con una reducción total de un 98.8%.

**Figura 5:**

*Prueba de hipótesis Kruskal-Wallis*

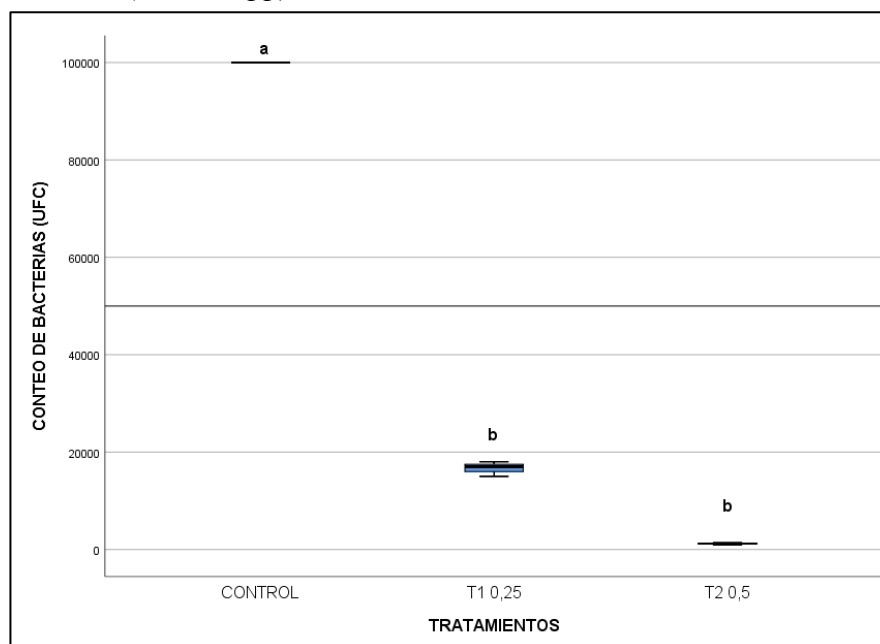
Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de BACTERIAS es la misma entre las categorías de TRATAMIENT_.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.024	Rechazar la hipótesis nula.

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

Para evaluar la disminución de las bacterias se llevó a cabo por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se demuestra que existió diferencia significativa por p-valor <0,05 (0,024) entre los tratamientos con respecto a las concentraciones de carga bacteriana 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 las cargas bacterianas con respecto a las dosis del extracto de oregán es diferente.

**Gráfico 1**

*Carga bacteriana (Vibrios spp) obtenidas en el análisis*



*Nota:* Las letras minúsculas indican diferencia estadística entre tratamientos



Los resultados del experimento se pueden apreciar en el gráfico 1 donde existe una reducción del 98.8% y 83,33% en la carga bacteriana de *Vibrio* en los tratamientos 1 y 2 respectivamente con respecto control, comparando con la carga inicial de vibriosis de  $(1.5 \times 10^6 \text{ UFC/gr Hp})$  con el control T0 ( $1 \times 10^4 \text{ UFC/gr Hp}$ ) y al pasar los 10 días, se mostró que los recambios de agua también influyen en la proliferación de las bacterias. Esta efectividad se puede corroborar con Mendoza et al. (2023) quién hace mención que el oregano presenta en abundancia los compuestos activos como el timol y el carvacrol, quienes demuestran un efecto antimicrobiano para evitar la patogenicidad y disminución de bacterias presente en la hepatopáncreas.

De manera similar, Sotomayor et al. (2019) corrobora que el aceite esencial de oregano probado en camarones tiene eficacia en la inhibición de bacterias Gram negativas. Además, Armijos et al. (2022) añade que el uso del aceite esencial de orégano tiene mayor efectividad, ya que se logra disminuir la carga bacteriana en la hepatopáncreas en los juveniles de *L. vannamei*. De acuerdo con los resultados evaluados de los diferentes autores se hace énfasis que el uso de este Fitobióticos tiene gran eficiencia ante la disminución de la carga bacteriana.

### 3.3. Comparación del crecimiento del camarón

#### Gráfico 2:

*Crecimiento entre los tratamientos*



En este ensayo se puede observar en la (Graf.2) el crecimiento con la utilización del extracto de oreganón donde el tratamiento control mostró un crecimiento promedio 3.07g, el T1 del 3.12g y el T2 de un 3.23g durante el trabajo de investigación donde se pueden observar diferencias significativas entre los 3 tratamientos siendo el T2 el más efectivo y con mayor crecimiento (0,5  $\mu$ L/mL). La implementación del oreganón en las dietas alimenticias del camarón blanco nos da un resultado positivo como su efecto antibacteriano como su alta sobrevivencia y su optimo crecimiento, concordando con Huang *et al.* (2022) nos dice que utilizando 20 g de *P. amboinicus* (PA) por kg de alimento mejor la inmunidad y ayuda a tener un mejor crecimiento de los organismos.

#### IV. CONCLUSIONES

- Se logró extraer a partir de las hoja y tallo fue de manera asequible y eficiente una solución que permite reducir la carga bacteriana de vibrios.
- Luego del análisis de la obtención de los extractos se demostró que la unión de los dos (hoja y el tallo), tiene un efecto inhibitorio, y fue el que mostró un mejor resultado.
- Para obtener el extracto se colocó una cantidad igual tanto en la hoja y el tallo para tener la mezcla de los dos, donde la concentración es de 0.5 la cual mostro mejor resultado en la inhibición de bacterias y mejora el crecimiento de los animales.

Finalmente se comprobó que el extracto de orégano en fresco (tallos y hojas) podría ser una buena alternativa para combatir la vibriosis en el cultivo de camarón, demostrando una opción eficaz y sostenible para evitar la proliferación de bacterias. Este método natural también nos ayuda a reducir el impacto ambiental por el uso de antibióticos, y así mismo ayudando a la sostenibilidad en la acuicultura.

## **V. RECOMENDACIONES**

- Probar el extracto del oregán cuando los camarones estén en su etapa adulta.
- Seguir evaluando dosis distintas en los tratamientos establecidos para ver si se logra tener un mejor efecto positivo en el animal.
- Efectuar estudios cumpliendo la hidroestabilidad del pellet por la aplicación del extracto del oregán y el pegante como parte de la formulación del alimento balanceado.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirre Chanta, L. E. (2019). *Efecto del neem (Azadirachta indica) y orégano (Origanum vulgare) en el crecimiento de Vibrio spp. resistentes a antibióticos, aislados de Litopenaeus vannamei*. Obtenido de <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/487>
- Aguirre Chanta, L. E.-S.-Z. (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 del Perú*, 32(4). Obtenido de <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Albalat, A., Zacarias, S., Coates, C. J., Neil, D. M., & Planellas, S. R. (2022). Welfare in farmed decapod crustaceans, with reference to *Penaeus vannamei*. *Front. Mar. Sci*, 9, 886024. Obtenid de <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.886024>
- Amelia, F. Y. (2021). Review of shrimp (*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)) farming in Indonesia: Management operating and development. *World Scientific News*, 158, 145-158.
- Armijos Flores, C. A., & Vacacela Cajamarca, L. D. (2022). Efecto del aceite esencial de orégano (*origanum vulgare*) sobre la disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón *Penaeus Vannamei* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Ashaari, N. S. (2020). Functional characterization of a new terpene synthase from *Plectranthus amboinicus*. *PLoS One*, 15(7). Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235416>
- Berger, C. (2020). La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*, 1(1), e003-e003. Obtenido de <https://doi.org/10.21142/SS-0101-2020-003>
- Bustamante, J. A. (2018). *USO DE FÁRMACOS UTILIZADOS PARA TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO DE LA VIBRIOSIS EN EL CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO LITOPENAEUS VANNAMEI*. UTMACH. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/13765>
- Correa Renata, C. L. (2018). BENEFICIOS DE LA APLICACIÓN DE PROBIÓTICOS DURANTE EL CULTIVO DE ENGORDE DEL CAMARÓN BLANCO (<I>LITOPENAEUS VANNAMEI</I>) EN ECUADOR. *UTMACH*, 11. Obtenido de [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12908/1/DE00007\\_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12908/1/DE00007_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf)
- Datiles, M. J. (2020). *Plectranthus amboinicus* (Indian borage). *CABI Compendium*. doi: <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.119834>
- Domínguez Borbor, Cristóbal & Rodríguez, Jenny & Sonnenholzner, Stanislaus & Sanchez-Rodriguez, Aminael. (2019). Estrategia Anti-virulencia en Acuicultura: El aceite esencial de orégano Inhibe el quorum sensing de *Vibrio* spp. patógenos de camarón. 10.13140/RG.2.2.14909.08168.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma: SUSTAINABILITY. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

- FAO. (2022). *FAO Fisheries and Aquaculture Division*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb8609en>
- Garza, Z. J. M., Jaramillo, G. E. C., Gámez, J. C. I., & Galavíz-Silva, L. (2021). Actividad antagonica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a vibrio parahaemolyticus AHPND como patógeno de camarón en cultivos. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 3(2), 78-90.
- Gómez, D. G. (2018). Manual Del Buen Uso De Plantas Medicinales. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/329246472\\_MANUAL\\_DEL\\_BUEN\\_USO\\_DE\\_PLANTAS\\_MEDICINALES](https://www.researchgate.net/publication/329246472_MANUAL_DEL_BUEN_USO_DE_PLANTAS_MEDICINALES)
- González López, G. &. (2019). Evaluación de diferentes dosis y frecuencias de aplicación de compost para la producción de romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*) bajo invernadero. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10654/10177>
- Gundu, S. A Brief (2020). Review of Recent Nanotechnological and Pharmacological Potentials with Special Reference to *Plectranthus amboinicus*. Obtenido de DOI: 10.21275/SR201204002844
- Hsu, K. P. (2019). Antimildew effects of *Plectranthus amboinicus* leaf essential oil on paper. *Natural Product Communications*, 14(7). Obtenido de <https://doi.org/10.1177/1934578X19862903>
- Huang, H. T. (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*). *Acuicultura*, 546. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737306>
- Ishaque Nabila, M. &. (2018). Actividad antagonista de *Streptomyces* spp. VITNK9 contra patógenos bacterianos Gram negativos que afectan a los peces y mariscos en la acuicultura. *Revista de biología marina y oceanografía*, 53(2), 171-183. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.22370/rbmo.2018.53.2.1291>
- Kumar, V., Baruah, K., Nguyen, D. V., Smagghe, G., Vossen, E., & Bossier, P. (2018). Producción de Hsp70 mediada por floroglucinol en crustáceos: protección contra *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia franciscana* y *Macrobrachium rosenbergii*. *Immunol*, 9. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01091>
- Liu, H., Wang, Y., Cao, J., & al., e. (2020). Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848619321489>.
- Lu, T. H. (2021). A risk-based approach for managing aquaculture used oxytetracycline-induced TetR in surface water across Taiwan regions. *Frontiers in Pharmacology*, 12. Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.803499>

- Maksimov, O. (2017). Thyme *Thymus vulgaris* L. Thymol CT Essential Oil as Natural Preservative. ~ 19 ~ American Journal of Essential Oils and Natural Products, 5(2), 19-22. Recuperado de <http://www.essencejournal.com/pdf/2017/vol5issue2/PartA/5-1-23-185.pdf>
- Mendoza Sellan, D. A., & Cordova Buri, M. I. (2023). Aplicación del oregano (plectranthus amboinicus) pulverizado en el balanceado para la prevención de vibrios spp. En el cultivo de camarón blanco (*litopenaeus vannamei*).
- 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. *Dis Aquat Org* 1:57–65. doi:10.3354/dao03060
- Oddsson, G. V. (2020). A definition of aquaculture intensity based on production functions—The aquaculture production intensity scale. (*APIS*). *Water*, 12(3), 765. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/w12030765>
- Orrala Sandoval, G. L. (2021). *Comparación de producción larvaria de distintas maduraciones en el laboratorio Incamar-alfamarina*. San Pablo-provincia de Santa Elena (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2021.).
- Parajales, J., Peña, N., Solórzano, A., Castro, R., Donald, & Dolz, G. (2018). Presencia de agentes infecciosos (AHPND, IHHNV, WSSV, EHP) en sistemas de producción de camarones de cultivo en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), 49. Obtenido de <https://doi.org/10.15359/rcv.36-3.36>
- Parmar, P. Y. (2018). Therapeutic potentiality of florfenicol against vibriosis in *Litopenaeus vannamei*. *J. Entomol. Zool. Stud*, 6(5), 463-467. Obtenido de <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue5/PartH/6-5-12-915.pdf>
- Quynh, C. T. T., & Trang, V. T. (2019). Volatile composition, antioxidant property and antimicrobial activities against food-borne bacteria of vietnamese thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(3B), 127–136. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/57/3b/14494>
- Redrován, K. (2017). Medidas terapéuticas para el control de Vibriosis en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Trabajo de Titulación para optar el grado de Ingeniero Acuicultor., 1-27. Retrieved from Obtenido de [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11355/1/DE00017\\_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11355/1/DE00017_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf)
- Reyes Campoverde, R. N., Valle Cedeño, C. E., & Márquez, A. (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*) (Doctoral dissertation, ESPOL. FIMCM).

- Rojas, A. A. (2018). *Comparación financiera del cultivo de camarón entre el sistema semi intensivo y el híper intensivo en la finca Videmar ubicada en Jama, Manabí, Ecuador*. (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2018.).
- Santos, J. R. (2019). *Evaluación del efecto en la supervivencia y respuesta inmune del producto*. UNIDAD ACADÉMICA NAVOJOA.
- Sawant, S., Baldwin, T. C., Metryka, O., & Rahman, A. (2023). Evaluation of the Effect of *Plectranthus amboinicus* L. Leaf Extracts on the Bacterial Antioxidant System and Cell Membrane Integrity of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Pathogens*, 12(6), 853. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/6/853>
- Shakweer, M. S. (2023). Comparison of Immune Response of *Litopenaeus vannamei* Shrimp Naturally Infected with *Vibrio* Species, and after Being Fed with Florfenicol. *Fishes*, 8(3), 148. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/fishes8030148>
- Silva, J. M. (2023). *Plectranthus amboinicus* Essential Oil Incorporated into Fish Feed Shows Strong Antimicrobial Activity against *Aeromonas hydrophila*, an Opportunistic Bacterium of Aquaculture. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230087>
- Sorroza, L. S. (2018). Estudio preliminar de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *Revista AquaTIC*, (49), 1-7.
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478> PLoS ONE, 14(1).
- Suarez Ordoñez, J. A. (2021). Harina de hojas de plantas medicinales como aditivo fitobiótico en dietas para codorniz de engorde.
- Swamy, M. K. (2017). GC-MS based metabolite profiling, antioxidant and antimicrobial properties of different solvent extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Obtenido de <https://doi.org/10.1155/2017/1517683>
- Varela Mejías, A. &.-M. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1-14. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Vikash, K., Suvra, R., Bijay, K., Peter, B., & Basanta, K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins*, 13(8), 524. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Villarreal García, A. V. (2022). *EFFECTO DE LA AIREACIÓN EN EL CULTIVO HÍPER-INTENSIVO FOTO-HETEROTRÓFICO DEL CAMARÓN BLANCO Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) EN UN SISTEMA SIN RECAMBIO DE AGUA*. (Master's thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC). <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3139>



Weitzman, J. (2019). *Applying the ecosystem services concept to aquaculture: A review of approaches, definitions, and uses.* Ecosystem Services. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212041618303243>

## ANEXOS



*Anexo 1: Recolección de los animales*



*Anexo 2: Diseño de la unidad experimental*



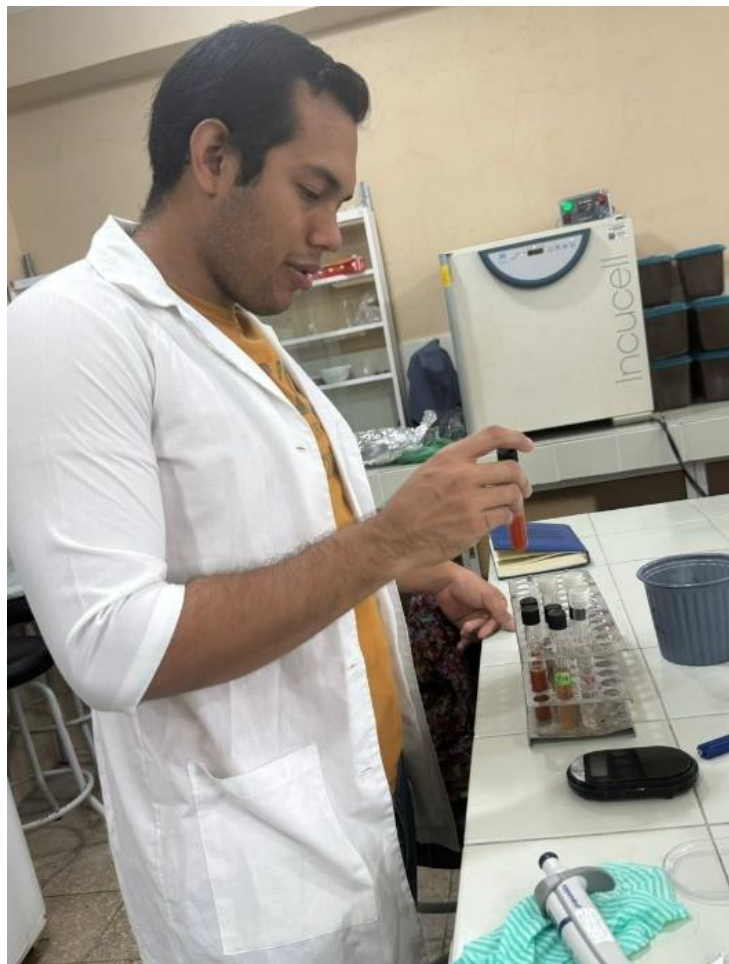
*Anexo 3: Dosis del extracto para la mezcla en el alimento*



*Anexo 4: Recambio de agua*



*Anexo 5: Diluciones seriadas por triplicado de la hepatopáncreas*



*Anexo 6: Preparación de diluciones seriadas del HP por triplicado.*