

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

Uso de aceites esenciales frente a antibióticos empleados en larvas de

*Anadara tuberculosa*

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

Presentado por:

Carolina Nicole Parra Guevara

Allison Ariana Paredes Sánchez

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

Año: 2022

## DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mis padres quienes se esforzaron tanto por darme la oportunidad de estudiar, a mis hermanos por acompañarme en este camino de aprendizaje y a mis maestros dentro y fuera de la institución por el conocimiento invaluable que transmitieron con una habilidad y dedicación digna de admirar.

Carolina Parra

El presente proyecto se lo dedico a mi familia por apoyarme en mi educación y acompañarme en cada logro alcanzado durante mi formación académica, a mis maestros por sus conocimientos y dedicación, y a mi mejor amigo y compañero de vida por su paciencia, confianza, motivación e impulso en mi carrera profesional.

Allison Paredes

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas por prestarnos sus instalaciones para realizar el presente proyecto. A los miembros del proyecto DIPSIMAR que nos permitieron trabajar con ellos y a nuestros tutores Félix Morales y Edgar Vivar por la guía proporcionada.

## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Allison Paredes Sánchez y Carolina Parra damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

*Allison Paredes A.*

---

Allison Paredes Sánchez

*Carolina Parra*

---

Carolina Parra Guevara

# EVALUADORES

**Diego Arturo Gallardo, Msc.**

---

PROFESOR DE LA MATERIA

**Félix Morales Ramos, PhD.**

---

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

La concha *Anadara tuberculosa* es la especie de molusco bivalvo más comercializada y consumida dentro del Ecuador aportando de 3,4 a 6,4 millones de USD al PIB. Es obtenida partir de la pesca en las zonas costeras de manglar provocando una reducción en su población generando la necesidad de producirla. Uno de los problemas que presenta en este proceso es la baja supervivencia de las larvas, la cual se ha intentado mejorar con el uso de antibióticos los cuales tienden a generar cepas multirresistentes peligrosas para la salud humana. Como alternativa se busca evaluar el efecto de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomun verum*), palo santo (*Bursera graveolens*) y orégano (*Origanum vulgare*) mediante bioensayos sobre las primeras etapas larvarias para la disminución de su mortalidad esperando un efecto positivo. Para esto se recolectaron 100 reproductores de los alrededores de la isla Puna que fueron inducidos al desove, las larvas obtenidas fueron distribuidas en envases con los aceites esenciales a concentraciones de 0,04, 0,4 y 0,8 ppm, además de los antibióticos florfenicol y oxitetraciclina a 2 y 4 ppm respectivamente. Se pudo observar que el tratamiento de palo santo a 0,8 ppm difirió significativamente del control y fue similar al florfenicol, además de que todos los tratamientos fueron efectivos para reducir la carga bacteriana presente en el bioensayo. La efectividad del AE de canela parece estar influenciada por el tipo de organismo por lo que es necesario realizar estudios con una concentración diferente. Por otra parte, el AE de orégano posiblemente no tenga efecto en la supervivencia de las larvas de *A. tuberculosa*.

**Palabras Clave:** larva D, bivalvos, concha prieta, producción

## **ABSTRACT**

*The “Concha” Anadara tuberculosa is the most commercialized and consumed species of bivalve mollusc in Ecuador, contributing from 3.4 to 6.4 million USD to GDP. It is obtained from fishing in coastal mangrove areas, causing a reduction in its population, generating the need to produce it. One of the problems that this process presents is the low survival of the larvae, which has been tried to improve with the use of antibiotics, which tend to generate multi-resistant strains that are dangerous for human health. As an alternative, the aim is to evaluate the effect of the essential oils of cinnamon (*Cinnamomum verum*), palo santo (*Bursera graveolens*) and oregano (*Origanum vulgare*) through bioassays on the first larval stages to decrease their mortality, hoping for a positive effect. For this, 100 broodstock were collected from the surroundings of Puna Island and induced to spawn, the larvae obtained were distributed in containers with essential oils at concentrations of 0.04, 0.4 and 0.8 ppm, in addition to antibiotics. florfenicol and oxytetracycline at 2 and 4 ppm respectively. It was observed that the palo santo treatment at 0.8 ppm differed significantly from the control but no from florfenicol, in addition to all treatments being effective in reducing the bacterial load present in the bioassay. The effectiveness of cinnamon EO seems to be influenced by the type of organism, so it is necessary to carry out studies with a different concentration. On the other hand, oregano EO may not influence the survival of *A. tuberculosa* larvae.*

*Keywords: larva D, bivalves, concha prieta, production*

# ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	V
RESUMEN.....	VI
<i>ABSTRACT</i> .....	VII
ÍNDICE GENERAL .....	VIII
ABREVIATURAS.....	X
SIMBOLOGÍA.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema .....	1
1.2 Justificación del problema .....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General .....	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
1.4 Marco teórico.....	4
1.4.1 Ubicación taxonómica de la especie .....	4
1.4.2 Distribución geográfica .....	4
1.4.3 Hábitat .....	6
1.4.4 Ciclo de reproducción .....	6
1.4.5 Principales patógenos en moluscos bivalvos de interés en Acuicultura .....	7
1.4.6 Principales antibióticos de uso acuícola .....	8
1.4.7 Generalidades de los aceites esenciales y su uso en la acuicultura.....	9
CAPÍTULO 2.....	11
2. Metodología.....	11
2.1 Recolecta de reproductores .....	11
2.2 Obtención de larvas.....	12
2.3 Selección de aceites esenciales.....	12
2.4 Desarrollo experimental.....	12
2.5 Análisis microbiológico .....	13
2.6 Análisis estadístico .....	13
CAPÍTULO 3.....	15

3. Resultados y análisis.....	15
CAPÍTULO 4.....	23
4. Conclusiones Y Recomendaciones.....	23
4.1 Conclusiones.....	23
4.2 Recomendaciones.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24

## **ABREVIATURAS**

AE Aceites Esenciales

AMF Agua de Mar Filtrada

## SIMBOLOGÍA

ppm	Partes Por Millón
mg	Miligramo
µg	Microgramos
ml	Mililitros
l	Litros

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribución geográfica de <i>A. tuberculosa</i> .....	5
Figura 1.2 Distribución de <i>A. tuberculosa</i> en Ecuador.....	5
Figura 1.3 Hábitat de la especie <i>A. tuberculosa</i> .....	6
Figura 1.4 Ciclo reproductivo de <i>A. tuberculosa</i> .....	7
Figura 2.1 Zona de recolección de <i>A. tuberculosa</i> en la Isla Puná, Guayas. ....	11
Figura 3.1 Representación del ANOVA con comparación entre medias para los distintos periodos de medición. ....	15
Figura. 3.2. Gráfico de barras de la supervivencia promedio para cada tratamiento.....	17
Figura 3.3 Diagrama de dispersión de las bacterias y vibrios totales a las 24 y 96 horas de acuerdo con el porcentaje de supervivencia.....	18
Figura 3.4 Recuento total de bacterias marinas heterótrofas expresados como log de UFC/mL por cada tratamiento expresado en ppm.....	21
Figura 3.5 Recuento de Vibrios totales expresados como log de UFC/mL por cada tratamiento expresado en ppm.....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Promedio de supervivencia para cada periodo de tiempo. ....	15
Tabla 3.2. Media de la supervivencia promedio observada en cada tratamiento. ....	16
Tabla 3.3 Recuento bacteriano expresado en UFC/mL por tratamiento a las 24 horas.	19
Tabla 3.4 Recuento bacteriano expresado en UFC/mL por tratamiento a las 96 horas.	20

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La concha *Anadara tuberculosa* es la especie de molusco bivalvo más comercializada y consumida dentro del Ecuador. También conocida comúnmente como concha prieta, esta es obtenida casi en su totalidad a partir de la pesca en las zonas costeras de manglar. El interés en su investigación y producción se ha acrecentado recientemente lo que ha permitido la identificación de los posibles factores de riesgo en el cultivo de esta especie. La mortalidad temprana de las larvas es una problemática ya mencionada entre las pocas organizaciones que se dedican a su producción, ya sea para su estudio o comercialización, y está relacionada con la exposición a patógenos. En la acuicultura tradicional las medidas correctivas empleadas para casos similares están ligadas al uso de antibióticos debido a que por años han demostrado disminuir la presencia de dichos patógenos generando buenos resultados económicos. Sin embargo, es de conocimiento global que el uso prolongado de los mismos puede resultar en la pérdida de efectividad y el desarrollo de cepas multirresistentes. Una de las alternativas evidenciadas son los aceites esenciales (AE) que no generan dicha resistencia microbiana y han sido probados en múltiples tipos cultivos acuícolas.

### 1.1 Descripción del problema

Se estima que la supervivencia de semillas de *A. tuberculosa* en cautiverio puede oscilar entre el 23% y 30% (Rodríguez-Pesantes, Reyes y otros, 2021). Marshall y otros (2010) recopilan la supervivencia mostrada en múltiples estudios para *Crassostrea gigas*, esta alcanza el 88 % aunque las densidades en las que se las cultiva son sumamente bajas (5 larvas/ml) en comparación a los niveles requeridos para producción. Adaptar al cultivo a una especie silvestre puede presentar una gran cantidad de dificultades. Se sabe que, los organismos bivalvos son filtradores por lo que son capaces de acumular bacterias como vibrios o pseudomonas que son peligrosas para sus juveniles ya que pueden transmitirse de manera vertical incluso cuando se mantiene la asepsia durante todo el proceso de obtención de larvas (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans, 2008).

Durante el cultivo, la presencia de materia orgánica generada con la alimentación y/o la mala limpieza de los reproductores luego de la colecta puede aumentar la carga bacteriana (Miranda-Baeza, Orozco-Medina y otros, 2015), siendo este el principal factor de mortalidad en las larvas durante la fase final del cultivo. Además, la proliferación bacteriana puede verse incrementada por la calidad de agua usada en los laboratorios de producción (Retamales, Panta-Vélez, & Vélez-Cuenca, 2014), exponiendo a los cultivos a brotes de enfermedades infecciosas que generan pérdidas productivas y por ende económicas para las empresas que cultivan moluscos, y que en muchas ocasiones se debe a la falta de medidas preventivas de contagio (Diringer, y otros, 2019).

Para la acuicultura es común el uso de antibióticos cuando se presenta un aumento en la carga bacteriana (Cabello, 2004). Sin embargo, dichas bacterias tienen la capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos mediante múltiples mecanismos como es el caso de la producción de enzimas que alteran proteínas dianas del antibiótico, esto puede verse potenciado por la transferencia horizontal de genes (Fernández, López y otros, 2003). Uno de los mecanismos para evitar dicha transferencia es la inhibición del “quorum sensing” (Cárdenas, Castillo y otros, 2018), la cual se puede dar con el uso de compuestos activos presentes en los aceites esenciales (Dominguez-Borbor, 2020). Un ejemplo de estos, son los terpenos, hidrocarburos de 5 átomos de carbono, quienes pueden inhibir la absorción de sustrato por parte de las bacterias o el transporte de electrones (Tassou, y otros, 2000; Randrianarivelo, y otros, 2010).

## **1.2 Justificación del problema**

La especie *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) es el bivalvo de mayor interés comercial de los manglares ecuatorianos (MacKenzie y Clyde, 2001). Se estima una producción anual de 3,4 millones de unidades al año, aportando de 3,4 a 6,4 millones de USD al PIB del Ecuador (Prado-Carpio y otros, 2020). Su pesca es una fuente de sustento alimenticio, económico y laboral para miles de familias (MacKenzie y Clyde, 2001). En Ecuador es llevada a cabo en los ecosistemas de manglar ubicados en las provincias costeras (Vera y otros, 2018), en lugares como Puerto del Morro, Puerto Bolívar, Puerto Hualtaco, entre otros (Mora y Moreno,

2008). Según indica Mora y colaboradores (2010), la obtención a través de la recolección ha sufrido una severa caída en los últimos años, lo cual es un indicativo de la reducción de la población de esta especie debido a la sobrepesca. Una de las medidas planteadas es el impulso de la producción, la cual fue lenta en sus inicios en el país. La acuicultura de bivalvos no fue llevada a cabo en Ecuador sino hasta los años 90 con la ostra *Crassostrea gigas* seguida por *Argopecten ventricosus* pero existía poca información acerca de la especie *A. tuberculosa* (Álvarez y otros, 2008). Sin embargo, en los últimos años se ha visto un aumento en el número de publicaciones referente a su producción y manejo, al igual que el surgimiento de proyectos destinados al remplazo de pesca por cultivo. En varios de estos proyectos se ve la necesidad de disminuir la mortalidad anteriormente descrita con los antibióticos los cuales pueden generar cepas multirresistentes capaces de infectar a la población humana (Santiago, Espinoza y otros, 2009). Desde los 90 existen prohibiciones en la Unión Europea acerca del uso de ciertos antibióticos tales como la bacitracina o avaparicina provocando que se empleen medicamentos terapéuticos similares a los empleados en humanos aumentando el riesgo para la salud (Casewell, Friis y otros, 2003).

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomun verum*), palo santo (*Bursera graveolens*) y orégano (*Origanum vulgare*) mediante bioensayos sobre las primeras etapas larvianas del molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* para la disminución de su mortalidad.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar las concentraciones de los AE estableciendo las dosis apropiadas en el bioensayo.
2. Correlacionar la carga microbiana presente en el experimento con la mortalidad de larvas observada para cada tratamiento empleado.
3. Comparar la efectividad de los AE frente a los antibióticos como controladores de las infecciones en el cultivo.
4. Identificar la dosis adecuada de los AE que disminuyan significativamente la mortalidad de las larvas de la especie de interés.

## 1.4 Marco teórico

*Anadara tuberculosa* conocida comúnmente como ‘concha prieta’, ‘pata de mula’ o ‘concha negra’, es una de las especies representativas del ecosistema de manglar cuya comercialización a nivel nacional se ha intensificado. Por ello, varias investigaciones se han dedicado a estudiar la producción de semilla en condiciones de laboratorio con fines de repoblamiento y cultivo masivo debido al bajo costo productivo (Azul, 2014).

### 1.4.1 Ubicación taxonómica de la especie

Phyllum	Mollusca (Cuvier, 1797)
Clase	Bivalvia (Linnaeus, 1758)
Orden	Arcoida (Stoliczka, 1871)
Familia	Arcidae (Lamarck, 1809)
Género	Anadara (Gray, 1847)
Especie	<i>Anadara tuberculosa</i> (Sowerbi, 1833)

### 1.4.2 Distribución geográfica

La distribución de la concha prieta en el Océano Pacífico comprende desde el Lago Ballenas en Baja California, México hasta la bahía de Tumbes, Perú (Keen, 1971). En Ecuador, este bivalvo se ubica en todo el perfil costanero desde la provincia de Esmeraldas hasta la provincia del Oro (Moreno y Bonilla, 2019).

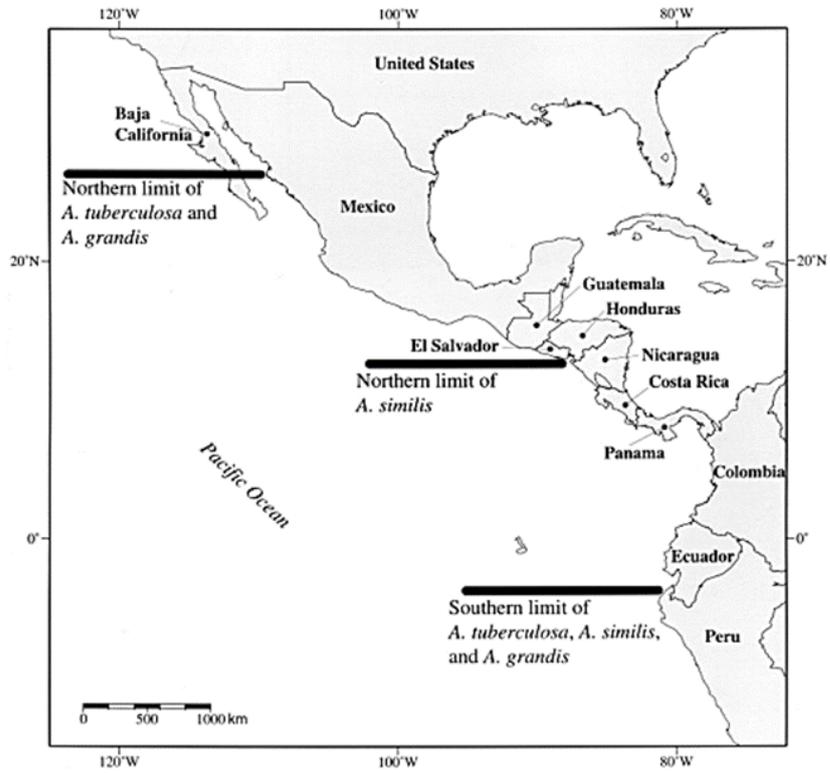


Figura 1.1 Distribución geográfica de *A. tuberculosa*.  
(Mackenzie & Clyde, 2001)

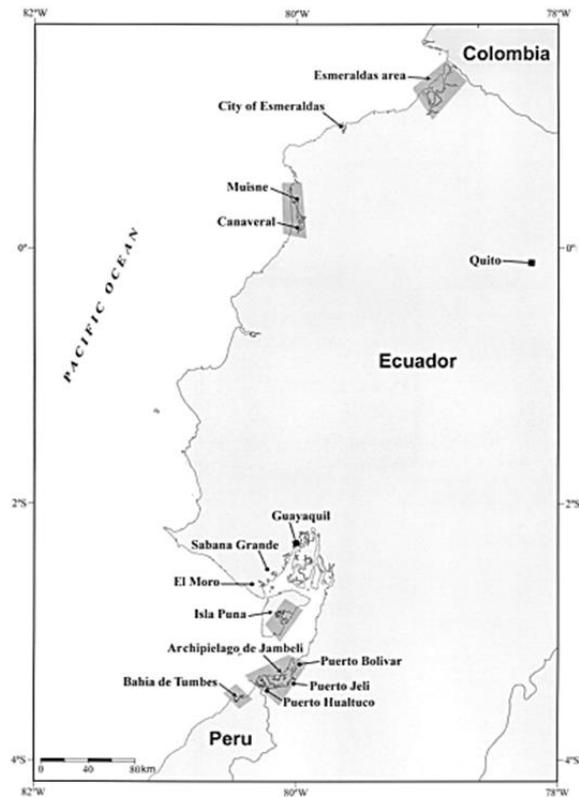


Figura 1.2 Distribución de *A. tuberculosa* en Ecuador.  
(Mackenzie & Clyde, 2001)

### 1.4.3 Hábitat

En su fase adulta, *A. tuberculosa* vive enterrada en el sustrato fangoso del bosque de manglar, siempre asociada a las raíces del mangle *Rhizophora spp.* en la zona intermareal, rara vez se la encuentra semienterrada o expuesta en la zona meso litoral medial inferior. Se encuentra en ambientes influenciados por ciclos de mareas y salinidades mayores a 12 ups. Además, comparte su hábitat con otras especies como *Anadara similis*, *Protothaca grata* y *Prototha aspérrima* (García, y otros, 2008; Ramos, 2018).

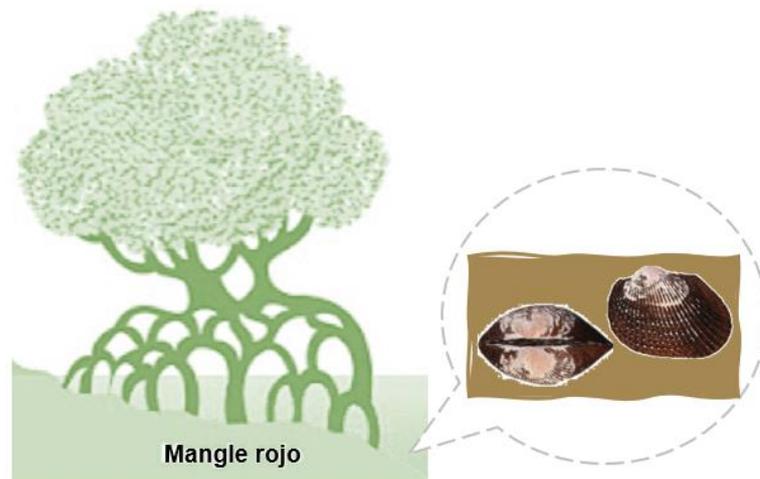
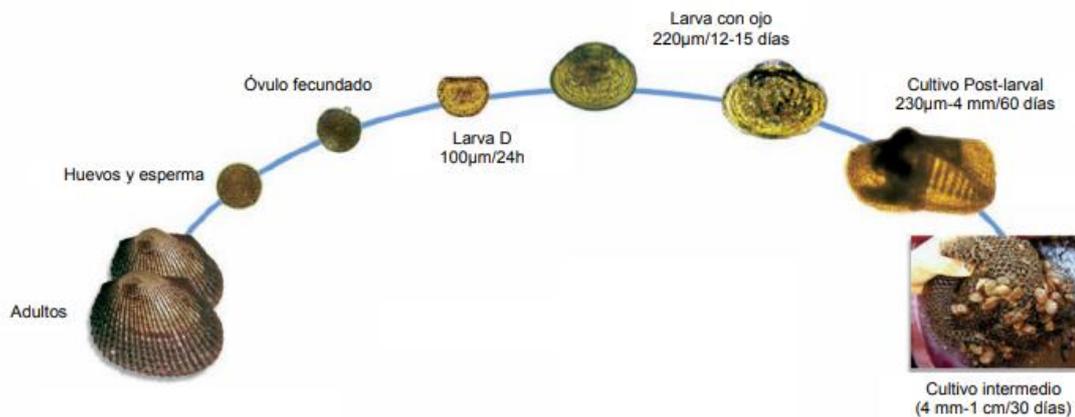


Figura 1.3 Hábitat de la especie *A. tuberculosa*.

### 1.4.4 Ciclo de reproducción

*Anadara tuberculosa* alcanza la madurez sexual entre los 2,3 cm y 2,6 cm de longitud total. Son organismos dioicos con fertilización externa y presenta dos fases: planctónica y bentónica.

En su fase larvaria planctónica, viven y se alimentan en la columna de agua hasta alcanzar su última etapa larval, luego son transportadas a los manglares por las corrientes marinas para asentarse y enterrarse en el sustrato y continuar su ciclo como bentos.



**Figura 1.4 Ciclo reproductivo de *A. tuberculosa* (Soto, 2012).**

#### 1.4.4.1 Fases Larvarias

El desarrollo larvario planctónico de la concha prieta dura entre 23 a 31 días y consta de 4 estadios:

- Trocófora: Esta etapa transcurre en un laxo de 10 a 24 horas luego de la fecundación, su forma es triangular, presenta cilios y movimientos muy activos, rota sobre su propio eje.
- Veliger o charnela recta: A las 16 o 18 horas comienza la transición a larva D. Se alimentan por succión debido la corriente de agua que genera su movimiento ciliar, pudiendo observar el alimento en su sistema digestivo y su forma D.
- Larva con umbo: Presenta una talla de 0,16 mm y su duración es de 3 a 5 días.
- Pediveliger o larva oculada: Mide aproximadamente 0,27 mm y se encuentra en la columna de agua durante 13 a 15 días.

Las larvas oculadas retornan a las zonas de manglar gracias a los cambios de marea y las corrientes marinas asentándose al sustrato como postlarva (longitud de 5,5 mm) durante 4 a 5 meses, luego pasa a su fase como juvenil cuya longitud varía de 18 a 32 mm con una duración 6 meses. Finalmente, alcanzan su fase adulta para reproducirse o comercializarse (González y Cárdenas, 2014).

#### 1.4.5 Principales patógenos en moluscos bivalvos de interés en Acuicultura

El cultivo de moluscos se ve gravemente afectado por patógenos microbianos que causan pérdidas significativas en los criaderos y en bancos naturales (Romalde,

2016). Las condiciones óptimas del cultivo de moluscos bivalvos como la materia orgánica, densidad, nutrientes inorgánicos, temperatura, entre otros, favorecen el crecimiento y proliferación de bacterias y parásitos que perjudican tanto a los estadios larvarios como juveniles y adultos (Novoa & Figueras, 2011). La alta mortalidad asociadas a infecciones bacterianas a nivel de larvas y reproductores se debe principalmente a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp. (Cáceres & Vásquez, 2008). Un estudio realizado en individuos de *Mytella guyanensis*, *Anadara tuberculosa* y *Leukoma aspérrima* comercializados en el mercado de La Libertad, Santa Elena identificó la presencia del protozooario Leshmania y la ameba del género Entamoeba (Ortega, 2022). En *A. tuberculosa* se evidenció la presencia de *Vibrios* spp. y *Pseudomonas* spp. en la pulpa de la concha en fase juvenil (Ortega & Carrillo, 2018). Las enfermedades causadas por *Vibrio* en moluscos se conocen desde la década de 1960, fue observada por primera vez en la especie *Mercenaria mercenaria* (Hidalgo, 2008). Desde entonces, se han reportado grandes pérdidas productivas en distintas especies de moluscos de interés acuícola, cuyos signos incluyen malformaciones, distensión y desprendimiento del velo en larvas y muerte por necrosis bacilar con reducción en la movilidad. Debido a esto, pueden proliferar protozoos ciliados carroñeros como invasores secundarios aumentando el porcentaje de mortalidad en larvas y juveniles (Novoa & Figueras, 2011).

#### **1.4.6 Principales antibióticos de uso acuícola**

Desde hace varios años, los antibióticos han sido ampliamente utilizados con fines terapéuticos y profilácticos para la producción de semillas de moluscos bivalvos (Dubert, y otros, 2016; Randrianarivelo, y otros, 2010), sin embargo, su uso excesivo e inadecuado ha provocado la resistencia de bacterias principalmente patógenas (Sotomayor, y otros, 2019; Kerekes, y otros, 2013) que afectan, tanto a, organismos cultivados como a la salud del consumidor (Revilla, y otros, 2019).

El florfenicol y la oxitetraciclina son antibióticos de amplio espectro aprobados para uso acuícola. Presentan acción bacteriostática, actúan inhibiendo la síntesis proteica a nivel ribosomal y son eficaces contra la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, no obstante, estudios recientes han reportado pérdida de sensibilidad antimicrobiana y desarrollo de resistencia a dichos medicamentos,

por lo que, no son recomendables para el control de infecciones a nivel de producción (Sotomayor, y otros, 2019). Debido a esto, diversas investigaciones han demostrado el potencial antimicrobiano de los productos naturales, especialmente los aceites esenciales, como una alternativa viable contra episodios recurrentes de mortalidad en la producción de larvas y postlarvas en cultivos de moluscos bivalvos (Dubert, y otros, 2016).

#### **1.4.7 Generalidades de los aceites esenciales y su uso en la acuicultura.**

Los aceites esenciales son compuestos aromáticos, insolubles, poco densos y volátiles extraídos de las hojas, flores, corteza y frutos de las plantas. Contienen compuestos bioactivos que le confieren propiedades antibacterianas, antiparasitarias, antifúngicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Baptista, y otros, 2020). Su uso en concentraciones no microbicidas puede alterar el sistema “quorum sensing” y, por tanto, la virulencia y patogenicidad bacteriana (Dominguez-Borbor, 2020; Ferro, y otros, 2016) especialmente, en el género *Vibrio*, el cual provoca infecciones masivas en producciones acuícolas (Sotomayor, y otros, 2019; Sorroza, y otros, 2018).

Varios aceites esenciales han mostrado su aplicabilidad en organismos de interés acuícola, entre estos se encuentra el aceite de canela (*Cinnamomun verum*), cuyo principal componente el cinamaldehído, ejerce su actividad antimicrobiana al ser capaz de dañar y destruir las membranas celulares bacterianas, así como interrumpir el metabolismo celular. Estudios recientes, demostraron la capacidad protectora de este compuesto en larvas vieira Yesso (*Patinopecten yessoensis*) desafiadas a infección por *V. anguillarum*, logrando reducir significativamente la mortalidad en las vieiras infectadas. Por lo que, se consideró como un aditivo alimentario seguro en la acuicultura para la prevención y el control de la enfermedad en la vieira (Shan, y otros, 2021).

El aceite de orégano (*Origanum vulgare*), presenta dos componentes de mayor abundancia, el carvacrol y timol, efectivos contra las bacterias Gram negativas y Gram positivas (Sorroza, y otros, 2018). Estudiados como inhibidor del crecimiento de cepas patógenas de *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (Sorroza, y otros, 2018; Sotomayor, y otros, 2019). Por otra parte, el aceite esencial de palo santo está constituido mayormente del metabolito

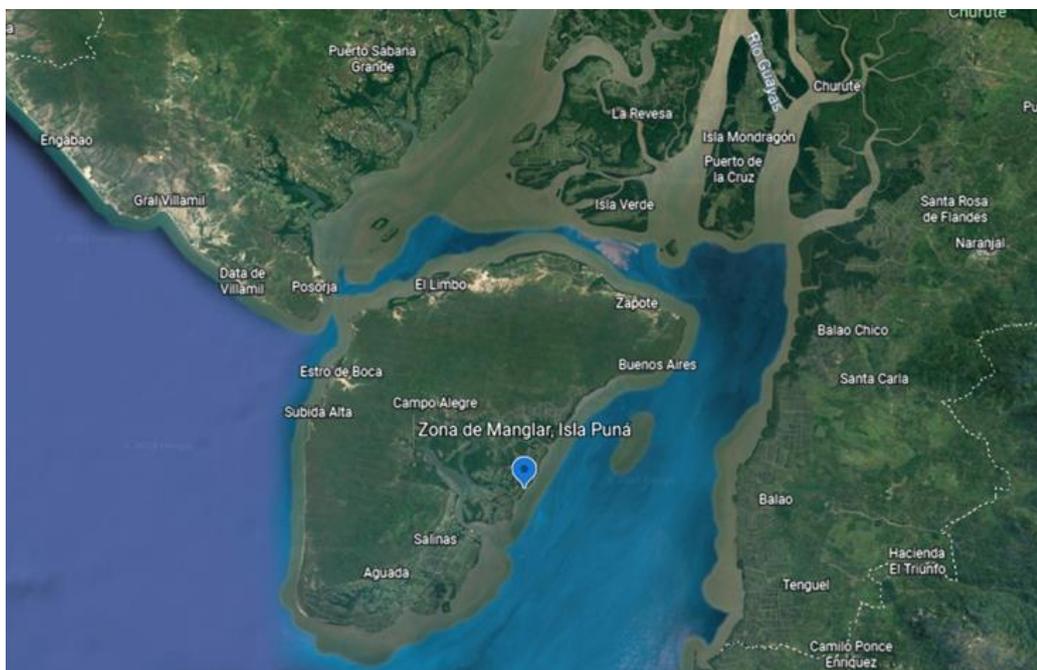
D-limoneno, el cual le confiere propiedades antibacterianas y antifúngicas. Investigaciones recientes han reportado, el potencial del aceite de palo santo (*B. graveolens*) para el control del crecimiento de *Aeromonas salmonicida* y *Pichia kudriavzevii* aisladas en el pez *Kajikia audax* (Noel y Oviedo, 2019). Sin embargo, no se ha encontrado información sobre su uso en moluscos bivalvos, ni en la producción de semilla de concha prieta.

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Recolección de reproductores

Se recolectaron cien adultos de *A. tuberculosa* (tamaño  $57,5 \pm 4,53$  mm y masa total  $55,53 \pm 15,87$  g) en la zona de manglares de la región norte de la isla Puna ( $2^{\circ} 54' 17,6''$  S  $-80^{\circ} 03' 04,9''$  W), provincia del Guayas (Ecuador).



**Figura 2.1** Zona de recolección de *A. tuberculosa* en la Isla Puná, Guayas.

La recolección se realizó durante la marea más baja de marzo de 2022. Los reproductores fueron transportados al Centro Nacional de Acuicultura e Investigación Marina (CENAIM-ESPOL), colocados en un contenedor de aislamiento térmico ( $26^{\circ}\text{C}$ ) sin agua de mar durante 3 h para evitar el desove espontáneo durante el transporte.

Esta especie puede tolerar mucho tiempo en condiciones de anhidrobiosis (Davenport y Wong, 1986). Una vez en el laboratorio, los reproductores se limpiaron del exceso de sedimentos en la concha y se colocaron en un tanque de 1.000 L con agua de mar filtrada (AMF) a  $1 \mu\text{m}$  y tratada con rayos ultravioleta a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,

pH 8,0 y salinidad 32 ups. La dieta diaria consistió en una mezcla de microalgas *Chaetoceros gracilis* (150.000 células/mL/día) e *Isochrysis galbana* (100.000 células/ mL/día) durante 6 días, como periodo de aclimatación. Este acondicionamiento previo fue ideal para favorecer el proceso de reproducción.

## **2.2 Obtención de larvas**

Los reproductores fueron sometidos a tres cambios bruscos de temperatura, de 10°C a 32°C y viceversa con un lapso de 30 minutos entre cada cambio. Se mantuvo la temperatura de inducción en los límites indicados para evitar la exanguinación de los organismos como respuesta fisiológica al estrés térmico. Los animales se colocaron en cestas de plástico y se transfirieron a tanques (1.000 L) con AMF durante 4-5 h (26 °C) para que se relajen y permitirles así desovar espontáneamente. Una vez ocurrida la fertilización se esperó 10 horas hasta la aparición de las primeras larvas trocóferas. Se las recolectó luego de ser pasadas por tamices de 100, 80 y 60 µm para eliminar sedimentos y residuos innecesarios. Finalmente, se realizó el recuento de larvas/mL en el microscopio óptico (10X).

## **2.3 Selección de aceites esenciales**

Los AE empleados en el experimento se seleccionaron en base a la revisión bibliográfica previamente indicada. Los AE de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomun verum*) se adquirieron de Young Living. El AE de palo santo (*Bursera graveolens*) se obtuvo de Moringallo Ecuador. La pureza indicada por los fabricantes fue del 100%, y el proceso de obtención usado fue a partir de la destilación de vapor de las hojas y tallos de la planta. Los AEs fueron almacenados a temperatura ambiente.

## **2.4 Desarrollo experimental**

Se transfirieron 5 ml de agua de AMF con larvas trocóferas (densidad 130 larvas/ml) a placas ELISA de 15 ml que contenían 5 ml de AMF (densidad final 65 larvas/ml). Se probaron cinco compuestos a distintas concentraciones: 1) oxitetraciclina a 4 ppm, 2) floranfenicol a 2 ppm, 3) AE de orégano (*Origanum vulgare*), 4) AE de canela (*Cinnamomun verum*) y 5) AE de palo santo (*Bursera graveolens*), los tres a 0,04 ppm, 0,4 ppm, y 0,8 ppm, además de un control solo con AMF. Los ensayos

fueron realizados por triplicado con una duración de 96 horas a temperatura de 22 °C.

Las dosis de oxitetraciclina y floranfenicol empleadas se seleccionaron de acuerdo con las recomendaciones de Miranda et al. (2014) para larvas de vieira. La dosis utilizada para el AE de orégano, canela y palo santo fueron estimadas en base al estudio de Revilla et al. (2019) en larvas mixotróficas de *Nodipecten subnodosus*.

Todos los agentes terapéuticos fueron añadidos una hora antes de la incubación y se airearon vigorosamente para permitir su disolución homogénea. Se alimentó con la microalga *Isochrysis galbana* (100 células/ $\mu$ l/día). Durante los cuatro días se cuantificó la supervivencia de cada unidad de incubación a partir de una alícuota de 1ml adicionada a la cámara de recuento Sedgewick Rafter en microscopía óptica (5x).

## **2.5 Análisis microbiológico**

Se realizó el conteo bacteriano mediante la técnica recuento en placa de cada unidad experimental al cabo de las 24 y 96 horas de haber inoculado cada dosis de AE empleadas en el ensayo. Las concentraciones analizadas fueron escogidas de acuerdo con el tratamiento que presentó mayor supervivencia de larvas. Se tomó 1 mL de muestra de cada tratamiento, incluyendo la muestra de alimento y el control. Se realizaron dos diluciones por cada muestra inoculando las diluciones:  $10^0$ ,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en agar marino (DIFCO™) y agar TCBS (DIFCO™) para bacterias totales y vibrios, respectivamente. El método de siembra fue por extensión utilizando el asa de Digrafsky previamente esterilizada. Finalmente se incubó a 37 °C y se realizó la lectura a las 24 horas.

## **2.6 Análisis estadístico**

La significancia del efecto de los tratamientos en el porcentaje de supervivencia de las larvas D y las diferencias significativas entre cada tratamiento fueron evaluados mediante un ANOVA de una vía con comparación de Duncan. La correlación existente entre el porcentaje de supervivencia para los distintos tratamientos y la cantidad de bacterias totales y vibrios presentes al inicio y al final del experimento fue determinada a través del coeficiente de correlación de Pearson. Las variables

cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de acuerdo con las pruebas de Shaphiro Wilks y Levene respectivamente exceptuando el porcentaje de supervivencia que mostraba una distribución bimodal, para su ajuste se eliminó la información obtenida en el periodo de 24 horas. La probabilidad para todas las pruebas fue de  $P=0,05$ .

# CAPÍTULO 3

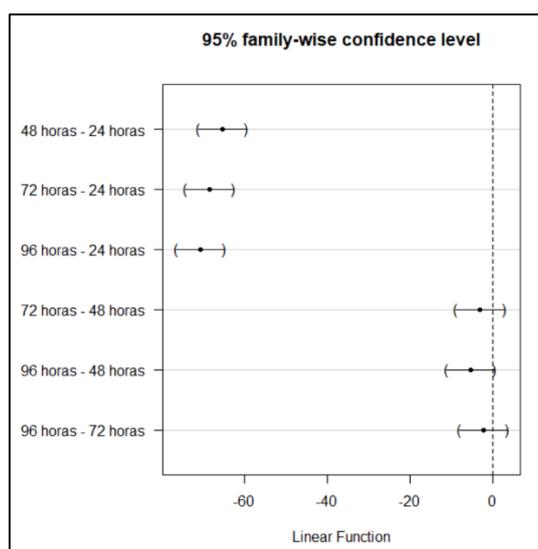
## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El promedio de supervivencia de las larvas disminuyó al aumentar el transcurso de los días. Como se puede observar en la Tabla 3.1 la supervivencia a las 24 horas fue superior con una diferencia del 65% con respecto a las 48 horas. A partir de este periodo de tiempo hasta la finalización del experimento a las 96 horas la supervivencia disminuyó apenas un 5%.

**Tabla 3.1 Promedio de supervivencia para cada periodo de tiempo.**

Tiempo de medición (hrs)	Promedio de supervivencia (%)
24	98,19
48	32,81
72	29,74
96	27,39

La distribución del porcentaje de supervivencia observado fue bimodal, se determinaron diferencias significativas ( $F=469,7$ ;  $Df=3$ ;  $P<0,05$ ) entre el grupo de las 24 horas con el grupo de las 48, 72 y 96 horas (Fig. 3.1), estos tres últimos no mostraron diferencias significativas entre si ( $F=2,236$ ;  $Df=2$ ;  $P=0,111$ ). Por lo que para el ANOVA entre los distintos tratamientos solo se tomó en cuenta las mediciones tomadas a partir de las 48 horas de manera que los análisis de varianzas no sean afectados.



**Figura 3.1 Representación del ANOVA con comparación entre medias para los distintos periodos de medición.**

Los tratamientos que mostraron una mayor supervivencia fueron los antibióticos con un aumento en la supervivencia de 16% y 23% para florfenicol y oxitetraciclina. El palo santo a 0,8 ppm tuvo un aumento del 13% mientras que la canela a 0,04 aumento con un 12%. El resto de los tratamientos tuvieron un aumento menor al 10% con respecto al control. El solvente empleado para homogenizar los aceites esenciales mostró una disminución del 9% en la supervivencia con respecto al control.

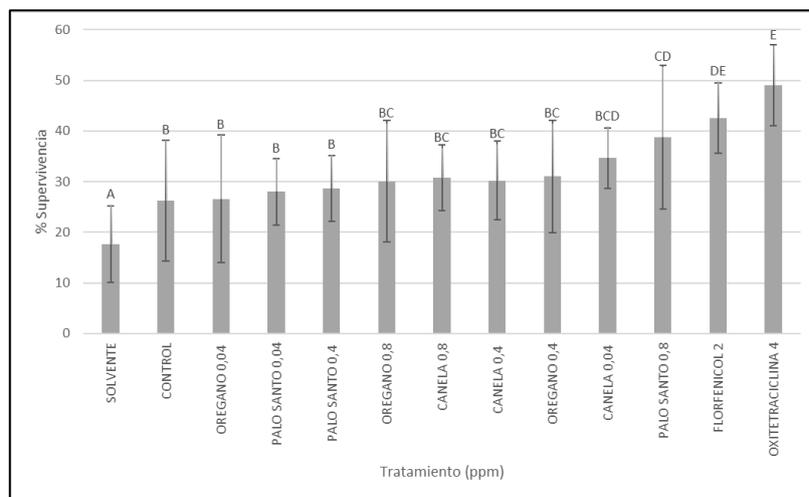
**Tabla 3.2. Media de la supervivencia promedio observada en cada tratamiento.**

Tratamiento (ppm)	Media
Solvente	17,68
Control	26,26
AE orégano 0,04	26,62
AE palo santo 0,04	27,99
AE palo santo 0,4	28,68
AE orégano 0,8	30,08
AE canela 0,4	30,22
AE canela 0,8	30,74
AE orégano 0,4	31,03
AE canela 0,04	34,63
AE palo santo 0,8	38,78
Florfenicol 2	42,56
Oxitetraciclina 4	49,05

El ANOVA indicó diferencias significativas entre los tratamientos ( $F=9,806$ ;  $Df=12$ ;  $P<0,05$ ) y mediante comparación de Duncan se pudieron observar aquellos que difieren significativamente entre si (Fig 3.2). El solvente Tween® 80 de naturaleza surfactante difiere significativamente del control, esto podría indicar una posible toxicidad de este. En un estudio acerca del surfactante de aminas de sebo polietoxiladas (POEA) que era considerado inocuo para los animales se encontró que en concentraciones de  $EC_{50} 3,07$   $\mu\text{g/l}$  puede ser dañino para el proceso de metamorfosis de las larvas de ostra *Crassostrea gigas* (Mottier y otros, 2014)

En el estudio llevado a cabo por Revilla y otros (2019) en larvas de *Nodipecten subdonosus* ( $d=20$  y  $100$  larvas/ml), el AE de orégano al 17% en una concentración de 1 ppm mostró ser superior a los dos antibióticos empleados en el presente estudio con las mismas concentraciones. Sin embargo, en las concentraciones empleadas de 0,04, 0,4 y 0,8 ppm del AE de orégano ( $d=65$  larvas/ml) con una pureza del 100% no se

observaron diferencias significativas con el control y fueron inferiores a los antibióticos ya mencionados.



**Figura. 3.2. Gráfico de barras de la supervivencia promedio para cada tratamiento.**

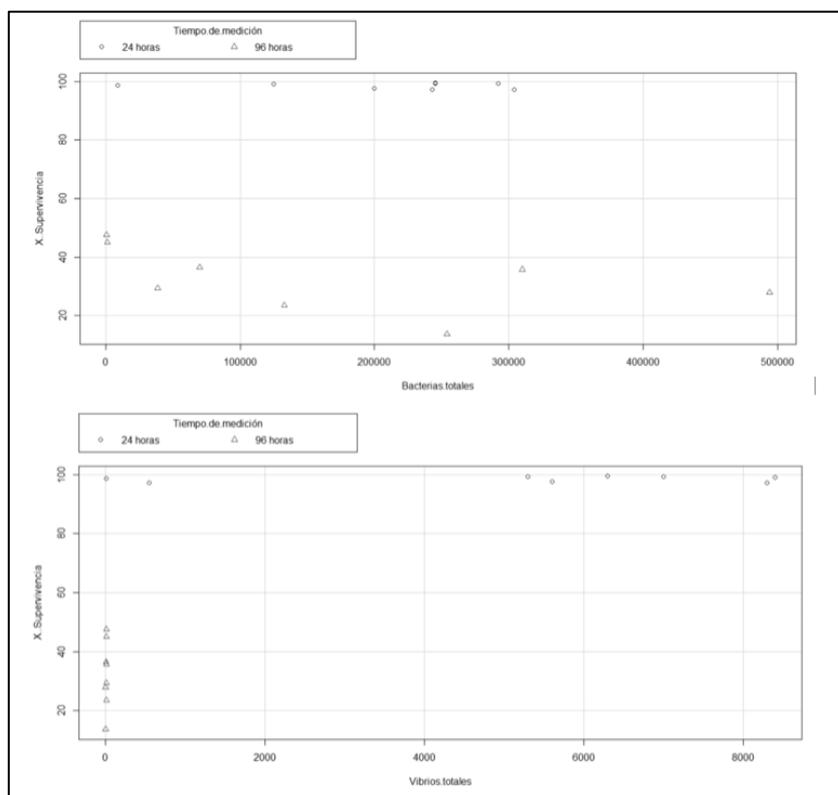
**Nota:** Las líneas de error indican la desviación estándar y las letras indican las diferencias significativas. Letras en común indican que no existe diferencias significativas.

En cuanto al AE de canela podemos observar que la mayor supervivencia se da en la menor concentración, a 0,04 ppm. En un estudio de Lahlou y Berrada (2001) de la toxicidad de la canela en *Bulinus truncatus* (un caracol de agua dulce) se determinó un  $LC_{50}$  de 0,96  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, en un ensayo más reciente llevado a cabo por Shan y otros (2021) se enfrentó a la vieira *Patinopecten yessoensis* con una especie de vibrio con 100  $\mu\text{g/vieira}$  el cual provocó un aumento en la supervivencia. Esto parece indicar que el tamaño y tipo de molusco influye en el nivel de citotoxicidad de la canela.

El AE de palo santo a 0,8 ppm mostró una diferencia significativa con el control y no mostró diferencias significativas con el florfenicol a 2 ppm. Este AE no ha sido estudiado anteriormente como potencial tratamiento en moluscos.

En cuanto a la cantidad de bacterias totales y vibrios totales respecto a la supervivencia, se puede observar una dispersión no homogénea de los datos con claras diferencias entre las 24 y 96 horas (Fig. 3.3) por lo que no fue posible determinar el coeficiente de correlación de Pearson. A las 24 horas la supervivencia se mantiene en niveles altos (97,24 - 99,54) a pesar de que la cantidad de bacterias y vibrios totales varía entre 9.000 a 304.000 y 10 a 8.400 respectivamente. Mientras que a las 96 horas la supervivencia

es baja (13,75 – 47,58) con una variación de bacterias totales entre 742 a 494.000 y de vibrios entre 1 y 10.



**Figura 3.3 Diagrama de dispersión de las bacterias y vibrios totales a las 24 y 96 horas de acuerdo con el porcentaje de supervivencia.**

Los recuentos bacterianos obtenidos a las 24 y 96 horas de tratamiento se presentan en la Tabla 3.3 y Tabla 3.4. Se detectó la presencia del género *Vibrio* en las muestras analizadas evidenciando las características fenotípicas de las cepas aisladas, colonias amarillas (fermentadoras de sacarosa como *V. cholerae*) y colonias verdes (no fermentadoras de sacarosa que incluyen a *V. parahaemolyticus* y otras especies patógenas) (Kobayashi, y otros, 1963) en el medio selectivo agar TCBS con ausencia de luminiscencia. Sin embargo, estas características fenotípicas no fueron suficientes para su identificación a nivel de especie (Hara-Kudo, y otros, 2001).

A las 24 horas de tratamiento, la concentración de bacterias marinas heterótrofas fue de  $10^5$  UFC/mL para todos los tratamientos excepto para el florfenicol, el agua de mar filtrada y la microalga cuyas concentraciones fueron de  $10^3$  UFC/mL. El tratamiento con solvente presentó concentraciones menores a 10 UFC/mL. Las colonias amarillas de

*Vibrio* spp. presentaron las concentraciones más altas en los tratamientos, excepto para la oxitetraciclina. El tratamiento con orégano a 0,4 ppm presentó la mayor concentración de Vibrios totales  $8,03 \times 10^3$  UFC/mL.

**Tabla 3.3 Recuento bacteriano expresado en UFC/mL por tratamiento a las 24 horas.**

Muestras	Bacterias totales	Vibrios (colonias verdes)	Vibrios (colonias amarillas)	Vibrios (colonias luminiscentes)	Vibrios totales
<b>Palo Santo 0,4</b>	2,00E+05	9,00E+02	4,70E+03	< 10*	5,60E+03
<b>Palo Santo 0,8</b>	3,04E+05	2,00E+02	3,50E+02	< 10*	5,50E+02
<b>Canela 0,04</b>	2,45E+05	1,20E+03	5,10E+03	< 10*	6,30E+03
<b>Canela 0,4</b>	2,45E+05	1,60E+03	5,40E+03	< 10*	7,00E+03
<b>Oregano 0,04</b>	2,92E+05	2,10E+03	3,20E+03	< 10*	5,30E+03
<b>Oregano 0,4</b>	1,25E+05	2,50E+03	5,90E+03	< 10*	8,40E+03
<b>Oxitetraciclina</b>	2,43E+05	4,50E+03	3,80E+03	< 10*	8,30E+03
<b>Florfenicol</b>	9,00E+03	< 10	< 10	< 10*	< 10
<b>Agua con larvas</b>	3,22E+05	2,20E+03	3,50E+03	< 10*	5,70E+03
<b>Agua de mar filtrada</b>	2,30E+03	< 10	< 10	< 10*	< 10
<b>Microalga</b>	3,10E+03	< 10	< 10	< 10*	< 10
<b>Solvente</b>	< 10	< 10	< 10	< 10*	< 10

**Nota:** < 10\* UFC/mL representa la ausencia de crecimiento de colonias bacterianas en la menor dilución ensayada.  
**Vibrios totales**= suma de Vibrios (colonias amarillas, colonias verdes).

A las 96 horas de tratamiento, la mayor concentración de bacterias heterótrofas se observó con el AE canela a 0,4 ppm con una concentración de  $4,94 \times 10^5$  UFC/mL, cuyo valor fue más alto a la concentración reportada a las 24 horas, señalando la baja efectividad del AE de canela a 0,4 ppm para reducir la carga bacteriana. El tratamiento con AE palo santo a 0,8 ppm presentó la más alta concentración de Vibrios totales con 4 UFC/mL.

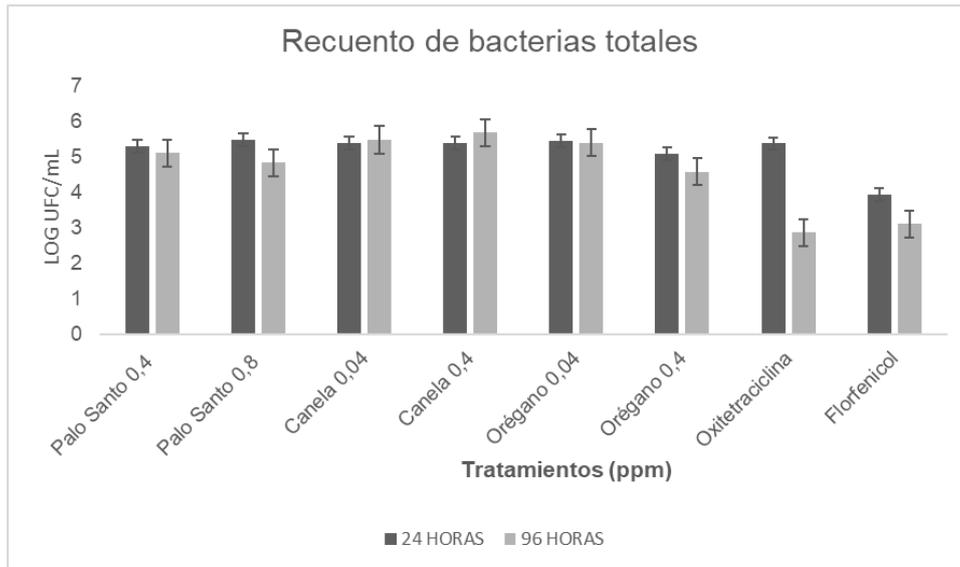
**Tabla 3.4 Recuento bacteriano expresado en UFC/mL por tratamiento a las 96 horas.**

Muestras	Bacterias totales	Vibrios (colonias verdes)	Vibrios (colonias amarillas)	Vibrios (colonias luminiscentes)	Vibrios totales
<b>Palo Santo 0,4</b>	1,33E+05	6,00E+00	5,00E+00	< 1	1,10E+01
<b>Palo Santo 0,8</b>	7,00E+04	3,00E+00	1,00E+00	< 1	4,00E+00
<b>Canela 0,04</b>	3,10E+05	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>Canela 0,4</b>	4,94E+05	< 1	1,00E+00	< 1	1,00E+00
<b>Orégano 0,04</b>	2,54E+05	< 1	2,00E+00	< 1	2,00E+00
<b>Orégano 0,4</b>	3,88E+04	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>Oxitetraciclina</b>	7,42E+02	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>Florfenicol</b>	1,31E+03	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>Microalga</b>	1,12E+05	< 1	< 1	< 1	< 1

**Nota:** < 1 UFC/mL representa la ausencia de crecimiento de colonias bacterianas en la dilución 10<sup>0</sup> ensayada. **Vibrios totales**= suma de Vibrios (colonias amarillas, colonias verdes).

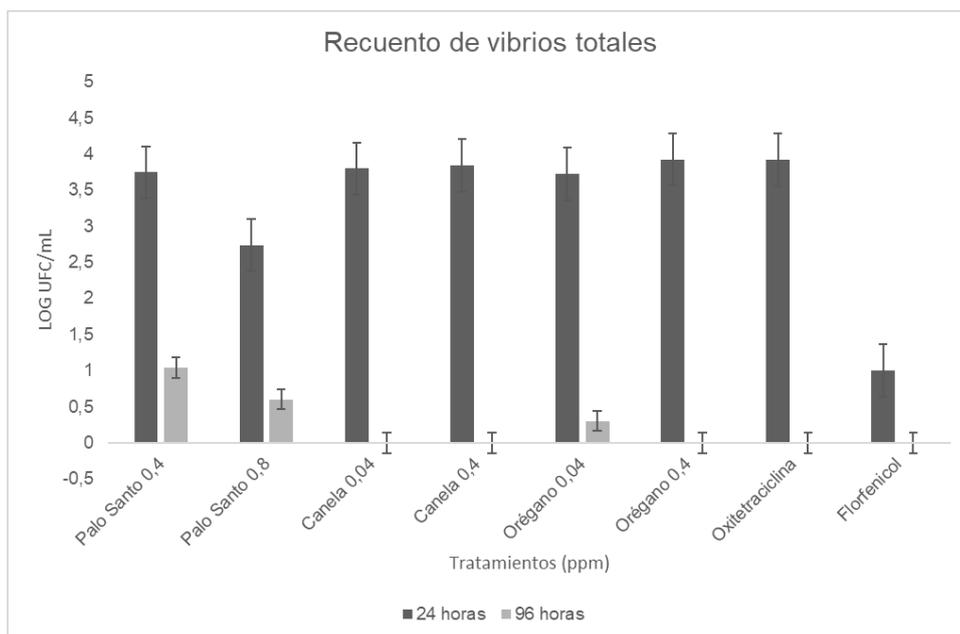
Las cepas bacterianas de *Vibrio* spp. a menudo han sido catalogadas como perjudiciales para *A. tuberculosa* y otros bivalvos debido a que causan eventos masivos de mortandad desde sus primeras etapas larvarias ocurridas durante la cría en cautiverio. Diringer, y colaboradores, 2019, reportaron cepas bacterianas del género *Vibrio* y *Pseudomonas* spp. tanto en larvas D de la concha prieta como en reproductores. Se conoce que bacterias *Vibrio* spp. abundan en la microbiota cultivable de moluscos bivalvos, por lo que, resulta dificultoso diferenciar entre bacterias patógenas del microbioma natural del animal (Garnier, y otros, 2007). Velasquez, y colaboradores, 2018 detectaron la presencia de *E. coli*, Enterobacterias y *Vibrio* spp. en la masa visceral de individuos adultos de *A. tuberculosa*, en concentraciones promedio de  $1,96 \times 10^6$  UFC/gr para Enterobacterias y  $2,8 \times 10^6$  UFC/gr para *Vibrio* spp. Debido a que son organismos filtradores pueden acumular altas concentraciones de bacterias tanto comensales como patógenas que pueden transmitirse verticalmente a su progenie inclusive cuando se ha mantenido la asepsia durante el cultivo larvario (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans, 2008).

La carga de bacterias heterótrofas disminuyó con los tratamientos de AE de palo santo, orégano, oxitetraciclina y florfenicol. La oxitetraciclina fue el más efectivo para reducir la concentración bacteriana (Figura 3.4).



**Figura 3.4 Recuento total de bacterias marinas heterótrofas expresados como log de UFC/mL por cada tratamiento expresado en ppm.**

La concentración bacteriana de vibrios totales disminuyó significativamente en todos los tratamientos ensayados (Figura 3.5)



**Figura 3.5 Recuento de Vibrios totales expresados como log de UFC/mL por cada tratamiento expresado en ppm.**

Randrianarivelo, y colaboradores, 2010, reportan una disminución significativa en la concentración bacteriana de *Vibrio* spp. en las larvas de *P. monodon* con valores de  $20 \times 10^3$  UFC/mL para ensayos con AE canela a 734 ppm, lo que contrasta con los

resultados obtenidos en el presente estudio debido a que la dosificación utilizada fue mucho menor.

Estudios recientes han demostrado la disminución de recuentos bacterianos de *V. parahaemolyticus*, *V. colera* y *V. vulnificus* en juveniles de *P. vannamei* expuestos a tratamientos de AE de orégano en concentraciones inferiores a 5 ppm (Teixiera, y otros, 2013; Gracia-Valenzuela, y otros, 2014; Sotomayor, y otros, 2019). A pesar del alto potencial del AE para el crecimiento bacteriano, puede ser tóxico en altas concentraciones (Sotomayor, y otros, 2019). Concentraciones mayores a 10 ppm resultaron tóxicas para *P. vannamei* (Dominguez-Borbor, y otros, 2018), mientras que concentraciones mayores a 14,9 ppm fueron tóxicos para *A. salina* (Manzanares, y otros, 2015). Además, se ha reportado el 100% de inhibición en bacterias Gram negativas con AE de palo santo en concentraciones mínimas de 1.670 ppm (Mendez, y otros, 2017; Noel & Oviedo, 2019), a diferencia de lo obtenido en este estudio, donde el AE a 0,8 ppm fue efectivo para reducir bacterias heterótrofas y *Vibrio* spp.

Se ha comprobado que los aceites esenciales ejercen efectos citotóxicos al provocar la ruptura la membrana plasmática en bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes* y Gram negativas como *Pseudomonas* spp. y *E. coli* (Helander, y otros, 1998; Lambert, 2001; Burt, 2004), No obstante, no se ha descrito ninguna resistencia o adaptación a los AE (Bakkali, y otros, 2008; Randrianarivelo, y otros, 2010).

Por otro lado, la oxitetraciclina y el florfenicol son antibióticos eficientes para el control del crecimiento microbiano y el tratamiento de enfermedades infecciosas en concentraciones superiores de 1 ppm (Roque, y otros, 2001; Sotomayor, y otros, 2019). Sin embargo, se evidencia la toxicidad de la oxitetraciclina en concentraciones superiores a 135 ppm para larvas de *Penaeus stylirostris* (Williams, y otros, 1992) y del florfenicol en concentraciones de 20 ppm para larvas de *P. vannamei* (Soto-Rodríguez, y otros, 2006). Además, se ha reportado pérdida de susceptibilidad y desarrollo de resistencia a estos antibióticos en cepas de *Vibrio* spp, por tanto, no son recomendados como estrategia de control a nivel de producción (Sotomayor, y otros, 2019).

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Es necesario realizar más estudios con el AE de canela para determinar la concentración adecuada en las larvas de *A. tuberculosa*, por otra parte, el AE de orégano no parece ser efectivo para este molusco en la etapa larvaria.

El aceite de palo santo a 0,8 ppm fue más efectivo para aumentar la supervivencia en larvas y disminuir la contaminación bacteriana en laboratorio por lo que es una alternativa viable a utilizarse para el control de la carga bacteriana en condiciones in vivo de cultivo larvario de *A. tuberculosa*.

Los tratamientos con AE fueron inferiores a los antibióticos para aumentar la supervivencia a excepción del tratamiento de AE de palo santo, sin embargo, tanto los antibióticos como los AE fueron efectivos para reducir la carga bacteriana.

### 4.2 Recomendaciones

Debido al declive rápido de la supervivencia observado entre las 24 y 48 horas se recomienda realizar mediciones con un periodo más corto de tiempo para esta etapa.

Estudios con una mayor concentración de palo santo son sugeridos debido al potencial observado, también es necesario establecer un  $LC_{50}$  del mismo.

Se recomienda evaluar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y al mismo tiempo su efecto tóxico sobre las larvas de *A. tuberculosa*.

# BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, R., Cobo, L., Sonnenholzner, S., & Stern, S. (2008). Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura, 129.
- Azul, C. (2014). Manual Práctico de Producción de Concha prieta (*Anadara tuberculosa*) en condiciones de Laboratorio.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., & Sarmiento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(4), 279-295.
- Burt, Sara. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." *International journal of food microbiology* 94.3 (2004): 223-253.
- Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001-1006.
- Cáceres-Martínez, J., & Vásquez-Yeomans, R. (2008). La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*.
- Cárdenas, J., Castillo, O., De Cámara, C., & González, V. (2018). Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Boletín Venezolano de Infectología*, 11-12.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., & Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(2), 159-161.
- Diringer, B. M., Pretell, K., Avellan, R., Sahuquet, M., Vasquez, R., Gentile, G., & Mialhe, E. (2019). Production of specific pathogen-free larvae from genetically characterized populations of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia), for stock enhancement and aquaculture in the Peru Northeast Biosphere Reserve. *Latin*

- american journal of aquatic research, 47(3), 547-558. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-16>
- Domínguez-Borbor, C. L. (2020). CENAIM. Obtenido de aceites esenciales como inhibidores de la virulencia de *Vibrios* pp. Patógenos de camarón *P. vannamei*: <http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/2020/Publicaciones/tesis/2020%20Cristobal%20Dominguez.pdf>
- Dubert, J., Osorio, C. R., Prado, S., & Barja, J. L. (2016). Persistence of antibiotic resistant *Vibrio* spp. in shellfish hatchery environment. *Microbial ecology*, 72(4), 851-860.
- Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista cubana de medicina militar*, 32(1), 0-0.
- Ferro, T. A., Araújo, J. M., dos Santos Pinto, B. L., Dos Santos, J. S., Souza, E. B., Da Silva, B. L., ... & Fernandes, E. S. (2016). Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in microbiology*, 7, 2052.
- García-Domínguez, F. A., Haro-Hernández, D., García-Cuellar, Á., Villalejo-Fuerte, M., & Rodríguez-Astudillo, S. (2008). Reproductive cycle of *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)(Arcidae) in Magdalena Bay, Mexico. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(1), 143-152.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., & Nicolas, J. L. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial ecology*, 53(2), 187-196.
- Gracia-Valenzuela, M. H., Vergara-Jiménez, M. J., Baez-Flores, M. E., & Cabrera-Chavez, F. (2014). Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1367-1370.
- González, R. R., Vélez, P. P., & Cárdenas, J. V. (2014). Inducción al desove de la Concha Prieta *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en condiciones de laboratorio. *La Técnica: Revista de las Agrociencias*. ISSN 2477-8982, (12), 56-63.

- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. y Kumagai, S. (2001). Método mejorado para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos. *Microbiología ambiental y aplicada*, 67 (12), 5819-5823.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595
- Hidalgo, R. B. (2008). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Univ Santiago de Compostela.
- Kerekes, E. B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2013). Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 933-942.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R., & Kuwahara, S. (1963). A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology*, 18, 387-392.
- Lahlou M, Berrada R. (2001). Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. *Int J Aromather* 11:87–96
- Lambert, R. J. W., et al. "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." *Journal of applied microbiology* 91.3 (2001): 453-462.
- Mackenzie, J. R., & Clyde L. (2001). The fisheries for mangrove cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, with descriptions of their habitats and biology, the fishermen's lives, and the effects of shrimp farming. *Marine Fisheries Review*, 63(1), 1-39.
- Manzanares, D. L., Morilla, L. J. G., Malawani, A. D., Lagare, N. J. S., & Abrenica-Adamat, L. R. (2015). Effects of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extract on early life stages of *Artemia salina*. *Advances in Environmental Sciences*, 7(3), 468-474.

- Marshall, R., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2(1), 33-55.
- Mendez, A. H. S., Cornejo, C. G. F., Coral, M. F. C., & Arnedo, M. C. A. (2017). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Bursera graveolens* (Burseraceae) from Perú. *Indian J Pharm Educ Res*, 51(3), S429-S435.
- Miranda-Baeza, A., Orozco-Medina, C., Rivas-Vega, M. E., & Luna-González, A. (2015). Evaluación de la carga de bacterias heterótrofas y vibrios en un sistema de cultivo integrado camarón-molusco-macroalga. *Hidrobiológica*, 25(2), 311-314.
- Mora, E., & Moreno, J. (2008). Abundancia y estructura poblacional de *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* en las principales áreas de extracción de la costa ecuatoriana. Quito, Ecuador: Instituto Nacional de Pesca.
- Mora, E., Moreno, J., Jurado, V., & Flores, L. (2010). La pesquería de la concha prieta (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en el 2009: indicadores pesqueros y condición reproductiva en la zona sur y norte de Ecuador.
- Moreno, J., Alemán, C., & Bonilla, R. E. (2019). Aspectos biométricos y reproductivos de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)(Bivalvia: Arcidae) en dos sitios de extracción de Esmeraldas y El Oro, Ecuador, durante el último trimestre de 2016. *Journal of Marine and Coastal Sciences*, 31-43.
- Mottier, A., Pini, J., & Costil, K. (2014). Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *The Journal of toxicological sciences*, 39(2), 211-215.
- Noel Martinez, K. C., & Oviedo Casariego, J. E. (2019). Actividad antimicrobiana "in vitro" del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) sobre los microorganismos presentes en el pez aguja (*Kajikia audax*).
- Novoa, B., & Figueras, A. (2011). Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. *Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura*, 1-543.
- Ortega, P., & Anthonella, J. (2022). Parásitos en el interior de *Mytella guyanensis*, *Anadara tuberculosa* y *Leukoma asperrima* vendidos en el mercado de La

- Libertad-Santa Elena, Ecuador, octubre–diciembre 2021 (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022).
- Ortega, D. O. C., & Carrillo, J. A. R. (2018) Ciclo de proliferación de cepas bacterianas *Vibrio* spp y *Pseudomonas* spp en juveniles de concha prieta (*Anadara tuberculosa*).
- Prado-Carpio, E., Martínez-Soto, M. E., Rodríguez-Monroy, C., Núñez-Guerrero, Y., Quiñonez-Cabeza, M., Nazareno-Veliz, I., & Castillo-Cabeza, N. (2020). Description of the production chain of the concha prieta Bivalve Mollusc “*Anadara tuberculosa*”. EasyChair Preprint, 3749, 1-10.
- Ramos, E. (2018). Programa concha-cangrejo. Guayaquil: Instituto Público De Investigación De Acuicultura y Pesca. Recuperado el 2022, de <https://www.institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2018/01/FICHA-001-Anadara-tuberculosa.pdf>
- Randrianarivelo, R., Danthu, P., Benoit, C., Ruez, P., Raherimandimby, M., & Sarter, S. (2010). Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. *Journal of applied microbiology*, 109(2), 642-650.
- Retamales, R., Panta-Vélez, R., & Vélez-Cuenca, J. (2014). Inducción al desove de la Concha Prieta *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en condiciones de laboratorio. *Revista La Técnica* (12), 56-63. doi:10.33936/la\_tecnica. v0i12.593
- Rodríguez-Pesantes, D., Reyes, J., Márquez, A., Sonnenholzner, E., & hende, s. v. (2021). Descripción del ciclo de vida temprano y efectos de las dietas de microalgas en el desarrollo larvario y poslarvario del berberecho de manglar *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833). *Aqua culture Research*. doi:<https://doi.org/10.1111/are.15603>
- Romalde, J. L. (2016). Héroe y villanos: bacterias asociadas al cultivo de moluscos. *Revista AquaTIC*, (37).
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolán-Mejía, C., & Gomez-Gil, B. (2001). In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico.

International journal of antimicrobial agents, 17(5), 383–387.  
[https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00308-9](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00308-9)

- Santiago, M. L., Espinosa, A., & del Carmen Bermúdez, M. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32.
- Shan, Z., Wang, M., Zhao, S., Xie, X., Yang, D., & Liu, W. (2021). Cinnamaldehyde exerts prophylactic and therapeutic effects against *Vibrio anguillarum* infection in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) by its direct antimicrobial activity and positive effect on the innate immunity. *Aquaculture*, 538, 736588.
- Sorroza, L. S. (2018). Estudio preliminar de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *Revista AquaTIC*, (49), 1-7.
- Soto-Rodríguez, S., Armenta, M., & Gomez-Gil, B. (2006). Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 255(1-4), 48-54.
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* hatcheries. *PloS one*, 14(1), e0210478.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33(3-4), 273-280.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., ... & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707-2714.

- Velasquez, P., Santacruz, R., Echeverria, E., Yanez, M., & Solano, G. (2018). Disminución/Reducción de la carga bacteriana en la concha negra *Anadara tuberculosa* para consumo humano. *Revista ESPACIOS*, 39(45).
- Vera Izurieta, D., Reyes Villao, G., & Guamán Asencio, J. (2018). Principales Recursos Pesqueros Comerciales de la Provincia de Santa Elena, Ecuador.
- Williams, R. R., Bell, T. A., & Lightner, D. V. (1992). Shrimp antimicrobial testing. II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4(4), 262-270.