



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**EFFECTO DE LA SINERGIA ENTRE ÁCIDO FÓRMICO, FORMIATO DE
POTASIO CON EXTRACTO DE ORÉGANO EN LA DISMINUCIÓN DE
LA VIBRIOSIS**

**CRIOLLO NIVICELA SARA ANAHÍ
INGENIERA ACUICOLA**

**PEÑA MARQUEZ MARIA JOSE
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**EFEECTO DE LA SINERGIA ENTRE ÁCIDO FÓRMICO,
FORMIATO DE POTASIO CON EXTRACTO DE ORÉGANO EN
LA DISMINUCIÓN DE LA VIBRIOSIS**

**CRIOLLO NIVICELA SARA ANAHÍ
INGENIERA ACUICOLA**

**PEÑA MARQUEZ MARIA JOSE
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**EFFECTO DE LA SINERGIA ENTRE ÁCIDO FÓRMICO,
FORMIATO DE POTASIO CON EXTRACTO DE ORÉGANO EN
LA DISMINUCIÓN DE LA VIBRIOSIS**

**CRIOLLO NIVICELA SARA ANAHÍ
INGENIERA ACUICOLA**

**PEÑA MARQUEZ MARIA JOSE
INGENIERA ACUICOLA**

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

**MACHALA
2024**

Trabajo de titulación

Criollo_Peña

por Sara Criollo

Fecha de entrega: 01-ago-2024 11:07p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2426072754

Nombre del archivo: Turnitin_Oseanah.docx (1.35M)

Total de palabras: 7595

Total de caracteres: 40926

Trabajo de titulación Criollo_Peña

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	ri.ues.edu.sv Fuente de Internet	1%
2	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
3	"Estimaciones de contenidos de carbono y diversidad funcional en viñas bajo manejo orgánico de Chile Central", Pontificia Universidad Católica de Chile, 2026 Publicación	<1%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
5	ciencia.lasalle.edu.co Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.iberopuebla.mx Fuente de Internet	<1%
7	arxiv.org Fuente de Internet	<1%
8	patents.google.com Fuente de Internet	<1%

9	www.adiveter.com Fuente de Internet	<1 %
10	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
11	Brenner. ""Vibrionales"", Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, 2005 Publicación	<1 %
12	moam.info Fuente de Internet	<1 %
13	pdfs.semanticscholar.org Fuente de Internet	<1 %
14	www.congreso.mesoamericano.unach.mx Fuente de Internet	<1 %
15	www.uccuyo.edu.ar Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias Apagado

Excluir bibliografía

Activo

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

Las que suscriben, CRIOLLO NIVICELA SARA ANAHÍ y PEÑA MARQUEZ MARIA JOSE, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado EFECTO DE LA SINERGIA ENTRE ÁCIDO FÓRMICO, FORMIATO DE POTASIO CON EXTRACTO DE ORÉGANO EN LA DISMINUCIÓN DE LA VIBRIOSIS, 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.

Las autoras 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.

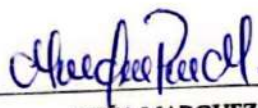
Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

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.



CRIOLLO NIVICELA SARA ANAHÍ

0707289666



PEÑA MARQUEZ MARIA JOSE

0706060811

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre, Pilar Nivicela, quién es mi fuente de inspiración para alcanzar la cima. A su esposo, Luis Medina, por su apoyo incondicional a lo largo de esta trayectoria. A mis abuelos, Mariana Sacaquirín y José Nivicela (+), quienes me cubrieron con su amor y me alentaron a ser mejor. A mi tío Patricio Nivicela quién me ha brindado su apoyo inquebrantable. A mis hermanos, Sebastián, Charlotte, Jannina y mi papá, Carlos Criollo por creer en mí y brindarme su amor y genuina compañía.

Mi familia es mi fuente de inspiración y sabiduría; sin ustedes jamás lo habría logrado. Gracias por creer en mi desde el principio; todos mis triunfos siempre serán por y para ustedes. Los amo eternamente.

Sara Anahi Criollo Nivicela

En primer lugar, agradezco a Dios por darme la fortaleza de no rendirme, a mi mamá Susana Márquez por su comprensión y fe en mí, además de realizar una serie de sacrificios para que pudiera alcanzar este éxito. A mis abuelos, Glovis Márquez y Mercedes Sagal, por ser mi fuente de motivación y ese empuje que necesitaba en momentos difíciles; a mis tías Marcia Márquez y Andrea Márquez por otorgarme su constante apoyo, siendo un pilar fundamental en mi desarrollo académico; y a mi amada hermanita María Cecilia por ser mi fuente de inspiración y amor para alcanzar mis metas.

Por último, pero no menos importante, a mi pareja Jeff Arévalo, por el apoyo, amor y comprensión que me ha brindado en los momentos más difíciles, ayudándome a finalizar este largo camino.

María José Peña Márquez

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra noble institución Universidad Técnica de Machala por permitirnos formarnos como estudiantes y brindarnos docentes capacitados que han sido nuestra guía durante todos estos años.

Desde el inicio hasta el final de nuestra investigación, expresamos nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. Lita Sorroza, quién nos brindó su total confianza para llevar a cabo nuestro trabajo investigativo. Gracias por confiar en nuestras capacidades y alentarnos a intentarlo una vez más. Su paciencia, apoyo constante y entusiasmo nos motivaron a superarnos cada día, lo que nos permitió obtener resultados gratificantes.

Agradecemos profundamente al Ing. Brian Mocha, quién forma parte fundamental en el desarrollo de nuestra tesis. Su experiencia, conocimientos y valiosos aportes han enriquecido enormemente nuestra investigación.

Al Dr. Roberto Santacruz, la Dra. Leonor Rivera, el Dr. Patricio Rentería y al Econ. Javier Garzón por su orientación y disposición para discutir nuestras inquietudes.

Agradecemos a la Ing. Ivanna Tuz, Blga. Mirka Quezada e Ing. Lenín Chiquisala, quienes siempre estuvieron dispuestos a orientarnos y brindarnos un espacio en los diferentes laboratorios en dónde pudimos plasmar nuestras ideas y hacerlas realidad.

Y de manera especial, agradecemos al Ing. Erick Granda, Ing. José Sarango y a la camaronera “San Alfonso” por su invaluable colaboración y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

Sara Anahi Criollo Nivicela y María José Peña Márquez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a todas las personas que han estado presentes a lo largo de mi trayectoria, apoyándome y alentándome para culminar este trabajo investigativo. Quiero expresar mi gratitud, especialmente a mi madre, Pilar Nivicela. Gracias por tus sacrificios, por anteponer mis necesidades a las tuyas y por trabajar incansablemente para brindarme lo mejor, junto a tu esposo, Luis Medina.

A mi abuelita, Mariana Sacaquirín, y a Jannina Nivicela, por incluirme en sus oraciones cada noche y velar por mi bienestar. También agradezco a mi tío, Patricio Nivicela, por apoyarme y por sentir orgullo de mis logros como si fueran propios.

A mis hermanos, Charlotte y Sebastián Medina, porque sin ustedes nunca lo hubiera logrado. Hubo días en los que me sentía perdida, pero escuchar sus risas, observar sus dibujos, leer sus cartas y sentir sus abrazos me han proporcionado la energía necesaria para seguir adelante.

A mis primos, la Dra. Grace Ayala y el Dr. Israel Criollo: indiscutiblemente, siempre serán una luz en mi vida. Les agradezco por sentarse a mi lado y permitirme ver las cosas desde una nueva perspectiva.

A mis amigos, Karelys Sarmiento, María José Peña, Yuliana Correa y Omar Barros, quienes han convertido esta etapa en la mejor experiencia de mi vida. Junto a ustedes he redactado el capítulo más significativo de mi historia. Deseo enormemente que triunfemos juntos.

Para finalizar, a dos grandes personas que conocí a lo largo de mi carrera; Ing. Javier Aguilar e Ing. Henry Aguilar, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme a resolver diversas dificultades académicas, muchas gracias.

Sara Anahi Criollo Nivicela

AGRADECIMIENTO

Deseo manifestar mi gratitud a Dios y a mi familia; sin su dirección y motivación, no habría alcanzado este logro. Son mi mayor fuente de motivación e inspiración en este camino difícil. Agradezco profundamente todo lo que han realizado por mí a lo largo de este trabajo.

Agradezco especialmente a mi mamá, Susana Márquez. No tengo palabras para expresar todo lo que has hecho por mí, todos los sacrificios y desafíos que tuviste que atravesar para que yo pudiera alcanzar todo lo que tengo hoy. Gracias por creer en mí, por motivarme a perseguir mis sueños y, por supuesto, por ser mi mayor inspiración. Este trabajo es tanto mío como tuyo, porque sin tu apoyo incondicional no habría podido llegar hasta aquí. Te amo con todo mi corazón.

De igual manera, agradezco a mi abuela, Mercedes Sagal. Sus enseñanzas y su amor incondicional, que me ha ofrecido desde siempre, han sido un pilar fundamental en mi vida. Gracias por cuidarme, por sus oraciones y por secar mis lágrimas en momentos difíciles, celebrando cada uno de mis logros. Estoy muy agradecida por todo lo que has hecho por mí, siendo luz en mi camino.

A mi hermanita, María Cecilia, te agradezco por ser mi momento feliz en todos mis días. Tus risas, ocurrencias y hasta travesuras son y serán un abrazo motivador en mis momentos de duda. Gracias por ser mi fuente de inspiración en este largo camino.

A mis amigos Yuliana, Sara y Omar ustedes han sido mi apoyo incondicional a lo largo de este trayecto. Es muy difícil imaginar haber llegado hasta aquí sin su compañía y aliento. Cada día de estudio, risas y desahogos ha convertido este camino en algo más ligero y divertido. Han sido mi refugio y fuente de inspiración, y estoy muy agradecida de tenerlos en mi vida. Los quiero mucho.

A mi pareja, Jeff Arévalo, mi amor hacia a ti es infinita y agradezco por llegar en los momentos de incertidumbre y duda, por ser mi impulso para salir de mi zona de confort. Tu capacidad de escucharme y darme consejos ha sido invaluable, y tu fe en mis habilidades me ha motivado a dar lo mejor de mí.

A mis tíos y tías, agradezco por estar presentes en mi vida, por sus consejos y por creer en mí en cada paso de este camino.

María José Peña Márquez

RESUMEN

En Ecuador, el cultivo del *Litopenaeus vannamei* tuvo inicio en la provincia de El Oro y es identificado como uno de los productos de mayor importancia en exportación no relacionado al petróleo, lo que lo convierte, en una de las actividades más relevantes en el impacto financiero del país. Con la alta demanda de la producción de camarón en mercados, ha surgido en los sectores camaroneros la necesidad de implementar diferentes niveles de intensidad, lo que ha dado lugar a sistemas-intensivos, intensivos, super-intensivos e hiper-intensivos, para incrementar la densidad de producción y satisfacer la demanda.

La implementación de estas densidades de siembra ha provocado la aparición de enfermedades, ocasionando problemas en la producción con una alta probabilidad de mortalidad en los organismos, por lo general se debe a una mala gestión y una producción de alta intensidad. La aparición de nuevas enfermedades ha llevado a la implementación de diferentes tratamientos profilácticos y terapéuticos para conseguir un mejor control del agente patógeno. Las bacterias Gram-negativas, en especial los *Vibrios* siendo los principales responsables de significativas pérdidas económicas para los productores.

Actualmente, hay una creciente preocupación por la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales. Esto ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales y efectivas para el control bacteriano, especialmente en el campo de la producción animal. Dos de las opciones más prometedoras son los ácidos orgánicos y los extractos de plantas. Los ácidos orgánicos, como el ácido fórmico, han demostrado tener propiedades antimicrobianas efectivas contra una amplia gama de bacterias patógenas, por otro lado, el extracto de orégano es rico en compuestos fenólicos, como el carvacrol y el timol, que también poseen actividad antimicrobiana. Una mezcla de ácidos con extractos de orégano puede maximizar su potencial, ya que ambos producirán una alteración del pH del medio, dañar la membrana celular y afectar el metabolismo bacteriano, lo que lleva a la inhibición del crecimiento y la muerte celular.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la sinergia entre extracto de orégano, sales de potasio y ácido fórmico para la reducción de bacterias del género *Vibrio* spp en el cultivo de camarón. Para este ensayo se utilizó dos tratamientos y un control sin suplementación, cada uno con tres réplicas de ácidos orgánicos con fitobióticos (**T1**: Oseanah sin Tween 80, **T2**: Oseanah con Tween 80), Se utilizaron 45 organismos de *L. vannamei*, repartidos al azar los mismos que

fueron alimentados 2 veces al día, y para conservar la calidad de agua se ejecutó recambios de agua a un 30%.

Los resultados mostraron que ambos tratamientos T1 y T2 presentaron una reducción de bacterias tipo *Vibrios* con un 97 % y 92,33 % de reducción respectivamente. Asimismo, los resultados de los estudios *in vitro* revelaron un efecto inhibitorio ante el patógeno con diferentes halos de inhibición para cada tratamiento T1 (13 mm) y T2 (11.5 mm), confirmando que existe la presencia de una sinergia entre la mezcla del fitobiótico y el ácido orgánico. Para concluir, se puede indicar que la suplementación de estas sustancias inhibe el desarrollo de bacterias del género *Vibrio* spp, evidenciándose como una opción amigable evitando la resistencia antimicrobiana, disminuyendo el impacto negativo sobre el ecosistema acuático y contribuyendo así a la sostenibilidad de la industria.

Palabras clave: Fitobioticos, ácidos orgánicos, antibiograma, sinergia, *L vannamei*.

ABSTRACT

The cultivation of *Litopenaeus vannamei* in Ecuador began in the province of El Oro and is identified as one of the most important non-oil export products, making it one of the most relevant activities in the country's financial impact. With the high demand for shrimp production in markets, shrimp farmers have had to implement different levels of intensity, giving rise to super-intensive, intensive, and hyper-intensive systems to increase production density and meet demand.

The implementation of these stocking densities has led to the appearance of diseases, causing production problems with a high probability of mortality in the organisms, usually due to poor management and high-intensity production. The emergence of new diseases has led to the implementation of different prophylactic and therapeutic treatments to achieve better control of the pathogenic agent. Gram-negative bacteria, especially vibrios, are primarily responsible for significant economic losses for producers

There is currently growing concern about the emergence of bacteria resistant to conventional antibiotics. This has driven the search for natural and effective alternatives for bacterial control, especially in the field of animal production. Two of the most promising options are organic acids and plant extracts, such as oregano extract. Organic acids, like formic acid, have been shown to have effective antimicrobial properties against a wide range of pathogenic bacteria. On the other hand, oregano extract is rich in phenolic compounds, such as carvacrol and thymol, which also possess antimicrobial activity. A mixture of acids with oregano extracts can maximize their potential, as both will produce an alteration of the pH of the medium, damage the cell membrane, and affect bacterial metabolism, leading to growth inhibition and cell death.

This study aims to evaluate the synergy between oregano extract, potassium salts, and formic acid for the reduction of bacteria of the genus *Vibrio* spp in shrimp farming. For this trial, two treatments and an unsupplemented control were used, each with three replicates of organic acids with phytobiotics (T1: Oseanah without Tween 80, T2: Oseanah with Tween 80). Forty-five *L. vannamei* organisms were randomly distributed, fed twice daily, and water quality was maintained by performing 30% water changes

The results showed that both treatments T1 and T2 presented a reduction of *Vibrio*-type bacteria with 97% and 92.33% reduction, respectively. Additionally, the results of the in vitro studies revealed an inhibitory effect on the pathogen with different inhibition halos for each

treatment T1 (13 mm) and T2 (11.5 mm), confirming the presence of a synergy between the phytobiotic and organic acid mixture. In conclusion, the supplementation of these substances inhibits the development of bacteria of the genus *Vibrio* spp, proving to be a friendly option, avoiding antimicrobial resistance, reducing the negative impact on the aquatic ecosystem, and thus contributing to the sustainability of the industry.

Key words: Phytobiotics, Organic Acids, Antibioticogram, Synergy, *L. vannamei*.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	X
INDÍCE DE FIGURAS.....	XIV
INDÍCE DE GRÁFICOS	XIV
INDÍCE DE ANEXOS.....	XV
I. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Planteamiento del problema.....	19
1.2. Justificación	20
1.3. Objetivos	21
1.3.1. Objetivo general	21
1.3.2. Objetivos específicos	21
1.4. Hipótesis.....	21
1.5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.6. Generalidades del cultivo de camarón	22
1.6.1. Definición de la acuicultura.....	22
1.7. Cultivo de camarón en Ecuador.....	22
1.8. Importancia del cultivo de camarón en Ecuador.....	22
1.9. Vibriosis.....	23
1.9.1. Vibriosis en larvicultura	23
1.9.2. Vibriosis en engorda.....	24
1.9.3. <i>V. parahaemolyticus</i>	24
1.9.4. <i>V. harveyi</i>	24
1.9.5. <i>V. vulnificus</i>	25
1.10. Tratamientos para las enfermedades.....	26
1.10.1. Terapéuticos	26
1.10.2. Profilácticos	27
1.10.3. Ácidos Orgánicos y sus sales	27
1.10.3.1. Ácido fórmico (AF).....	27
1.10.3.2. Aplicación del ácido fórmico en acuicultura	28
1.10.3.3. Formiato de potasio	28
1.10.3.4. Aplicación de formiato de potasio en acuicultura	28

1.10.4. Extractos de plantas en la disminución de vibriosis	29
1.10.4.1. Extracto de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	30
1.10.4.2. Aplicación del Orégano en Acuicultura	30
1.10.5. Sinergia de ácidos orgánicos mezclados con extractos de plantas.....	31
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1. Ubicación del proyecto.....	33
2.2. Materiales	33
2.2.1. Insumos	33
2.2.2. Materiales biológicos	34
2.2.3. Equipos.....	34
2.2.4. Materiales.....	34
2.3. Métodos.....	35
2.3.1. Tratamiento <i>in vitro</i>	35
2.3.2. Tratamiento <i>in vivo</i>	36
2.3.3. Diseño experimental.....	37
2.3.5. Procedimiento estadístico.....	37
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
3.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la sinergia entre ácidos orgánicos y fitobióticos	39
3.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la sinergia entre ácidos orgánicos y fitobióticos.....	43
IV. CONCLUSIÓN.....	48
V. RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	57

INDÍCE DE FIGURAS

Figura

1: Facultad de Ciencias Agropecuarias.....	32
2: Diámetro de los halos de inhibición en el antibiograma.....	37
3: Bacteriología inicial de ufc/g de hepatopáncreas de <i>L. vannamei</i>	41
4: Bacteriología final de ufc/g de hepatopáncreas de <i>L. vannamei</i>	41

INDÍCE DE TABLAS

Tabla

1: Descripción de los tratamientos in vitro.....	35
2: Croquis del diseño experimental.....	36
3: Tratamientos evaluados con su respectivo halo de inhibición.....	37
4: ANOVA de un factor intergrupos del conteo de bacterias.....	38
5: Análisis de los subconjuntos homogéneas de medias en ANOVA.....	38
6: ANOVA de un factor intergrupos del conteo de bacterias.....	42
7: Análisis de los subconjuntos homogéneas de medias en ANOVA.....	43

INDÍCE DE GRÁFICOS

Gráfico

1: Diagrama de cajas simple de diámetro por tratamiento.....	38
2: Diagrama de cada simples de los tratamientos evaluados <i>in vivo</i>	42

INDÍCE DE ANEXOS

Anexo 1: Tratamientos evaluados para la elaboración del antibiograma.	57
Anexo 2: Cepa de <i>Vibrio</i> sp.	57
Anexo 3 : Elaboración del antibiograma	58
Anexo 4: Tratamientos evaluados en la prueba de sensibilidad (antibiograma)	58
Anexo 5: Recolección de agua y camarones en la camaronera San Alfonso ubicada en Barbones.....	59
Anexo 6: Traslado de los camarones a las instalaciones de la FCA.....	59
Anexo 7: Tanques usados como reservorio, aplicando aireación 24/7.....	60
Anexo 8: Control y sifoneo de cada tratamiento	60
Anexo 9: Prueba de microbiología luego de dosificar Oseanah durante 10 días	61
Anexo 10: Diluciones seriadas del HP por triplicado.....	61
Anexo 11: Plaqueo de las diluciones seriadas por triplicado de cada tratamiento	62
Anexo 12: Plaqueo de las diluciones seriadas por triplicado de cada tratamiento	62
Anexo 13: Datos procesados en "Blue Aqua"	62

I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de opciones alimenticias ha llevado a la humanidad a explorar fuentes de proteína económicamente accesibles y con un alto nivel de rentabilidad. En Ecuador, en el año 2023 se alcanzó una producción acuícola de más de 233´231.853 libras, con un valor aproximado de \$ 215´000.000. Esta circulación de divisas ha tenido un impacto significativo en la economía internacional (CNA, 2023).

En Ecuador, la producción del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* comenzó en el año de 1968 en Santa Rosa y actualmente se lo ha categorizado como el principal producto de exportación de procedencia no petrolera, por tal motivo, es determinada como una actividad con gran impacto financiero dentro del país (Varela *et al.*, 2017).

Con el aumento de la demanda del mercado se ha propiciado entre los sectores camaroneros la urgencia de producir con diferentes niveles de intensidad en el cultivo, dando origen a sistema; semi-intensivo: intensivo, súper-intensivo e hiper-intensivos, con la finalidad de generar un aumento en la densidad de producción y cubrir la demanda alimenticia (Pérez-Chabela *et al.*, 2020).

La aplicación de estos sistemas de cultivo da como resultado el origen de enfermedades generando graves problemas en la producción, existiendo la probabilidad de la aparición de mortalidad en los organismos, esto es por lo general como consecuencia de una mala gestión y una elevada intensidad de producción (Martín *et al.*, 2022).

Con la aparición de nuevas enfermedades se ha recurrido a diversos tratamientos ya sean profilácticos o terapéuticos con la finalidad de encontrar un mejor control sobre agente patógeno. Las bacterias Gram-negativas son microorganismos que se encuentran en las piscinas ocasionando problemas al cultivo de camarón, el tipo más conocido son los vibrios, los cuales son los responsables de grandes pérdidas económicas (Casanova-Nodarse *et al.*, 2023).

Para el control de estas enfermedades se han aplicado diversos antibióticos como la oxitetraciclina, sin embargo, el uso de estos bactericidas provoca la pérdida de otros organismos que no son objeto de control ocasionando un desequilibrio en el ecosistema, asimismo, una dosis inadecuada de estos productos genera resistencia del agente patógeno generando un mayor problema (Gamez-Bayardo *et al.*, 2021).

En Ecuador se encuentra prohibido el uso de enrofloxacin y se recomienda no usar la oxitetraciclina y florfenicol (Ministerio de Acuacultura y Pesca, 2018). Con la restricci3n de estos medicamentos han surgido alternativas profil3cticas como son: 3cidos org3nicos, productos naturales y bacteri3fagos, los mismos que en diferentes investigaciones han presentado resultados ben3ficos en la industria del camar3n (Varela-Mej3as Uriarte *et al.*, 2020).

El 3cido f3rmico, formiato de potasio y extracto de or3gano "*Origanum vulgare*" son considerados como una gran opci3n para su aplicaci3n, ante la aparici3n de bacterias en el sector camaronero debido a sus diversas propiedades, por lo tanto, se los ha presentado como una alternativa menos agresiva para el ambiente y el organismo, destacando que su aplicaci3n genera beneficios econ3micos al productor.

1.1. Planteamiento del problema

Debido a la intensificación que se ha realizado en los sistemas acuícolas se han desencadenado diversas enfermedades que disminuyen la producción, por ejemplo, las enfermedades de origen bacteriano como la vibriosis, la cual es considerada una de las limitantes de mayor importancia en el cultivo de camarón ya que afecta la fase larvaria y de engorde provocando grandes mortalidades y a su vez generando pérdidas económicas.

En este sentido, se comprende que los brotes de vibriosis generalmente ocurren por variaciones ambientales, altas densidades, malas prácticas, aumento de la materia orgánica y exceso de nutrientes. Estos factores favorecen la replicación bacteriana y al tratarse de patógenos oportunistas afectarán el sistema inmune de los camarones volviéndolos vulnerables a las diferentes enfermedades que pueden causar los vibrios y provocarán altas tasas de mortalidad, afectando la producción.

1.2. Justificación

Actualmente existen diversas investigaciones enfocadas en reducir la mortalidad en el cultivo de camarón provocada por enfermedades de origen bacteriano. De esta manera, se han desarrollado, las cuales han permitido reducir significativamente el porcentaje de mortalidad, sin embargo, se ha demostrado que el uso de antibióticos representa una mayor problemática, por tal motivo, se han incorporado alternativas menos invasivas, como son el uso de ácidos orgánicos (AO), extractos de plantas (EP) y la sinergia entre estos productos los cuales han demostrado ser efectivos debido a que cuentan con propiedades antimicrobianas.

De hecho, se conoce que el ácido fórmico (AF) en la industria alimenticia es usado como aditivo, conservante y antibacteriano frente a bacterias Gram-negativas, asimismo en industrias agrícolas es utilizado como pesticida, fungicida y bactericida; por otra parte, el formiato de potasio (FK) es un fertilizante muy efectivo en el crecimiento de plantas debido a su aporte de potasio y, en la industria alimenticia también se lo considera un aditivo efectivo en la conservación de alimentos.

De igual forma, el extracto de orégano (EO) funciona eficientemente como insecticida, bactericida, conservador de alimentos y es ampliamente usado en medicina ya que cuenta con propiedades antiinflamatorias, antifúngicas y antioxidantes. De igual manera, con base en diferentes investigaciones se destaca que los compuestos que contiene el EO, como el timol y carvacrol, han funcionado eficientemente en disminuir la proliferación de bacterias en el cultivo tanto de peces como de crustáceos ya que interrumpe el *Quorum sensing* ofreciendo una mejor rentabilidad en los cultivos, debido a que la virulencia de patógenos bacterianos puede ser reducida.

Con base a lo expuesto y considerando las aplicaciones de cada componente dentro de las diferentes industrias, la presente investigación se efectúa para evaluar la sinergia entre AF, FK con EO en la disminución de la vibriosis en juveniles de *L. vannamei*. Por lo que, realizar la investigación sobre la sinergia entre estos compuestos es de suma importancia ya que ofrece al sector camaronero nuevos enfoques que permiten mantener un mejor control ante enfermedades, además de ello, beneficia al productor ya que los costos de producción son reducidos debido a que se descarta la dependencia del uso inconsciente de antimicrobianos sintéticos y, a su vez los resultados obtenidos de la presente investigación ayudará a promover una acuicultura sostenible debido a que se centra en el bienestar del organismo y su entorno.

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo general*

Evaluar la sinergia entre la solución de extracto de orégano, sales de potasio y ácido fórmico en la reducción de bacterias del género *Vibrio* spp.

1.3.2. *Objetivos específicos*

- ✓ Determinar la formulación adecuada para realizar la dilución entre ácido fórmico, formiato de potasio y extracto de orégano.
- ✓ Verificar la efectividad de la sinergia *in vitro* para la disminución de bacterias del género *Vibrio* spp.
- ✓ Comprobar la efectividad de la sinergia *in vivo* para la reducción de la vibriosis.
- ✓ Evaluar el tratamiento efectivo para la disminución de vibrios en juveniles de *L. vannamei*.

1.4. Hipótesis

- La sinergia entre la disolución de extracto de orégano, sales de potasio y ácido fórmico tiene buena respuesta para la reducción de bacterias del género *Vibrio* spp.

1.5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.6. Generalidades del cultivo de camarón

1.6.1. Definición de la acuicultura

La acuicultura es una actividad donde se cultiva de manera controlada organismos de origen acuático para su consumo, siendo estas especies adecuadas para la dieta humana. La producción de estos organismos se desarrolla en un ambiente vigilado, en el cual se lleva un monitoreo en sus diferentes fases de crecimiento. Las especies seleccionadas presentan características como resistencia, facilidad de alimentación y la habilidad de aumentar su tamaño en cortos intervalos de tiempo, permitiendo incrementar las cantidades de biomasa y satisfacer la demanda del consumo humano (Socarrás *et al.*, 2019).

1.7. Cultivo de camarón en Ecuador

En Ecuador, la producción de camarón se presentó en Santa Rosa en el 1968. En sus diferentes esteros se atrapaba larvas de camarón silvestres en marea alta, estas larvas lograban completar su desarrollo. Con el paso de los años, cada sector ha ido aprendiendo y modernizándose en la crianza de camarones (Gan *et al.*, 2022), implementando la instalación de bombas y aparatos tecnológicos que facilitan la producción, permitiendo el surgimiento del cultivo del camarón en el país (Vega *et al.*, 2019).

1.8. Importancia del cultivo de camarón en Ecuador

En Ecuador, el sector camaronero posee gran relevancia en el mercado mundial ya que el país se considera una pieza clave a nivel internacional. Debido a la calidad del producto que ofrece el sector camaronero ecuatoriano, ha logrado acceder a los mercados internacionales (Chancay-Paco *et al.*, 2021).

La producción camaronera se realiza en la región Costa, en donde el tipo de ambiente es ventajoso para el desarrollo de este cultivo. Según Arias & Torres (2019) el trabajo que ofrece la producción del camarón representa un promedio de 180 mil personas en el Ecuador como una fuente económica en diferentes cantones del país. Sin embargo, la actividad camaronera puede ser

afectada por diferentes microorganismos como las bacterias del género *Vibrio* spp, que causa grandes pérdidas económicas a este sector.

1.9. Vibriosis

Los vibrios son pertenecientes a la familia Vibrionaceae, se trata de bacterias Gram-negativas, dentro de sus principales características se encuentra la incapacidad de formar esporas, producción de la enzima oxidasa la cual permite facilitar su identificación, flagelo monotrico, halofílicas, aeróbicas facultativas y su longitud aproximada es de 1,4 a 2,6 μm , y su presencia en los cultivos es la causante del 90% de mortalidad. Se reproducen en un lapso de 12 a 48 horas, con una capacidad de sobrevivencia a un rango de temperaturas de 30 a 37 °C teniendo una mayor tasa de crecimiento a altas temperaturas (Fernández y Alonso, 2009).

Son organismos que pueden coexistir en el medio acuoso y el organismo sin causar problemas en el cultivo cuando las condiciones físicas y biológicas se encuentran estables, por el contrario, cuando surgen variaciones de pH, temperatura, oxígeno, salinidad, nutrientes, entre otros, provocarán que el camarón se inmunodeprima, volviéndolo vulnerable ante cualquier patógeno oportunista que se encuentre en el medio, como es el caso de los vibrios ocasionando diversas enfermedades (Varela y Cuéllar, 2020).

En el cultivo de camarón la presencia de vibriosis puede originar enfermedades como hepatopancreatitis necrotizante (NHP), necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), síndrome de la gaviota, síndrome de zoea II, necrosis hepatopancreática séptica, Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS) y vibrios luminiscentes (Morales-Covarrubias *et al.*, 2018). Y a su vez lo agentes etiológicos que han sido reportados durante los últimos años son *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbelli* y *V. harveyi* (Chandrakala y Priya, 2017).

1.9.1. Vibriosis en larvicultura

Dentro de la larvicultura se mencionan diversas enfermedades ocasionadas por el mismo género bacteriano, como son la vibriosis, vibriosis luminiscente, bolitas blancas, síndrome de zoea, síndrome de mortalidad temprana y hepatopancreatitis necrotizante. La diferencia se encuentra en que cierta patología posiblemente sea provocada por los “vibrios no luminiscentes” probablemente causada por las cepas *V. parahaemolyticus*, mientras que, la luminiscencia es a causa de la cepa *V.*

harveyi o *V. campbelli*. Así mismo las “bolitas blancas” son solo un síntoma más de cierta vibriosis, sin embargo, no se descarta que podría ser a causa de otras circunstancias (Muñoz, 2022).

1.9.2. Vibriosis en engorda

En el Ecuador existen diversas patologías de gran importancia, causadas por virus como la mancha blanca, y síndrome de taura, al igual que por bacterias, como la vibriosis. Esta enfermedad en la etapa de engorde puede presentarse de diferentes maneras dependiendo del agente patológico: hepatopancreatitis séptica, vibriosis sistemática, vibriosis entérica, vibriosis localizada en heridas, vibriosis cuticular, vibriosis oral y enfermedad de la cutícula del cefalotórax (Varela y Choc, 2020).

1.9.3. *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus se trata de un patógeno halófito, cuenta con un rango de temperatura de 10 °C a 44 °C y su óptimo siendo de 35 °C a 37 °C en laboratorio. Estudios recientes han demostrado que este vibrio recibió un plásmido denominado pVA, el cual es causante de codificar toxinas como PirA y PirB, ocasionando enfermedades como necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) a causa de la acumulación de las toxinas en este órgano (Barrantes, 2023).

Se establece en el tracto digestivo ya que pueden ingresar en los organismos vía oral, consecuentemente provocará la liberación de toxinas, daños en el hepatopáncreas, degradación de células, daños en el epitelio tubular y afecta a los hemocitos presentándose en forma de necrosis en sus tejidos (Licon, 2022). De manera más clara, su mecanismo de patogenicidad se basa en el factor de adhesión, hemolisina, sistema de secreción tipo III y IV, lipopolisacárido, absorción de hierro entre otros métodos que contribuyen a la proliferación de la bacteria en el huésped (Li *et al.*, 2019).

1.9.4. *V. harveyi*

Se conoce que el *Vibrio harveyi* forma parte de la familia Vibrionaceae, clase Gamma-proteobacteria, es considerado un patógeno de vital atención ya que tiene efecto sobre los organismos acuáticos como, peces y crustáceos, afectando sus diferentes estadios: huevo, larva, juveniles y adultos (Newman, 2022). Bajo diferentes investigaciones se ha demostrado que su agente etiológico ocasiona necrosis a nivel muscular además de afectar la composición del microbioma intestinal en camarones (Gan *et al.*, 2022).

Se lo encuentra de forma libre o comensal junto a diversos organismos acuáticos o adheridos en sedimentos o ecosistemas abióticos. Entre sus características se destaca que cuenta con una alta capacidad adaptativa ya que sus genes se transmiten de forma horizontal y cuenta con una elevada tasa de mutación, tolera diferentes porcentajes de salinidad, emite señales afirmativas ante la ornitina descarboxilasa y lisina carboxilasa, e inquisitivamente es resistente a antibióticos debido a sus genes (Montánchez & Kaberdin, 2020).

Su mecanismo de patogenicidad variará dependiendo a la especie afectada; en peces, involucra la hemolisina extracelular, que se identificó como una fosfolipasa B y que a través de la vía de activación de la caspasa podía inactivar las células mediante apoptosis. Además, este patógeno, se puede presentar en un estado viable pero no cultivable (VBNC) en donde su reactivación celular es la causante de importantes brotes de vibriosis en la acuicultura. En el caso de camarones, su etiología implica la interacción con bacteriófagos, endotoxina lipopolisacárido y proteasas extracelulares (Zhang *et al.*, 2020).

1.9.5. *V. vulnificus*

Es un patógeno Gram-negativo perteneciente a la familia Vibrionaceae, son bacterias hidrófilas móviles ya que cuenta con flagelos en su estructura y se encuentra presente en zonas costeras con bajas salinidades (Luo *et al.*, 2022). Se trata de un patógeno que afecta principalmente a peces suspensivos, moluscos y crustáceos de ambientes estuarinos los cuales mediante su ingesta o contacto podrían afectar a los humanos (Dickerson *et al.*, 2021).

Es halófila de ambientes estuarinos, generalmente ocurre en temporadas cálidas de verano, por lo que experimenta un estado viable pero no cultivable a temperaturas inferiores a 13°C. Entre sus factores de virulencia se encuentran, sistemas de citotoxicidad, neutralización ácida, adquisición de hierro y expresión de polisacáridos capsulares (Baker y Oliver, 2018).

Este patógeno puede prevalecer a temperaturas ≥ 18 °C a 20 °C siendo susceptible a > 25 °C, a una salinidad de 25 ‰. Se transmite mediante el agua o el simple contacto, en el caso de los peces, el patógeno ingresa al organismo mediante las branquias, colonizando el intestino y el ano, estas bacterias generalmente son atraídas por el moco y sangre del huésped, además de que su proliferación implica la producción de exoenzimas y toxinas las cuales provocan daños en el tejido del hospedador (Hernández-Cabanyero y Amaro, 2020).

1.10. Tratamientos para las enfermedades

A lo largo del tiempo, se han puesto en práctica diferentes estrategias para combatir las enfermedades causadas por bacterias, hongos y parásitos. Entre las alternativas más usadas están los tratamientos profilácticos y terapéuticos. Dentro de una perspectiva más general, en los tratamientos terapéuticos normalmente se hace uso de antibióticos, los cuales, en su mayoría están restringidos en el cultivo de camarón debido a su gran impacto en el ecosistema.

Por otro lado, los métodos profilácticos han mejorado significativamente los parámetros productivos ya que tienen efecto en los procesos de digestión, estimulan la microbiota del intestino y evidentemente mejoran el sistema inmunológico de los organismos cultivados volviéndolos más resistentes ante cualquier patógeno oportunista (Campa-Córdova *et al.*, 2017). Una de las herramientas que actualmente se está analizando son los ácidos orgánicos y los fito bióticos, los cuales en diferentes investigaciones han demostrado ser unos excelentes inmunoestimulantes para el desarrollo del camarón.

1.10.1. Terapéuticos

Estos productos químicos pueden tener un efecto bacteriostático y/o bactericida y cuentan con un tiempo de aplicación recomendado durante 5 y 7 días. Por otro lado, se establece que la aplicación y retiro del producto debe ser antes de la cosecha (21 y 40 días), para evitar problemas en la salud del hospedador mediante la biotransformación, resistencia bacteriana y sobre todo la acumulación en el tejido afectando la calidad del producto (Sorroza *et al.*, 2009).

Según Gamez-Bayardo *et al.* (2021) en su informe expone que la finalidad del uso de antibióticos es suprimir al agente infeccioso en corto tiempo sin ocasionar daños al camarón. Sin embargo, Varela y Alfaro (2018) indican que el empleo de antibióticos ha obtenido efectos irregulares y erróneos permitiendo la evolución del patógeno. En Ecuador según el Instituto Nacional de Pesca (INP) en su artículo 1 veta el empleo de productos que posean antibióticos como la Enrofloxacina (ENRO) en las diferentes fases de la producción acuícola (Ministerio de Acuicultura y Pesca, 2018).

1.10.2. Profilácticos

En la actualidad se han desarrollado diversas alternativas profilácticas que han permitido mejorar la supervivencia y crecimiento del camarón dado a que su aplicación ya sea en el agua o el alimento han permitido mejorar la respuesta inmune de los organismos e inhibir la proliferación de patógenos. Entre los métodos más utilizados en acuicultura están: ácidos orgánicos, sales, aceites esenciales, prebióticos y probióticos.

1.10.3. Ácidos Orgánicos y sus sales

Los ácidos orgánicos generalmente están presentes de dos maneras; naturalmente en los tejidos de animales, plantas y mediante la fermentación. En la industria alimenticia generalmente son utilizados como conservantes y dotadores de olor, sabor y color. Dentro de la industria acuícola actúan de manera multifacética: favorecen la absorción de nutrientes como el fósforo y nitrógeno, funcionan como promotores de la tasa crecimiento, inhibidores de microorganismos patógenos del intestino tanto de peces como de camarones y mejoran la calidad de agua (Rombenso *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que la aplicación de ácidos orgánicos de cadena corta y sus sales desempeñan un papel crucial en el crecimiento de los camarones al facilitar las vías metabólicas favoreciendo la producción de energía, promueven la función enzimática digestiva, mejoran la absorción de aminoácidos e influyen en el pH y la microbiota del intestino. Sin embargo, su eficiencia está ligada al tipo y a la mezcla que se realice con otros ácidos (Rombenso *et al.*, 2020). Pese a su eficiencia en el cultivo de camarón, su aplicación se ha limitado al uso de ciertos productos tales como el ácido fórmico, cítrico y láctico (Valenzuela *et al.*, 2020).

La eficacia del ácido orgánico está ligada a su valor de pKa, en este sentido, mientras más bajo sea su valor su eficiencia será mayor, de este modo, al ser aplicados a una solución acuosa, los ácidos con un pKa alto tendrán una disociación parcial y los pKa bajo tendrán una disociación completa, generalmente los ácidos más utilizados en el cultivo de camarón son aquellos no disociados, por lo tanto, su eficacia es maximizada al intervenir en los procesos antes expuestos (Chowdhury *et al.*, 2021).

1.10.3.1. Ácido fórmico (AF)

Este ácido, representa el ácido carboxílico más sencillo, fue identificado por el naturalista John Ray por medio de la segregación de un grupo de hormigas rojas “Formica rufa” la cual da origen

a su nombre “fórmico”. La acidez de la molécula lo da su grupo ácido carboxílico, su pKa es de 3.75 por lo que se considera un ácido fuerte para ser un producto de origen natural. La reactividad de este grupo de ácidos carboxílicos es variada, puede actuar con bases que tienen un gran potencial. El ácido fórmico tiene características antibacterianas por lo que disuelve la pared celular de los microorganismos patógenos (Casto-Rebollo *et al.*, 2013).

1.10.3.2. Aplicación del ácido fórmico en acuicultura

Se realizó una investigación haciendo uso de ácidos orgánicos para el control de la vibriosis, destacando que el ácido fórmico cuenta con un pKa (3,75) más bajo que el ácido acético y propiónico, por lo que presenta una mejor acción en el cambio pH de las bacterias patógenas. En este estudio se determinó mediante absorbancia que a las 96 horas de aplicación de ácido fórmico a una concentración de 0,023 % y 0.035 % actuó impidiendo la propagación de vibrios (*V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. alginolyticus* (Adams y Boopathy, 2013).

De manera similar, se realizó una investigación haciendo uso del ácido fórmico (0.3%) y su mezcla con betacaroteno (0.3% AF y 50 ppm) en la prevención de vibrios. En este estudio se destacó que después de aplicar *V. parahaemolyticus* (1×10^4 ufc) la supervivencia no fue significativa entre ambos tratamientos, de modo que, se concluye que si se aplica sólo ácido fórmico habrá una mejora en la supervivencia en comparación al tratamiento control (Yowaphui *et al.*, 2016).

1.10.3.3. Formiato de potasio

El formiato de potasio se constituye como una sal de potasio la cual es derivada del ácido fórmico. Desempeña el papel de un sistema amortiguador y se presenta como una combinación de potasio y carbono en forma de sal. Mantiene una conexión funcional con el ácido fórmico, este compuesto exhibe propiedades relacionadas con dicha sustancia ácida (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024).

1.10.3.4. Aplicación de formiato de potasio en acuicultura

La aplicación de formiato de potasio en el alimento presentó mejores resultados en cuanto a tasa de crecimiento y supervivencia. Se demostró, a través del conteo de bacterias, que después de la exposición a *V. harveyi* (1×10^8 ufc) el tratamiento con formiato de potasio al 2 % fue significativamente menor en comparación a los otros tratamientos. Además, mediante análisis

histopatológicos, se notó que, al porcentaje señalado, el daño en el hepatopáncreas fue menor. También se enfatizó que hubo mejora de la actividad respiratoria, profenoloxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Sivakumar *et al.*, 2019).

De manera similar, Lückstädt (2020) comprobó que su aplicación en el alimento para juveniles de *L. vannamei* aplicado tanto al 0.2 % como al 0.5 % son capaces de inhibir la proliferación de bacterias patógenas, como *V. harveyi* (5×10^6 ufc), además de ello, se destacó que su aplicación mejoró el crecimiento, por lo cual, resulta ser una propuesta prometedora para el sector acuícola

1.10.4. Extractos de plantas en la disminución de vibriosis

Los extractos naturales se han establecido como una opción para estimular el sistema inmune y para potenciar el desarrollo del animal sin ocasionar un impacto ambiental. Por esta razón, se ha realizado diferentes estudios que han evidenciado los resultados beneficiosos que ofrecen los aceites esenciales para contrarrestar las enfermedades de origen bacteriano en especial las que son causadas por bacterias Gram-negativas como la *Vibriosis* spp (Peña-Navarro *et al.*, 2013).

Las plantas, poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y alcaloides, los cuales se ha verificado *in vitro* que poseen propiedades antibacterianas (Manandhar *et al.*, 2019). Entre los fitobióticos de mayor uso en el sector acuícola y que bajo diferentes investigaciones han demostrado su eficacia son los que se extraen de: Hierba luisa (*Aloysia triphilla.*) y Orégano (*Origanum vulgare.*) (Sorrosa *et al.*, 2017), Canela (*Cinnamomum verum.*), Eucalipto (*Eucalyptus melliora* A.), Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y Guayaba (*Psidium guajava* L.) (Gómez *et al.*, 2019).

Para la obtención de los extractos de plantas se hace uso de diferentes procesos como: maceración, filtración, decocción, extracción a reflujo y extracción Soxhlet (Zhang *et al.*, 2018), los cuales, dependiendo del punto de ebullición se extraerá su principio activo proveniente de raíz, tallo, hojas, flores y frutos, los cuales serán sometidos a la acción de diferentes solventes, como agua, etanol, metanol, entre otros. Finalmente se hace énfasis, que la eficiencia del fitobiótico dependerá de su composición, método de extracción y forma de aplicación (Carbay & Sorrosa, 2019).

1.10.4.1. Extracto de orégano (*Origanum vulgare*)

Dentro de los últimos años, el extracto de orégano ha presentado gran interés científico debido a sus propiedades terapéuticas y medicinales, así como por sus compuestos fitoquímicos naturales presentes en su aceite esencial. Estos poseen fuertes cantidades de compuestos bioactivos, siendo los principales el grupo de monoterpenoides como el carvacrol, t-imol, y-terpineno, α -terpineol y p-cimeno con diferentes características farmacológicas (Ashaari, *et al.*, 2020). Carhuallanqui *et al.* (2020) menciona que los compuestos químicos como el timol y carvacrol (11,9 % y 1,7 %) poseen una mayor actividad antibacteriana, y sus concentraciones mínimas inhibitorias de bacterias son de 0.28-1.27 mg/ml (Rodriguez, 2011).

En cuanto su mecanismo de acción, tanto el timol y como el carvacrol provocan daños a nivel celular de las bacterias, induciendo la expulsión de los liposácaridos e incrementando la permeabilidad de la pared celular, adicionalmente se menciona que el timol ocasiona deterioro interno y externo en la membrana celular e interacciona con proteínas y dianas celulares (Hyldgaard *et al.*, 2012).

1.10.4.2. Aplicación del Orégano en Acuicultura

Investigadores elaboraron dos tipos de aceites esenciales de orégano a partir de las hojas y tallos por medio de hidrodestilación, presentando diferentes porcentajes de timol y carvacrol (48 % timol – 23 % carvacrol y 25 % timol 40 % carvacrol). Disolvieron cada uno de estos aceites esenciales con lecitina de soya para luego rociar 5 μ l del aceite diluido (1:1 v/v) por gramo de alimento de camarón. Introdujeron de manera experimental al agua de cultivo *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* con 1×10^6 ufc/ml. En el tratamiento testigo el número de bacterias inicial (1×10^6 ufc) aumentó mientras que en los otros tratamientos experimentales el número de bacterias se redujo, finalmente hubo reducción de bacterias con el tratamiento de 48 % de timol, donde se puede observar una mayor actividad antimicrobiana (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2014).

Por otro lado, Aguirre *et al.* (2021) realizó una investigación con el extracto de orégano usando el método de extracción Soxhlet. Se utilizó 5 g del polvo de la hoja y 100 ml de etanol con una concentración del 96 % para posteriormente concentrarlo con un rotaevaporador. A continuación, elaboraron discos de 6 mm colocando 20 μ l del extracto de orégano, manejando contracciones de 100 %, 50 % y 25 %, con diluciones de 1×10^0 hasta 1×10^{-3} . Para la siembra en placa cultivaron

Vibrio spp. a una cantidad de 1.5×10^8 ufc/ml haciendo uso de agar MH en un intervalo de 24 h. Como resultado se obtuvo que a una concentración del 100 % del extracto hubo una inhibición con halos entre 8,4 mm y 14 mm.

1.10.5. Sinergia de ácidos orgánicos mezclados con extractos de plantas

Dentro de los últimos años se han desarrollado investigaciones con propósito de evaluar la sinergia de ácidos orgánicos combinados con aceites esenciales, demostrando que su mezcla tiene efectos favorables en el cultivo de camarón ya que potencia sus efectos inhibitorios ante patógenos oportunistas, a su vez presenta una mejora en el tracto gastrointestinal, todo esto reflejando mejores tasas de crecimiento y sobrevivencia en los cultivos (He *et al.*, 2017).

Pese a su eficiencia, la aplicación del fitobiótico mezclado con otros ácidos orgánicos se ha enfocado mayormente en calidad alimenticia.

Sin embargo, no existe registro que verifique la sinergia del orégano con ácido fórmico y sus sales. Por lo pronto, se destacan las investigaciones que demuestran que al realizar su combinación se obtienen resultados favorables.

En primera instancia, Evangelista-Martinez *et al* (2018) señalan el efecto sinérgico del aceite de orégano (0.5 a 1 %), ácido acético (12 %) y ascórbico (8 %) diluidos en dimetilsulfóxido en diferentes dosis evaluados como conservantes alimenticios. Expusieron que a una concentración de 10 ug/ml tiene mejor efecto frente a bacterias como *E. coli*, *Salmonella ser. Typhimurium*, *S. aureus* y *C. albicans*, lo cual, demuestra que la aplicación de estas combinaciones es efectiva para detener el crecimiento de los patógenos en la preservación del alimento.

De manera similar, en la investigación de Lin *et al.* (2005), se comprobó la sinergia entre el orégano, arándano y ácido láctico usando 50 % de arándano y 50 % de orégano (p/p) utilizados con una concentración total de compuestos fenólicos de 0.1 mg/ml frente a *V. parahamolyticus*. En sus resultados se destaca que la aplicación combinada de los solventes se potencializó en comparación a su aplicación individual, acentuando que los extractos se desarrollan activando un mecanismo antimicrobiano frente a los diferentes vibrios y que su eficiencia fue mejorada al mezclarse con ácido láctico, por lo que se resalta que es un eficiente conservante alimenticio.

Análogamente, en la publicación de Huang (2021) se analizó la aplicación de aceite de orégano (1 %) combinado con el ácido cítrico (0.5 %) en el filete del salmón del atlántico en donde se

demostró que la sinergia de ambos productos aumentó la sensibilidad frente a *L. monocytogenes* ya que redujo su tiempo de acción para la inactivación de la bacteria.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del proyecto

Este proyecto se efectuó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, localizada en Machala, El Oro, Ecuador, con las siguientes coordenadas: 3°15'52"S 79°57'04"O / -3.264525, -79.951195

Figura 1:

Facultad de Ciencias agropecuarias.



Nota: Fuente (Google maps, 2024).

2.2. Materiales

2.2.1. Insumos

- ✓ Agar TCBS
- ✓ Agar MH
- ✓ Hidróxido de potasio
- ✓ Ácido fórmico
- ✓ Cloruro de Sodio (NaCl)
- ✓ Tween 80

- ✓ Alimento balanceado
- 2.2.2. *Materiales biológicos***
 - ✓ Orégano (*Origanum vulgare*)
 - ✓ Camarones (*L. vannamei*)
 - ✓ *Vibrio* spp.
- 2.2.3. *Equipos***
 - ✓ Soxhlet
 - ✓ Balanza
 - ✓ Estufa
 - ✓ Autoclave
 - ✓ Medidor de pH
 - ✓ Cabina de flujo laminar
 - ✓ Incubadora
- 2.2.4. *Materiales***
 - ✓ Papel
 - ✓ Peceras
 - ✓ Guantes
 - ✓ Cotonetes
 - ✓ Espátula
 - ✓ Cocineta
 - ✓ Marcador
 - ✓ Aireadores
 - ✓ Cajas Petri
 - ✓ Mascarillas
 - ✓ Balón aforado
 - ✓ Plástico negro
 - ✓ Papel aluminio
 - ✓ Varilla de vidrio
 - ✓ Pipeta de 10 mL
 - ✓ Asa bacteriológica
 - ✓ Matraz Erlenmeyer

- ✓ Mechero de alcohol
- ✓ Tubos eppendorf (1.5 mL)
- ✓ Micropipetas (100 y 1000 μ l)
- ✓ 9 bandejas plásticas
- ✓ Piedras difusoras
- ✓ Mangueras
- ✓ Aireadores

1.2.5. Soluciones

- ✓ Etanol al 96%
- ✓ Agua destilada

2.3. Métodos

Para la extracción de los compuestos bioactivos del orégano se utilizó el equipo soxhlet, después se realizó un antibiograma el cual reflejó el halo de inhibición de estos productos de manera individual y en conjunto. Por consiguiente, se comprobó la efectividad *in vivo* de la sinergia de los tratamientos que presentaron mejor halo de inhibición aplicándolo en el alimento de juveniles *L. vannamei* y se comprobó su efecto inhibitorio frente a vibrios mediante el conteo de Vibrios totales.

2.3.1. Tratamiento in vitro

Este proyecto se realizó en los laboratorios de Química y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Técnica de Machala, ubicada en el Cantón Machala, Provincia de El Oro.

Para realizar este ensayo se adquirió el extracto de orégano comercial con un 80 % de carvacrol y 20 % de timol, obtenido mediante el método de arrastre de vapor. Adicionalmente, se elaboraron stocks de ácido fórmico al 10 % v v⁻¹ y formiato de potasio al 8.4 % m v⁻¹.

Para lograr la dilución del extracto de orégano, se optó por usar polisorbato 80 (Tween 80) gracias a su capacidad de estabilizar emulsiones y mejorar la solubilidad de compuestos en soluciones acuosas.

Posteriormente, la mezcla de los compuestos para evaluar si existe sinergia fue denominada como “Oseanah” y también se evaluó su efectividad aplicando Tween 80 en el extracto de orégano [EO (40 %) + T80 (60 %)] “Oseanah + T80”. En la tabla 1 se presenta un resumen de cada tratamiento *in vitro* valorado con sus respectivas concentraciones:

Tabla 1

Descripción de los tratamientos in vitro

Tratamientos	Contenido	Concentración
A	Tween 80	99 %
B	Ácido fórmico (AF)	2.5 % v/v
C	Formiato de K (FK)	4 % m/v
D	Extracto de orégano (EO)	0.50 µg/mL
BCD	AF + FK + EO	2.5 % + 4 % + 0.50 µg/mL
ABCD	AF + FK + EO (40 %) + Tween 80 (60 %)	2.5 % + 4 % + 0.50 µg/mL

Nota: Las concentraciones evaluadas para los ácidos se basaron en las recomendaciones de un producto comercial y para el orégano se hizo referencia a la bibliografía revisada.

2.3.2. Tratamiento *in vivo*

Para la prueba *in vivo* se usaron los tratamientos que presentaron mayor halo de inhibición **BCD** [AF + FK + EO] y **ABCD** [AF + FK + EO (40%) + tween 80 (60%)].

Se usaron camarones donados por el Ing José Sarango provenientes de la camaronera San Alfonso ubicada en Barbones, los cuales fueron transportados hasta el laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y fueron aclimatados durante 3 días después se inició con los respectivos tratamientos.

Se usaron 9 recipientes de plástico con capacidad de 15 L que se llenaron con 10 L de agua con salinidad de 18 mg/L colocando 5 camarones juveniles (3 g) en cada recipiente Se realizó recambios de agua cada 3 días al 30 %. Se controló parámetros como temperatura (26.5±0.5 °C),

amonio (0.010 ± 0.004 mg/L) y pH (6.28 ± 0.08) procesados mediante la aplicación “Blue Aqua-free Ammonia (mg/L)” la cual refleja un rango de toxicidad insignificante (0,00 mg/L).

El ensayo se trabajó con 2 tratamientos y un control con sus correspondientes replicas; **T0**: Solo alimento balanceado; **T1**: Balanceado + [AF (2.5 %), FK (4 %), O (0.50 µg/mL)]+ Pegante; **T2**: Balanceado + [AF (2.5 %), FK (4 %), O (40 %), Tween 80 (60 %)] + Pegante. Se aplicó 2.5 mL por cada Kg de alimento balanceado. Se alimentó a los organismos al 4 % de su biomasa (15 g) por un intervalo de 10 días, proporcionándolo alimento 2 veces al día (8 AM – 2 PM). Se usó un total de 54 g durante los 10 días y se aplicó 0.6 g en cada tratamiento.

Al finalizar los 10 días se ejecutó bacteriología siguiendo la técnica detallada por Gómez *et al.* (2019). Se trabajó con un pool de 10 camarones al azar para extraer el hepatopáncreas (1 g). Se hicieron diluciones seriadas en solución salina (1%) por triplicado 1/10, 1/100, 1/1000 aplicado para cada tratamiento. Posteriormente se inoculó 100 µL de cada dilución de cada tratamiento en las cajas petri. Finalmente se colocó las placas en una incubadora durante 24-48 horas a 30°C para realizar el conteo final.

2.3.3. *Diseño experimental*

Para el ensayo *in vivo* se trabajó con la sinergia entre los ácidos y el orégano (Oseanah)

- **T0** → alimento balanceado.
- **T1** → Oseanah sin tween 80
- **T2** → Oseanah con tween 80

Tabla 2:

Croquis del diseño experimental

TRATAMIENTOS		
T0	T1	T2
T1	T2	T0
T2	T0	T1

2.3.5. *Procedimiento estadístico*

Los datos recopilados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor entre grupos para comparar las variaciones entre los tratamientos con diferentes concentraciones de ácidos orgánicos y orégano usando un nivel de significación $\alpha = 0.05$, sin embargo, previo a

ejecutar el ANOVA, se comprobó la normalidad de los datos mediante una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, evaluando la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene. Estos análisis fueron analizados usando el software estadístico SPSS Statistics versión 25 con un nivel de confianza de 95%, además para identificar semejanzas o similitudes significativas entre los tratamientos se empleó la prueba “post-hoc” de Duncan.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Evaluación *in vitro* de la sinergia entre ácidos orgánicos y fitobióticos

A continuación, se exponen los resultados obtenidos de los tratamientos evaluados mediante la prueba de antibiograma

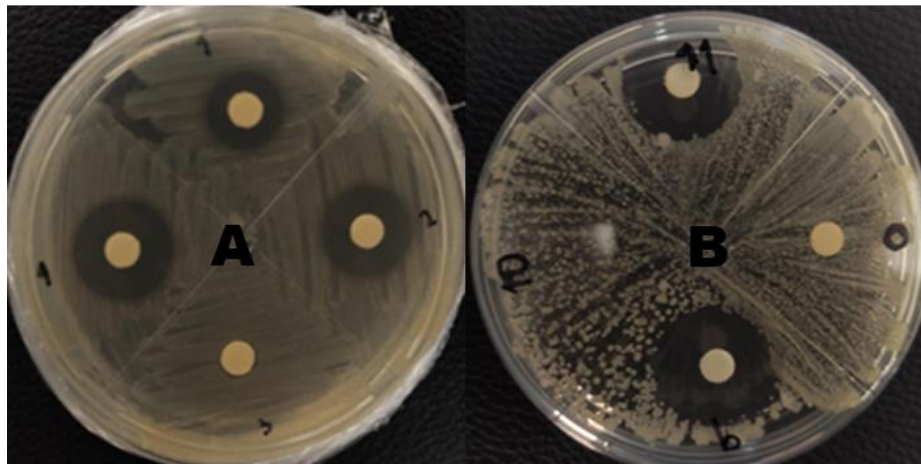
Tabla 3:

Tratamientos evaluados con su respectivo halo de inhibición

	Tratamientos	Concentración	Diámetro del halo (mm)	
			24 horas	48 horas
1	Orégano	0.50 ug/ml	7,24	7,24
2	Ácido fórmico	2.5 %	8,75	8,75
3	Formiato de K	4 %	9,70	9,70
4	Oseanah	Sin Tween	13,25	13,25
5	Oseanah	Con Tween	11,43	11,43
6	Tween 80	99%	-	-

Figura 2:

Diámetro de los halos de inhibición en el antibiograma



Nota: **Placa A:** 1. Ácido fórmico, 2. Formiato de K, 3. Orégano, 4. Oseanah sin tween 80. **Placa B:** 9. Oseanah sin tween 80, 11. Oseanah con tween 80, 0: tween 80.

Tabla 4:*ANOVA de un factor intergrupos del diámetro de los tratamientos*

ANOVA					
Diámetro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	319,302	5	63,860	1734,026	,000
Dentro de grupos	,442	12	,037		
Total	319,744	17			

Después de llevar a cabo la prueba de análisis de varianza (ANOVA), reflejó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos estudiados, ya que valor de p ($1,0204 \times 10^{-16}$) es menor que α .

Tabla 5:*Análisis de los subconjuntos homogéneas de medias en ANOVA*

En la tabla 5 se evidencia que las medias son menores que el nivel de significancia (>0.05)

y

Diámetro

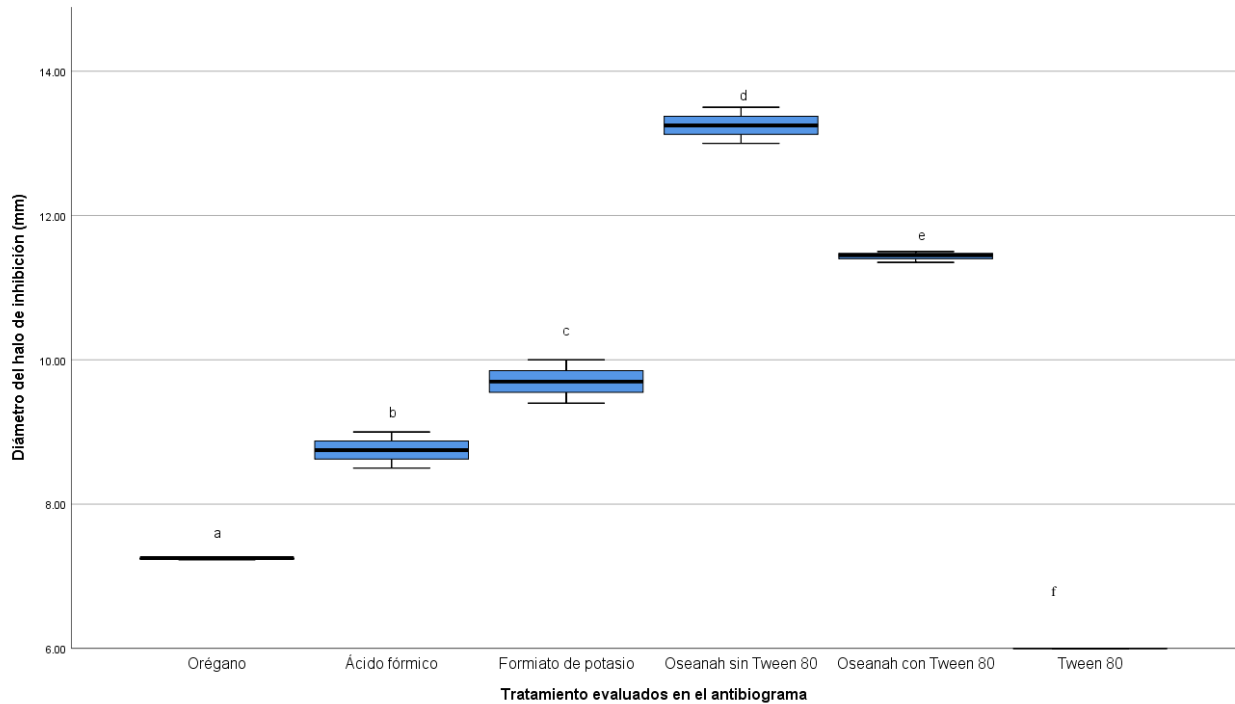
esto

HSD Tukey ^a	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
	Tween 80	3	,0000					
	Orégano	3		7,2433				
	Ácido fórmico	3			8,7500			
	Formiato de potasio	3				9,7000		
	Oseanah con Tween 80	3					11,4333	
	Oseanah sin Tween 80	3						13,2500
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

implica que existe diferencia significativa entre los tratamientos: Tween 80 (0 mm), orégano (7,24 mm), ácido fórmico (8,75 mm), formiato de potasio (9,70 mm), oseanah con Tween 80 (11,43 mm) y oseanah sin Tween 80 (13,25 mm). Además, se destaca el efecto sinérgico de los compuestos al evaluarlos en conjunto. En el gráfico 1 se da un mayor enfoque de los tratamientos valorados.

Gráfico 1

Diagrama de cajas simple de diámetro por tratamiento



Dentro de la acuicultura es fundamental realizar una prueba de antibiograma debido a que permite determinar la sensibilidad de microorganismos bacterianos frente a ácidos orgánicos y fitobióticos. En cuanto a los resultados obtenidos, el orégano (0.50 ug/mL) presentó un halo de inhibición de 7.24 mm, lo cual coinciden con Aguirre (2021) quién trabajó con la extracción del aceite de orégano a una concentración del 100 % frente cepas de *Vibrio* spp. (HP2-V, HP4-V1, Im-Alg, Im-Tum) y se evidenció un halo de 8.4 a 14 mm. Morales Covarrubias *et al.* (2018) trabajó con infusión de hojas de orégano para demostrar su efecto inhibitorio en vibrios describiendo un halo de inhibición de 9 y 17 mm, resultados con hallazgos similares al de la presente investigación.

Paredes *et al.* (2007) también obtienen resultados semejantes, trabajando con diferentes cepas de *Vibrio* spp (HP2-V HP4-V1 CD13 CD14), a una concentración del 100 % reflejando un halo de inhibición de 8.4 a 14 mm, quién además argumenta que la diferencia de diámetro de halos de inhibición generalmente se debe a la especie de orégano con la que se está trabajando ya que sus niveles en compuestos bioactivos variarán acorde a la especie (timol y carvacrol), condiciones climáticas, método de extracción y medio de dilución.

Por otro lado, se hizo uso de Tween 80 ya que este producto funciona como emulsificante, lo que favorece su mezcla con otros componentes. López (2018) corrobora que su aplicación no tiene efecto frente a bacterias en un antibiograma y expuso que su aplicación no tiene efecto inhibitorio, por lo que su uso mejora la solubilidad sin afectar la inhibición del extracto de orégano.

Wing-Keong & Chik-Boon (2016) exponen que los ácidos orgánicos componen una variedad de sustancias producto de la fermentación de carbohidratos, señalados por tener al menos un grupo ácido carboxílico. En esta investigación se trabajó con ácido fórmico (2.5%) mediante antibiograma y se obtuvo un halo de 8,75 mm. Adicionalmente entre otros métodos evaluados, se destaca que existen técnicas más precisos y sensibles que permiten realizar una medición directa de la viabilidad bacteriana al cuantificar la formación de formazán. Mine & Boopathy (2011) estudiaron la capacidad inhibitoria del ácido fórmico ante *V. harveyi* determinando su absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, por medio de un espectrofotómetro señalando que se logra una reducción completa de los vibrios a una concentración igual o superior de 0,035%. Adams & Boopathy (2013) continuaron con la investigación ahora usando 5 cepas de vibrios (*V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*) obteniendo resultados similares a sus primeras investigaciones. De esta manera se destaca que *in vitro* la aplicación de ácido fórmico a bajas concentraciones medidas mediante espectrofotometría (0.035%) y mediante antibiograma (2.5%) tienen efectos positivos en la reducción de bacterias patógenas.

En este trabajo al comparar los halos de inhibición producidos por nuestros tratamientos con otros ácidos orgánicos se pudo evidenciar que existe sinergia al ser mezclado con un fitobiótico, denotando potencialmente un halo de inhibición entre 11,43 y 13,25 mm en comparación a la aplicación individual de cada producto.

Estos resultados son similares a los que obtuvo Reyes (2017) quién realizó una investigación para evidenciar que existe efecto sinérgico entre la combinación de ácidos orgánicos y fitoquímicos, demostrando tener efecto inhibitorio *in vitro* frente a *V. parahaemolyticus* (AHPND⁺) exponiendo a los ácidos orgánicos con CI de 11.23 a 100 mM y de fitoquímicos de 4.18 y 10 % (v/v). Además, añadió que la efectividad del ácido acético con fitoquímicos presentó una mayor actividad inhibitoria de 94.11 % con un valor de CI de 0.98-10 %, finalmente argumenta que su combinación es una alternativa para disminuir la aplicación de antibióticos.

Así mismo, Lin, Labbe, & Shetty (2005) observaron los efectos de una mezcla de extracto de orégano, arándano y ácido láctico, en la inhibición de *V. parahaemolyticus*, donde se presencié un efecto sinérgico cuando la concentración fenólica de los extractos totales fue de 0,1 mg/mL de 50%:50% p/p con el ácido láctico a un pH 6, denotando un halo de inhibición de 20 mm.

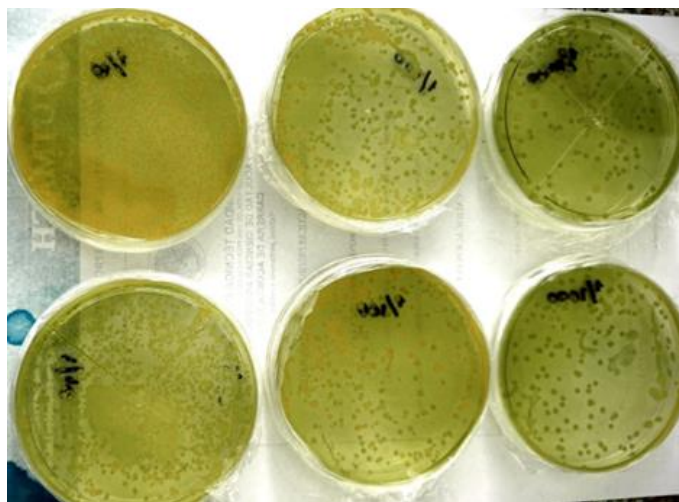
Estos estudios demuestran que la evaluación de la sinergia entre ácidos orgánicos y extractos de plantas tiene efectividad, corroborando que su potencial es mucho mayor cuando se evalúa en conjunto que por separado frente a bacterias patógenas, siendo esta una alternativa favorable y menos invasiva para el medioambiente.

3.2. Evaluación *in vivo* de la sinergia entre ácidos orgánicos y fitobióticos

Para comenzar con el experimento *in vivo* se realizó un análisis bacteriológico a los camarones, evidenciando una carga total de *Vibrio* de 1.5×10^6 ufc/gr Hp. Según los resultados obtenidos, se asume que los organismos tenían una elevada cantidad de bacterias. De acuerdo con los datos reportados por Gonzáles, Prado, & Quiñonez (2003) una cantidad de colonias verdes > 50 % (1×10^6 ufc) es considerada preocupante por lo que se deberían tomar acciones para evitar pérdidas en el cultivo.

Figura 3:

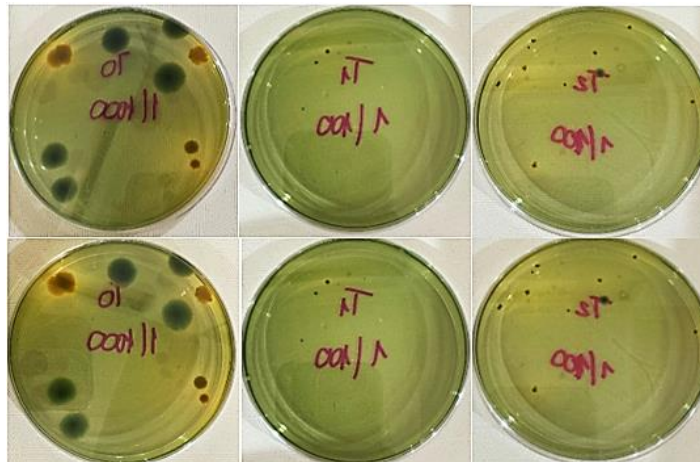
Bacteriología inicial del hepatopáncreas de L. vannamei



En la figura 3 refleja la concentración de bacterias del hepatopáncreas realizando diluciones seriadas por triplicado. Se tomó las placas de la dilución 1×10^{1000} reflejando una cantidad de bacterias de 1.5×10^6 UFC/gr Hp de *L. vannamei*.

Figura 4:

Bacteriología final del hepatopáncreas de L. vannamei



En la figura 4 se refleja la concentración de bacterias del hepatopáncreas realizando diluciones seriadas por triplicado para los tratamientos **T0** (sin dosificación), **T1** (Oseanah sin Tween 80) y **T2** (Oseanah con Tween 80) después de un periodo de 10 días.

Tabla 6:

ANOVA de un factor intergrupos del conteo de bacterias

ANOVA					
conteo bacterias	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	18092666666.667	2	9046333333.333	4016.626	.000
Dentro de grupos	13513333.333	6	2252222.222		
Total	18106180000.000	8			

Una vez ejecutada la prueba de análisis de varianza (ANOVA), se observó valor significancia de 4.1573×10^{-10} . Este valor indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados, ya que el valor de p es menor al umbral (0.05) indicando que los animales alimentados con **Oseanah sin tween 80** mostraron mayor reducción de la carga bacteriana del patógeno

Tabla 7

Analisis de los subconjuntos homegeneas de medias en ANOVA

conteo bacterias

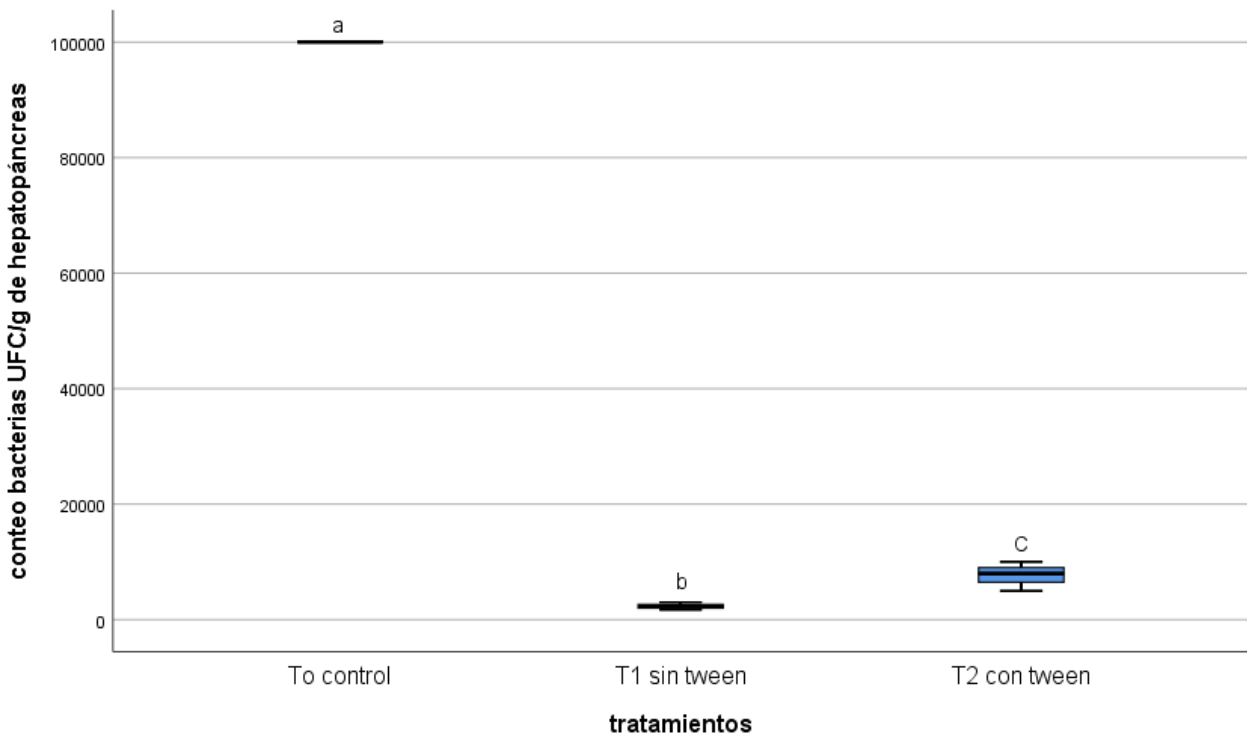
HSD Tukey^a

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
T1 sin tween	3	2333.33		
T2 con tween	3		7666.67	
To control	3			100000.00
Sig.		1.000	1.000	1.000

En la tabla 7 se evidencia que las medias son menores que el nivel de significancia (>0.05) lo que implica que existe diferencia significativa entre los tratamientos, demostrando una reducción de bacterias entre los tratamientos: **T1** (2333,33), **T2** (7666,67), **T0** (100000). En el gráfico 2 se da un mayor enfoque de los tratamientos analizados.

Gráfico 2:

Diagrama de cajas simples de los tratamientos evaluados in vivo



Con base en los resultados representados en el gráfico 2, se evidencia que existe una reducción del 97,67 % y 92,33% en la carga bacteriana de vibrios en los tratamientos 1 y 2 con respecto al control, debido a que el mecanismo de acción de cada producto es potencializado cuando se produce la sinergia entre estas dos sustancias, lo que concuerda con Reyes (2017) quién expone que los polifenoles mezclados con ácidos orgánicos son beneficiosos ya que producen una mayor alteración en la membrana celular de las bacterias.

Comparando la carga inicial de vibrios (1.5×10^6 ufc/gr Hp) con el control T0 (1×10^5 ufc/gr Hp) luego de 10 días, se destaca que los recambios de agua también presentaron influencia en la proliferación de las bacterias del 6.67 % (Piñeros-Roldan *et al.*, 2020). A su vez, al realizar la comparación entre los tres tratamientos se enfatiza que el uso **Oseanah sin Tween 80** incide de manera efectiva en la disminución total de bacterias presentes en el hepatopáncreas.

Los resultados obtenidos en este estudio son semejantes a He *et al.* (2017) quienes trabajaron con aceites esenciales (timol, 1,7 %; vainillina, 1,0 %) y ácidos orgánicos (cítrico 25 %, sórbico 16,7 %) en el cultivo de *L. vannamei*, en donde se determinó que $0,3 \text{ g kg}^{-1}$ de dieta presenta efectos positivos mejorando el sistema inmune específico, la microflora intestinal y favorece la resistencia ante *V. parahaemolyticus* reflejando una reducción en el conteo de bacterias de este género.

De igual manera, Lin, Labbe, & Shetty (2005) trabajaron con una mezcla de extracto de orégano y arándano, junto con ácido láctico, en la inhibición de *V. parahaemolyticus* en camarones, donde existió una reacción sinérgica cuando la concentración fenólica de los extractos aplicados en 50%:50% p/p con ácido láctico a pH 6, presentaron una reducción total de *V. parahaemolyticus*. Adicionalmente, señalan que las capacidades inhibitorias del ácido láctico mejora con una mezcla de extractos fitoquímicos, ya que estas sustancias causan daños letales en la membrana celular.

La efectividad de la sinergia entre ácidos orgánicos con aceites esenciales, se puede evidenciar no solamente en el cultivo de camarón, sino en otras especies como peces, Huyben *et al.* (2021) evaluó dos tratamientos T0 (sólo balanceado) y T1 (300 mg/kg de una mezcla microencapsulada de AE + AO) y expuso que su combinación influye de manera benéfica mejorando la flora intestinal y la morfología del intestino, además describieron que en sus pruebas finales notaron un aumento en las vellosidades del intestino proximal, ausencia de apoptosis, edema e inflamación intestinal y además hubo reducción de patógenos específicos.

A partir del análisis de los resultados obtenidos *in vivo* y las discusiones evaluadas se puede sugerir que la aplicación de la combinación de estas sustancias produce una reducción de la carga de bacterias en *L. vanmamei*. Además, es importante considerar que las concentraciones a utilizar son una variable importante ya que al tratarse de seres vivos se debe prever que el producto que se aplica no presente efectos negativos en los animales de cultivo, tal como lo expone Armijos y Vacacela (2022) quienes señalan que una alta concentración de extracto de orégano (>50 ug/mL) produce una disminución en el conteo total de hemocitos.

IV. CONCLUSIÓN

- La formulación realizada para obtener la sinergia (Oseanah) proporciona resultados con efecto inhibitorios frente a vibrios.
- El producto elaborado (Oseanah) con y sin Tween mostró efecto inhibitorio tanto *in vitro*, como *in vivo* frente a *Vibrio* spp.
- El tratamiento sin Tween dio mejores resultados para la reducción de vibrios después de 10 días de su aplicación en el alimento.
- Para concluir, se destaca que la aplicación de mezclas de ácidos orgánicos con fitobióticos, ha demostrado ser una opción eficaz y sostenible para inhibir la proliferación de vibrios en la producción acuícola. Estos compuestos actúan de manera sinérgica, afectando múltiples procesos metabólicos y de virulencia de estos patógenos, lo que permite minimizar significativamente el uso de antibióticos. Esto representa un beneficio crucial para abordar los desafíos de la resistencia antimicrobiana, mejorar la inocuidad alimentaria y reducir el impacto negativo sobre el ecosistema acuático, contribuyendo así a la sostenibilidad de la industria acuícola.

V. RECOMENDACIONES

- ✓ Indagar el efecto del producto en otros estadios larvales ajustando las dosis adecuadas para asegurar su eficiencia.
- ✓ Las dosis utilizadas en esta investigación son para que sea aplicada en el alimento, por tanto, se debe buscar la dosis ideal para aplicarlo en otros recursos como el agua.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D., & Boopathy, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, 68(6), 1017-1021. doi:10.2478/s11756-013-0251-x
- Aguirre, L., Sanchez-Suarez, H., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Resistencia antibiotica en *Vibrio* spp aislados de camaron blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 32(4). doi:http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386
- Arias, E., & Torres, K. (2019). Analisis de las exportaciones de camaron antes y despues de la firma del acuerdo multipartes entre Ecuador y la Union Europea. *Revista Observatorio de la Economia Latinoamericana*, 1696(8352), 1-10. Obtenido de <https://www.eumed.net/rev/oel/2019/03/exportaciones-camaron.html>
- Armijos, C., & Vacacela, L. (2022). *Efecto del aceite esencial de orégano (origanum vulgare) sobre la disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón Penaeus Vannamei*. [tesis de grado, Universidad Técnica de Machala]. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/21046>
- Ashaari, N., Rahim, M., Sabri, S., Lai, K., Song, A., Abdul, R., . . . Ong, A. (2020). Functional characterization of a new terpene synthase from *Plectranthus amboinicus*. *PLoS ONE*, 15(7). doi:6. <https://doi.org/10.1371/>
- Baker-Austin, C., & Oliver, J. (2018). *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environmental Microbiology*, 20(2), 423–430. doi:<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13955>
- Barrantes, E. (2023). Efectos de la bacteria patógena *Vibrio parahaemolyticus* en camarones (*Litopenaeus vannamei*) de cultivo y en la salud del consumidor. *Revista Pensamiento Actual*, 23(40), 15-38. doi:10.15517/PA.V23I40.55171
- Campa-Córdova, A., Valenzuela-Chávez, J., García-Armenta, J., Medina, D., Licona-Jain, A., Angulo-Valadez, C., . . . Mejía-Ruíz, C. (2017). *Uso profiláctico de aditivos inmunoestimulantes en el cultivo del camarón blanco, Litopenaeus vannamei*. Obtenido de Avances En Nutrición Acuicola.: <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/28>
- Carbay, Y., & Sorroza, L. (2019). Uso de extracto alcohólico de las plantas tomillo (*Thymus vulgaris*), guayaba (*Psidium guajava*) y eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) frente a la vibriosis en acuicultura. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2(3), 48–55. Obtenido de <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/180/239>
- Carhuallanqui, A., Salazar, M., & Ramos, D. (2020). Efecto antimicrobiano de aceite esencial de *Oregano* frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de*

- Investigaciones Altoandinas-Journal of High Andean Research*, 22(1), 25-33.
doi:<http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- Casanova-Nodarse, E., Rodeiro, I., & Ponce, L. (2023). Potencialidades como antivirales de compuestos de origen marino: una revision. *Revista de Investigaciones Marinas*, 42(2), 67-92. Obtenido de <https://doi.org/10.5281/zenodo.7407450>
- Casto-Rebollo, C. (2013). Origenes del acido formico. *Revista Quimica de la Universidad Pablo de Olavide*, 1(10), 23-24. Obtenido de https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqla/documentos/Numero_10_completo.pdf
- Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2024). *Resumen de compuestos de PubChem para CID 2735122, formato de potasio*. Recuperado el 23 de enero de 2024, de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Potassium-formate>
- Chancay-Paco, G., Avila-Vasquez, M., & Conforme-Soledispa, D. (2021). Comportamiento del sector camaronero como determinante en la generacion de empleo en el canton Jama. *Revista Polo del Conocimiento*, 6(9), 1897-1914. doi:<http://dx.doi.org/10.23857/pc.v6i9.3146>
- Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 3(2), 27-33. Obtenido de <https://www.academia.edu/download/53205059/2297.pdf>
- Chowdhury, M., Song, H., Liu, Y., Bonud, J., & Dong, X. (2021). Effects of Microencapsulated Organic Acid and Their Salts on Growth Performance, Immunity, and Disease Resistance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Sustainability*, 13(14), 7791. doi:<https://doi.org/10.3390/su13147791>
- CNA. (2023). *Camaron-Reporte de exportaciones Ecuatorianas totales*. Obtenido de <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Dickerson, J., Gooch-Moore, J., Jacobs, J., & Mott, J. (2021). Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolates from clinical and environmental sources. *Molecular and Cellular Probes*, 56(101695), 101695. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101695>
- Evangelista-Martinez, Z., Reyes-Vazquez, N., & Rodriguez-Buenfil, I. (2018). Antimicrobial evaluation of plant essential oils against pathogenic microorganisms: In vitro study of oregano oil combined with conventional food preservatives. *Acta universitaria*, 28(4), 10-18. doi:10.15174/au.2018.1817
- Fernandez, F., & Alonso, G. (2009). Colera y *Vibrio cholerae*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*, 40(2), 50-69. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772009000200006

- Gamez-Bayardo, S., Espinoza-Plascencia, A., Jimenez-Edeza, M., Perez-Alvarez, A., Garcia-Galaz, A., & Bermudez-Almada, M. (2021). Estudio de caso: evaluacion y efecto del alimento con oxitetraciclina preparado industrialmente y con un procedimiento establecido en granja sobre el desarrollo del camaron *Penaeus vannamei* y su acumulacion en musculo y hepatopancreas. *Revista Especializada en Ciencias Quimico-Biologicas*, 24, 1-13. doi:<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.305>
- Gan, L., Zheng, J., Xu, W., Lin, J., Liu, J., Zhang, Y., . . . Liu, Y. (2022). Deciphering the virulent *Vibrio harveyi* causing spoilage in muscle of aquatic crustacean *Litopenaeus vannamei*. *Scientific Reports*, 12(16296). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-022-20565-1>
- Gómez, C., Carbay, Y., Sorroza, L., & Rivera, I. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibrios en sistema productivo de camaron (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2(3), 91-98. Obtenido de <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/188/246>
- González, J., Prado, P., & Quiñonez, D. (2003). *Técnicas de Bacteriología, Análisis en Fresco, Calidad de Agua y Buenas Prácticas de Manejo y Bioseguridad en Granjas Camaroneras*. Obtenido de CESAIN-Maricultura del Pacífico.
- Gracia-Valenzuela, M., Vergara-Jiménez, M., Baez-Flores, M., & Cabrera-Chavez, F. (2014). Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against vibrio bacteria in shrimps. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1367-1370. doi:<https://doi.org/10.2298/abs1404367g>
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Kai, C., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(1), 164–173. doi:10.1016/j.fsi.2017.09.007
- Hernández-Cabanyero, C., & Amaro, C. (2020). Phylogeny and life cycle of the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4133-4148. doi:<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15137>
- Huang, X., Lao, Y., Pan, Y., Chen, Y., Zhao, H., Gong, L., . . . Mo, C. (2021). Synergistic antimicrobial effectiveness of plant essential oil and its application in seafood preservation: A review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 307. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26020307>
- Huyben, D., Chiasson, M., Lumsden, J., Pham, P., & Kabir, M. (2021). Dietary Microencapsulated Blend of Organic Acids and Plant Essential Oils Affects Intestinal Morphology and Microbiome of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microorganisms*, 9(10), 2063. doi:doi.org/10.3390/microorganisms9102063

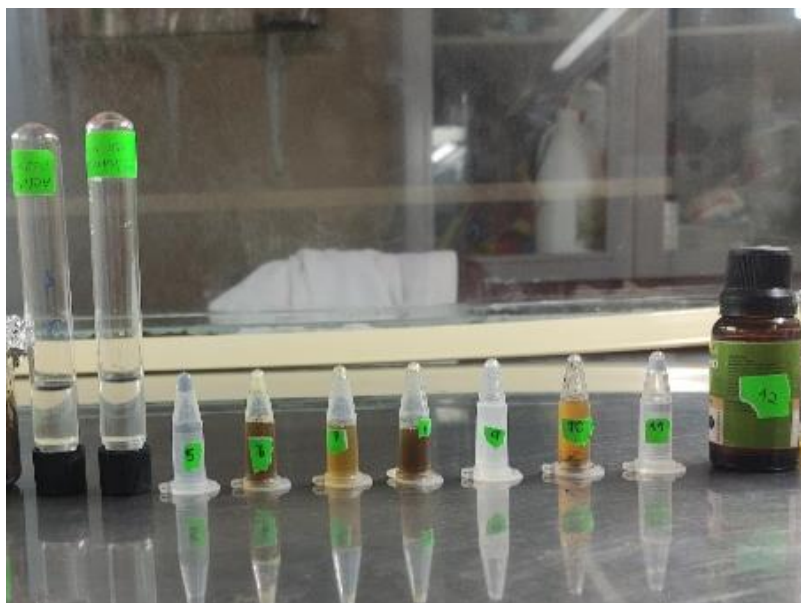
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12-15. doi:10.3389/fmicb.2012.00012.
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., & Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 222(1), 43-51. doi:https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.003
- 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.]. Obtenido de http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3106/licona_a%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Lin, Y., Labbe, R., & Shetty, K. (2005). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science & Emerging Technologies. IFSET: The Official Scientific Journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 6(4), 453-458. doi:10.1016/j.ifset.2005.04.002
- López, 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. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis%20130%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568.pdf>
- Lückstädt, C. (2020). Dietary potassium-diformate affects growth performance and survival rates of vannamei-shrimp in hatchery and grow-out in worldwide aquaculture. *Aquafeed*, 12(2), 48-50. Obtenido de https://issuu.com/aquafeed.com/docs/aquafeed_volume_12_issue_2
- Luo, K., Zhao, P., He, Y., Kang, S., & Shen, C. (2022). Antibacterial Effect of Oregano Essential Oil against *Vibrio vulnificus* and Its Mechanism. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(3), 403. doi:https://doi.org/10.3390/foods11030403
- Manandhar, S., Luitel, S., & Dahal, R. (2019). In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 1687(9686), 1-5. doi:10.1155/2019/1895340
- Martín, L., López, G., & Farnés, O. (2022). Sistema inmune de camarones peneidos de cultivo: una revisión. *Revista de Producción Animal*, 34(1), 127-153. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpa/v34n1/2224-7920-rpa-34-01-127.pdf>
- Mine, S., & Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current microbiology*, 63(1), 1-7. doi:10.1007/s00284-011-9932-2

- Ministerio de Acuicultura y Pesca. (2018). Obtenido de <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/08/MAP-SCI-2018-0001-A.pdf>
- Montánchez, I., & Kaberdin, V. (2020). *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Marine Environmental Research*, 154(104850), 104850. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104850>
- Morales-Covarrubias, M., Cuéllar-Anjel, J., Varela-Mejías, A., & Elizondo-Ovares, C. (2018). Shrimp Bacterial Infections in Latin America: A Review. *Asian Fisheries Science*, 1(31), 76-87. Obtenido de <https://doi.org/10.33997/j.afs.2018.31.S1.005>
- Muñoz, D. (2022). *Validación de estrategias profilácticas en larvicultura del camarón Penaeus vannamei en la provincia de Santa Elena, Mar Bravo*. Tesis de grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena, Repositorio upse. Obtenido de <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8074/1/UPSE-TBI-2022-0020.pdf>
- Newman, S. (2022). Una actualización sobre la vibriosis, la principal enfermedad bacteriana que enfrentan los camaroneros. *Global seafood alliance*, 511. Obtenido de <https://www.globalseafood.org/advocate/una-actualizacion-sobre-la-vibriosis-la-principal-enfermedad-bacteriana-que-enfrentan-los-camaroneros/>
- Paredes, M., Gastélum, M., Silva, R., & Nevárez-Moorillón, G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(3), 261 – 267. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/610/61003008.pdf>
- Peña-Navarro, N., Vargas-Cordero, R., & Varela-Mejías, A. (2013). Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*, 24(1), 133-147. Obtenido de https://www.mag.go.cr/rev_meso/v24n01_133.pdf
- Pérez-Chabela, M., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una revisión. *Hidrobiológica*, 30(1). doi:<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/Perez>
- Piñeros-Roldan, A., Gutiérrez-Espinosa, M., Lapa-Viana, M., & Coelho-Emerenciano, M. (2020). Aireación en la tecnología Biofloc (BTF): principios básicos, aplicaciones y perspectivas. *Revista politécnica*, 16(31), 29-40. doi:<https://doi.org/10.33571/rpolitec.v16n31a3>
- Reyes, G. (2017). *Efecto sinérgico antimicrobiano in vitro de ácidos orgánicos y fitoquímicos, frente a vibrios parahaemolyticus, potencialmente patógenos aislados de cultivos de camarón Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)*. [tesis de post-grado, Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C.]. Obtenido de https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/2096/1/reyes_g%20TESIS.pdf

- Rodriguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservacion de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170. doi:<http://dx.doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>
- Rombenso, A., Truong, H., & Simon, C. (2020). Dietary butyrate alone or in combination with succinate and fumarate improved survival, feed intake, growth and nutrient retention efficiency of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 528(735492), 735492. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735492>
- Saucedo-Uriarte, J., Honorio-Javes, C., Vallenás-Sánchez, Y., & Acuña-Leiva, A. (2020). Bacteriofagos: aliados para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura. Un primer punto de parte en la acuicultura ecológica. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(2), 107-121. doi:<https://doi.org/10.36610/j.jsars.2020.110200107>
- Sivakumar, M., Amirtharaj, K., Chrisolite, B., Sivasankar, P., & Subash, P. (2019). Dietary organic acids on growth, immune response, hepatopancreatic histopathology and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* against *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Biosciences*, 134, 13722 - 13729. doi:10.21203/rs.3.rs-2177311/v1
- Socarrás, D., Sánchez, A., & Gonzáles, O. (2019). Riesgo, vulnerabilidad e incertidumbre en la acuicultura. *Revista cubana de finanzas y precios*, 3(1), 102-113. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/304203408.pdf>
- Sorroza, L., Campoverde, M., & Santacruz-Reyes, R. (2017). Estudio preliminar de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *AquaTIC (Zaragoza)*, 0(49), 1-7. Obtenido de <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/285/303>
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Acosta, B., & Real, F. (2009). Uso de probióticos en Acuicultura. *Revista canaria de las ciencias veterinarias*, 6(7), 51. Obtenido de https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/12399/1/0280574_0006_0010.pdf
- Valenzuela, J., Vargas, C., Garcés, F., Grijalva, A., & Marcillo, R. (2020). Biocontrol of the vibriosis in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using organic acids in the feeding. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(5), 279-287. doi:<https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.104727>
- Varela, A., & Choc-Martinez, L. (2020). Tecnicas diagnosticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 31(3), 1609-9117. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>
- Varela, A., & Cuéllar-Anjel, J. (2020). Formación de esferoides en camarones penaeidos: Implicaciones patológicas y valor diagnóstico. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 2(2), 61-75. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8276623.pdf>

- Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 29(1), 01-14. doi:<https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Varela-Véliz, H., Elizalde, B., Solórzano, S., & Varela-Véliz, G. (2017). Exportacion de camaron de la provincia de el Oro en el contexto del tratado comercial con la Union Europea. *Revista Espacios*, 38(61), 24. Obtenido de <https://www.revistaespacios.com/a17v38n61/a17v38n61p24.pdf>
- Vega, F., Apolo, N., & Sotomayor, J. (2019). La productividad del sector camaronero en la provincia del Oro y su impacto al medio ambiente. *Revista científica de Agroecosistemas*, 7(1), 39-44. Obtenido de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/240/260>
- Wing-Keong, N., & Chik-Boon, K. (2016). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in aquaculture*, 9(4), 342-368. doi:10.1111/raq.12141
- Yowaphui, N., Rairat, T., & Chuchird, N. (2016). Effect of Formic Acid, β -Carotene and Vitamin E on Growth, Survival and Prevention to *Vibrio parahaemolyticus* in Rearing of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries and Environment*, 40(1), 1-14. Obtenido de <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/KFRB/10981699.pdf>
- Zapata, T. (2022). *Evaluación del efecto funcional antimicrobiano del extracto liofilizado de canela (Cinnamomum zeylanicum) como ingrediente de un recubrimiento comestible para piña (Ananas comosus) mínimamente procesada*. [Doctoral dissertation], Universidad Agraria del Ecuador. Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36556/1/IASA%20I-TIC-0017.pdf>
- Zhang, Q., Lin, L., & Ye, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13(1), 1-26. doi:<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhang, X., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2(231–245), 231–245. doi:<https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>

ANEXOS



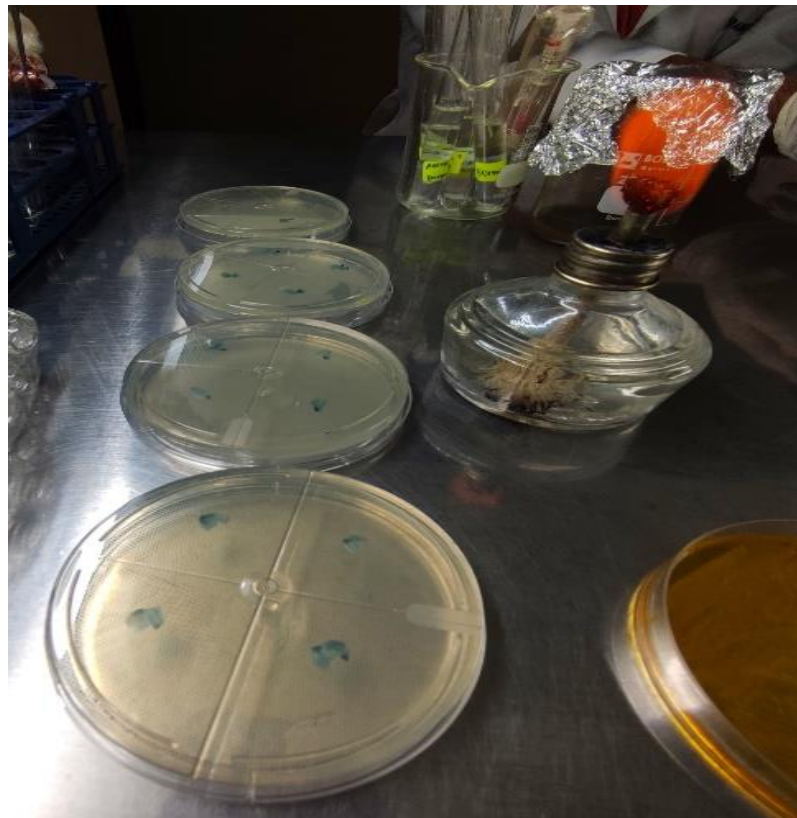
Anexo 1: Tratamientos evaluados para la elaboración del antibiograma.



Anexo 2: Ceba de Vibrios sp.



Anexo 3 : Elaboración del antibiograma



Anexo 4: Tratamientos evaluados en la prueba de sensibilidad (antibiograma)



Anexo 5: Recolección de agua y camarones en la camaronera San Alfonso ubicada en Barbones



Anexo 6: Traslado de los camarones a las instalaciones de la FCA



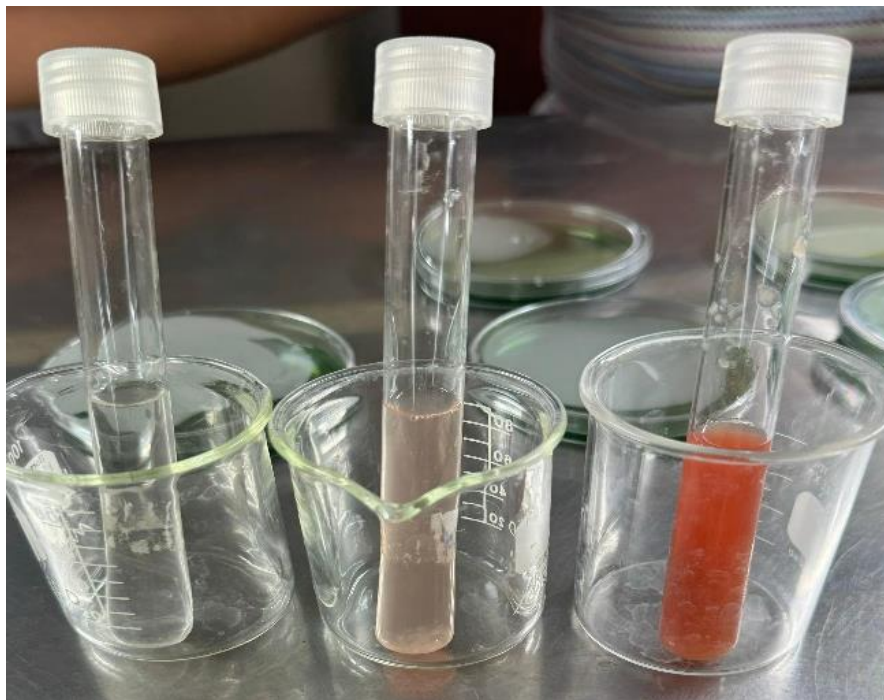
Anexo 7: Tanques usados como reservorio, aplicando aireación 24/7.



Anexo 8: Control y sifoneo de cada tratamiento



Anexo 9: Prueba de microbiología luego de dosificar Oseanah durante 10 días



Anexo 10: Diluciones seriadas del HP por triplicado



Anexo 11: Plaqueo de las diluciones seriadas por triplicado de cada tratamiento

Blue Aqua - Free Ammonia (mg/l)	
Temp	26.5 °C
pH	6.28
<i>i</i> TAN	0.010 mg/l
Calculate	
Free Ammonia	0,000 mg/l
Toxicity	Negligible

Anexo 13: Datos procesados en "Blue Aqua"