

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Inhibición *in vitro* del crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el uso de extracto de ajo y aceite esencial de orégano

PROYECTO INTEGRADOR

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Nicolás Alejandro Bohórquez Jaramillo

Roy Angello Lamilla Ronquillo

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2024

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

In vitro inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* growth by using oregano essential oil and garlic extract

CAPSTONE PROJECT

A Project submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of:

Aquaculture Engineer

Presented by:

Nicolás Alejandro Bohórquez Jaramillo

Roy Angello Lamilla Ronquillo

GUAYAQUIL – ECUADOR

2024

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mi madre Rosa Jaramillo, gracias a su amor, a pesar de todas sus dificultades y desafíos, nunca dudó en mí y siempre soy su prioridad. A mi padre Stalin Bohórquez por su constante ayuda en todas las adversidades y desafíos que fuimos sometidos estos años de carrera. A mi tía Paola Jaramillo por ser una madre más con sus consejos, amor y paciencia. A mi tío David Pérez por ser como un hermano mayor y estar dispuesto a dar los mejores consejos. A mi hermano Isaac Bohórquez por nunca juzgar cada paso dado y siempre brindar un apoyo sin medida. A mis abuelos Jorge y Viena por siempre darme ánimo en cada paso dado. A mi abuela Carmen por siempre cuidarme y bendecirme desde el cielo. Y a Jessica Vallejo, Noemí Pimentel, Jorge Espinoza y Xavier Torres, por continuamente ofrecer su ayuda en diferentes etapas de mi formación personal y profesional.

Nicolás Bohórquez

DEDICATORIA

Dedico este proyecto con mucho amor a mi madre, Inés Ruth Ronquillo León por ser mi fuente de inspiración, cariño, empatía y resiliencia que me permite estar culminando esta etapa maravillosa. A mi papá, Tonny Lamilla (+) por todo el sacrificio y los consejos brindados en vida para hacerme una mejor persona. A mi Mami Ceci (+) por todo el amor y la confianza que depositó en mí siempre. A mis tíos Alfredo y Rosanna que me brindaron el apoyo que necesité en momentos cruciales. A mi hermano Tonny por comprenderme y apoyarme siempre. A mis hermosos sobrinos: Isa, Emi y Joaquín que día a día me recuerdan ese niño que aún habita en mí. A Tolita de mi corazón por brindarme su amor y creer siempre en mis capacidades. A todas las personas que me encontré en este camino y me permitieron aprender de ellas compartiendo sus vivencias y conocimientos conmigo con el objetivo de fomentar mi desarrollo profesional y personal, los recuerdo con mucho cariño.

Roy Lamilla

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos profundamente a nuestra familia por ser el pilar fundamental y formar parte a lo largo del camino que nos permite hoy estar presentes en la culminación de esta carrera. A nuestra tutora, la Dra. Alba Calles Procel, nuestros más sinceros agradecimientos por depositar su fe en nosotros, por brindarnos de su tiempo, por su diligencia y paciencia que permite que hoy estemos culminando una etapa maravillosa de nuestra vida profesional. Muchas gracias a Alyssa y Eduardo que brindaron su apoyo en todo momento. A la Mgtr. Nicole Asqui por toda su ayuda a lo largo del desarrollo de este proyecto. A la M.Sc. Andrea Freire por su guía y colaboración en todo momento. A Leandro, Matías y Adriana por la predisposición a ayudar que mantuvieron siempre. Por último y no menos importante, deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos los docentes que, por medio de su cátedra, permitieron expandir nuestro conocimiento y desarrollar habilidades que nos permiten ser profesionales de excelencia.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación nos corresponden con base al reglamento de propiedad intelectual de la institución: Nicolás Alejandro Bohórquez Jaramillo y Roy Angello Lamilla Ronquillo. Brindamos nuestro consentimiento para que nuestra alma máter, la ESPOL, realice la comunicación pública del siguiente proyecto con el objetivo de fomentar la investigación, la divulgación de información, la consulta y el uso público de la propiedad intelectual”



Nicolás Alejandro Bohórquez Jaramillo



Roy Angello Lamilla Ronquillo

EVALUADORES

Jerry Landívar Zambrano, Ph. D

PROFESOR DE LA MATERIA

Alba Calles Procel, Ph. D

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) ha causado graves pérdidas económicas en la industria camaronera mundial, lo que ha motivado al uso indiscriminado de antibióticos con el objetivo de reducir la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* que constituye uno de los principales causantes de esta enfermedad. Esto ha generado resistencia a diferentes antibióticos comercializados en el mercado. Para contrarrestar esto, pruebas *in vitro* con compuestos de origen botánico, específicamente el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y extracto de ajo (*Allium sativum*) se llevaron a cabo con el objetivo de escoger el tratamiento que mayor efecto antibacteriano brindaba, enfocándose en sus características bacteriostáticas o bactericidas. Colonias de *V. parahaemolyticus* aisladas de hepatopáncreas de camarones *Penaeus vannamei* presentes en laboratorios de la Escuela Superior Politécnica del Litoral fueron utilizadas para conducir pruebas de susceptibilidad antibacteriana bajo la metodología de Kirby-Bauer reflejando al aceite esencial de orégano con diámetros de halos de inhibición superiores a los 35 mm desde una concentración de 50 µg/mL. Además, pruebas de concentración mínima inhibitoria bajo mediciones de absorbancia cada dos horas permitieron constatar y contrastar con los resultados de otros autores bajo similares condiciones de experimentación que el aceite esencial de orégano reveló características bactericidas a partir de 800 µg/mL, debido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol, mientras que el extracto de ajo reflejó características bacteriostáticas a partir de 1000 µg/mL promovido por la presencia de compuestos sulfurados como la alicina. Estos compuestos constituyen una alternativa viable en reemplazo de los antibióticos, por lo que los productores camaroneros podrían replicar esta metodología con el objetivo de poder planificar estrategias y protocolos que permitan tener más eficiencia en sus procesos, reduciendo mortalidades y aumentando las ganancias.

Palabras clave: *Vibrio parahaemolyticus*, aceite esencial de orégano, extracto de ajo, antibiograma, concentración mínima inhibitoria

ABSTRACT

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) has caused significant economic losses in the global shrimp industry, leading to the indiscriminate use of antibiotics to reduce the presence of *Vibrio parahaemolyticus*, one of the major causes of this disease. This has resulted in the development of resistance to various antibiotics available in the market. To counter this, *in vitro* tests with compounds of botanical origin, specifically oregano essential oil (*Origanum vulgare*) and garlic extract (*Allium sativum*), were conducted to select the treatment that provided the greatest antibacterial effect, focusing on their bacteriostatic or bactericidal characteristics. Colonies of *V. parahaemolyticus* isolated from the hepatopancreas of *Penaeus vannamei* shrimp in laboratories at the Escuela Superior Politécnica del Litoral were used to conduct antibacterial susceptibility tests using the Kirby-Bauer methodology. Oregano essential oil exhibited inhibition halo diameters greater than 35 mm at a concentration of 50 µg/mL. Additionally, Minimum Inhibitory Concentration tests, with absorbance measurements taken every two hours, allowed for the confirmation and comparison with results from other studies conducted under similar experimental conditions. Oregano essential oil demonstrated bactericidal characteristics starting from 800 µg/mL, primarily due to the presence of phenolic compounds such as thymol and carvacrol, while garlic extract exhibited bacteriostatic characteristics starting from 1000 µg/mL, promoted by the presence of sulfur compounds such as allicin found in garlic. These botanical compounds offer a viable alternative to antibiotics. Therefore, shrimp producers could implement these *in vitro* analyses to plan strategies and protocols that enhance efficiency in their processes, reducing mortality rates and increasing profits.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, oregano essential oil, garlic extract, antibiogram, minimum inhibitory concentration

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
SIMBOLOGÍA	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 Justificación del problema	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 Género <i>Vibrio</i>	5
1.4.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
1.4.3 Impacto de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
1.4.4 Tratamientos ante la presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6
1.4.5 Compuestos botánicos.....	7
1.4.6 Aceites esenciales	7
1.4.7 Aceite esencial de orégano	8
1.4.8 Extractos naturales	8
1.4.9 Extracto de ajo	9
CAPÍTULO 2	10
2. METODOLOGÍA	10

2.1 Obtención de las colonias de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
2.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma	12
2.4 Concentración mínima inhibitoria	13
2.5 Concentración mínima bactericida	14
2.6 Procesamiento y análisis de datos	14
CAPÍTULO 3	15
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	15
3.1 Colonias de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
3.2 Susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma	16
3.3 Concentración mínima inhibitoria	17
3.4 Concentración mínima bactericida	21
3.5 Costos asociados a la experimentación	27
4. Conclusiones y recomendaciones	28
4.1 Conclusiones	28
4.2 Recomendaciones	29
BIBLIOGRAFÍA	31

SIMBOLOGÍA

mL	Mililitro
µg	Microgramo
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
UFC	Unidades formadoras de colonias
>	Mayor que
<	Menor que
%	Porcentaje
L	Litros
µL	Microlitros
mm	Milímetros
C-	Control negativo
AEO	Aceite esencial de orégano
EA	Extracto de ajo
P-value	Valor p
MIC	Concentración mínima inhibitoria

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Tubos ensayos con dosificaciones para el aceite esencial de orégano y extracto de ajo.....	
Figura 2.1 <i>V. parahaemolyticus</i> en agar TCBS, aislado de muestras de <i>Penaeus vannamei</i>	
Figura 3.1 <i>V. parahaemolyticus</i> en agar Mueller Hinton con sensidiscos por tratamientos con aceite esencial de orégano y extracto de ajo.....	
Figura 4.1 Colonias de <i>V. parahaemolyticus</i> en agar TCBS, correspondiente al C-.....	
Figura 5.1 Colonias de <i>V. parahaemolyticus</i> en agar TCBS, correspondiente al AEO3.....	
Figura 6.1 Colonias de <i>V. parahaemolyticus</i> en agar TCBS, correspondiente al AEO4.....	
Figura 7.1 Colonias de <i>V. parahaemolyticus</i> en agar TCBS, correspondiente al AEO5.....	
Figura 8.1 Absorbancia a través del tiempo de tratamientos con aceite esencial de orégano (AEO) y control (C-).....	
Figura 9.1 Absorbancia a través del tiempo (horas) de tratamientos con Extracto de ajo (EA) y control (C-).....	

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Concentración en $\mu\text{g/mL}$ y nomenclatura para distintos tratamientos acorde a cada compuesto botánico utilizado en la experimentación.....
- Tabla 2. Halos de inhibición en milímetros por distintos tratamientos de aceite esencial de orégano (AEO), extracto de ajo (EA), antibiótico de amplio espectro y control sin algún tipo de inhibidor o bactericida.....
- Tabla 3. Absorbancia a través del tiempo (horas) de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) con *V. Parahaemolyticus*, medio TSB solo con bacteria (C-), control de asepsia del aceite esencial de orégano (C+) y antibiótico de amplio espectro.....
- Tabla 4. Absorbancia a través del tiempo (horas) de diferentes concentraciones de extracto de ajo (EA) con *V. Parahaemolyticus*, medio TSB solo con bacteria (C-), control de asepsia del extracto de ajo (C+) y antibiótico de amplio espectro.....
- Tabla 5. Valores de absorbancia (Promedio \pm desviación estándar) de *V. parahaemolyticus* con tratamientos de aceite esencial de orégano (AEO) luego de 22 horas de incubación.....
- Tabla 6. Valores de absorbancia (Promedio \pm desviación estándar) de *V. parahaemolyticus* con tratamientos de extracto de ajo (EA) luego de 22 horas de incubación.....
- Tabla 7. Cantidad y costos de materiales utilizados en el desarrollo del proyecto integrador.....
- Tabla 8. Laboratorios con equipos específicos para el desarrollo de la metodología.....

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El mundo ha sido testigo de un incremento significativo en la acuicultura global (Chen *et al.*, 2022). Durante las décadas de 1990 al año 2020, se ha registrado una expansión de la producción anual de la acuicultura mundial en, aproximadamente, un 609%, teniendo un crecimiento anual de 6.7% (FAO, 2022), sobre todo en la última década en el que se ha convertido en el sector alimentario con mayor con la mejor tasa de aumento (Yue & Shen, 2022).

Para el año 2050, se prevé que la producción acuícola duplique a la del año 2010, es decir, exista una cantidad de 140 millones de toneladas de acuerdo a las proyecciones (Henares *et al.*, 2020). Sumado a esto, esta práctica también genera oportunidades laborales, ingresos y representa el 50% del consumo de pescado (Shah & Mraz, 2020). Este incremento ha sido obtenido a causa de la tecnificación desde los sistemas desde lo extensivo a lo súper intensivo (Hasan *et al.*, 2019). La acuicultura se ha posicionado como una solución viable, proporcionando una fuente confiable de proteínas y nutrientes para millones de personas en todo el mundo (Milko, 2023).

En Ecuador, la acuicultura se desarrolló, en sus inicios, en zonas de manglar que ante la aparición de enfermedades y política ambiental obligaron a buscar nuevas tierras (López *et al.*, 2023). Las aguas ecuatorianas, ricas en biodiversidad marina, han propiciado un aumento significativo en la producción de peces, mariscos y otros organismos acuáticos (FAO, 2024). Esto ha generado oportunidades económicas para las comunidades locales y ha contribuido al desarrollo económico del país “Los productos acuícolas representan el 52% de las exportaciones no petroleras y no mineras del Ecuador. Entre enero y julio de 2022 estos

productos sumaron USD 5 581 millones, de los USD 10 767 millones vendidos fuera del país.” (Lucía Vásconez, 2022). No obstante, este crecimiento también ha planteado desafíos, especialmente en términos de mantener altos estándares de calidad en productos acuícolas (Saha, 2024).

Uno de los aspectos críticos en la acuicultura es la calidad del sistema en el que se crían los organismos acuáticos (Angel *et al.*, 2019). Los requerimientos de calidad son fundamentales para garantizar un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo de los cultivos acuícolas (Bórquez, n.d.). Factores como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto y la salinidad son vitales para el bienestar de los organismos acuáticos y, por ende, para la producción exitosa en la acuicultura (Marium *et al.*, 2023).

Así mismo, el desafío que enfrentan los productores acuícolas es la mortalidad en el cultivo por vibriosis, una enfermedad causada por *Vibrio parahaemolyticus*, esta bacteria comúnmente se encuentra en aguas marinas y estuarinas (Ponce, 2023). La prevención y tratamiento de la vibriosis involucran principalmente el empleo de antibióticos (Angulo *et al.*, 2019). Sin embargo, un manejo inadecuado de las enfermedades y la persistente administración de antibióticos en los cultivos acuícolas contribuyen al surgimiento de cepas de vibrios resistentes (Peña, 2019). En la actualidad, la resistencia bacteriana a múltiples antibióticos representa una preocupación significativa y se ha convertido en un grave problema que pone en peligro la práctica médica contemporánea (Ramadhaniah *et al.*, 2023)

1.1 Descripción del problema

Sumado al crecimiento de la acuicultura, la contaminación del agua ha reflejado uno de los principales problemas ambientales que esta genera (Carballeira Braña *et al.*, 2021). El entorno acuático proporciona un caldo de cultivo ideal para el crecimiento bacteriano, las condiciones variables del agua, como la temperatura y la salinidad, junto con la presencia de materia orgánica, facilitan la proliferación de diversas bacterias. Hallazgos han permitido descubrir que

la temperatura superficial del mar y la salinidad se han convertido en variables clave que aumentan la presencia de estos (Ndraha *et al.*, 2022).

La industria del camarón posee mayores desafíos que la de peces debido a que estos presentan un sistema inmune adquirido y no pueden ser vacunados (Thornber *et al.*, 2020). Debido a esto, enfermedades como la vibriosis, se ha convertido en una de las enfermedades más comunes en la acuicultura, así como a individuos salvajes (Sanches-Fernandes *et al.*, 2022). Esta enfermedad está alineada a la presencia de infecciones en peces con signos clínicos como úlceras en la piel y necrosis en la aleta caudal (Mohamad *et al.*, 2019). En líneas generales, otros signos clínicos asociados incluyen letargo, pérdida de apetito y, en casos graves, la muerte de los animales afectados (Zermeño-Cervantes *et al.*, 2023).

Diversos reportes han revelado pérdidas asociadas a enfermedades infecciosas y parasitarias desde 1.05 a 9.58 billones/de dólares por año (Gonzales *et al.*, 2020). De acuerdo con (De Souza Valente & Wan, 2021), diversos países incluyendo a China, Malasia, México, Tailandia y Vietnam han acumulado 44 billones entre 2010 y 2016 asociadas a la presencia de AHPND. Las pérdidas económicas son significativas, ya que los productores se enfrentan a altas tasas de mortalidad en sus cultivos y a una disminución en la calidad de los productos finales (Yu *et al.*, 2022).

Los antibacterianos han surgido como herramienta para las enfermedades causadas por bacterias, mismos que han desarrollado patógenos resistentes causando infecciones en animales y en el ser humano (Devadas *et al.*, 2024). Esta resistencia representa una preocupación adicional, ya que limita las opciones de tratamiento efectivo y agrava aún más el problema (Salas *et al.*, 2021).

1.2 Justificación del problema

Abordar el crecimiento bacteriano desenfrenado y la propagación del *V. parahaemolyticus* en la acuicultura ecuatoriana es esencial para preservar la industria, garantizar la seguridad alimentaria, combatir la resistencia a los antibióticos y proteger el delicado equilibrio de los ecosistemas marinos. Es una necesidad apremiante que requiere de un control preventivo, mediante la investigación y aplicación de compuestos que inhiban el crecimiento de bacterias patógenas favoreciendo al crecimiento sostenible de la acuicultura.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de compuestos botánicos *in vitro* como inhibidores del crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*

1.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antibacteriano de los compuestos botánicos mediante pruebas de susceptibilidad antibacteriana bajo el método de difusión en disco de Kirby Bauer.
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y extracto de ajo (*Allium sativum*), bajo el método de microdilución en caldo.
3. Evaluar la dinámica del crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* por medio de técnicas de recuento y visualización microbiológica post hoc.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Género *Vibrio*

El género *Vibrio* corresponde a un grupo de bacterias Gram negativas que se encuentran en ambientes acuáticos (Liu *et al.*, 2024) (Xu *et al.*, 2024). Diversas especies de *Vibrio* como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. anguillarum* han reflejado ser patogénicos para los camarones (Yildirim-Aksoy *et al.*, 2022). Estas bacterias ejercen un rol de patógenos oportunistas de animales marinos y humanos. Son anaerobios facultativos, es decir, poseen metabolismo fermentativo y respiratorio (Purgar *et al.*, 2023). Por lo general, se encuentran adheridas al plancton de agua de mar o estuarina (Molina-Quiroz *et al.*, 2023).

1.4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Son bacterias Gram negativas, con forma de bastón curvado y a veces recto, oxidasa positivos, anaerobias facultativas (Haque *et al.*, 2023). Esta especie de bacterias habitan ambientes marinos con diversas salinidades y es causante de varias enfermedades que afectan a peces y crustáceos (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2019). Abarca cepas con una alta diversidad metabólica capaces de sobrevivir en condiciones de temperatura, salinidad y pH variables en entornos marinos y estuarinos (De Souza Valente & Wan, 2021). Las cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* contienen específicamente el plásmido pVA1, el cual codifica las toxinas PirA y PirB, cuyo efecto citotóxico consiste en la formación de poros en las membranas de sus células, provocando su muerte por lisis osmótica (Hernández-Cabanyero *et al.*, 2023). Además, esta especie posee un extenso catálogo de factores de virulencia, adhesinas y efectores relacionados con la citotoxicidad y la entero toxicidad (Fasulkova & Stratev, 2024) (L. Zhang & Orth, 2013).

1.4.3 Impacto de *Vibrio parahaemolyticus*

Contantemente, *V. parahaemolyticus* ha provocado enfermedades a un sinnúmero de variedades de especies acuáticas incluyendo almejas, pulpos, camarones, cangrejos,

langostas, mejillones, ostras y peces como la tilapia, bacalao, sardinas, entre otros (De Silva & Heo, 2022).

Una enfermedad causada por cepas de *V. parahaemolyticus* que afecta a los crustáceos, específicamente los camarones, es la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND por sus siglas en inglés) o antiguamente conocida como el Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS) (Yang *et al.*, 2022). Los individuos que poseen esta enfermedad presentan signos clínicos como letargia y anorexia, con tractos digestivos vacíos y pérdida de la pigmentación de sus tejidos (Zheng *et al.*, 2018). Microscópicamente se visualiza un desprendimiento de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas mientras que por medio de histología se puede observar el epitelio completamente necrosado junto a una infiltración de hemocitos en el tejido intratubular (Kumar *et al.*, 2021). Reportes de AHPND se han registrado en Corea, causando graves pérdidas económicas al sector (Han *et al.*, 2020).

1.4.4 Tratamientos ante la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*

La aplicación de antibióticos al balanceado de peces y camarones en sistemas de producción intensivos y semi intensivos con el fin de controlar y prevenir el esparcimiento de enfermedades ha repercutido en el desarrollo de cepas resistentes provocando que los tratamientos con antibióticos cada vez sean más ineficaces o se requieran concentraciones más altas a adicionar para hacer frente a estos inconvenientes (F. Zhang *et al.*, 2024). De acuerdo con (Sotomayor *et al.*, 2019), los antibióticos se utilizan ampliamente como profilácticos contra patógenos bacterianos. Sin embargo, el uso de antibióticos conlleva importantes desventajas, como la presencia de residuos en los productos de acuicultura, el desarrollo y la propagación de resistencia entre patógenos, incluidos los patógenos humanos (Stratev *et al.*, 2023). Por estas razones, la regulación de los antibióticos está rigurosamente controlada, lo que resulta en la autorización de solo unos pocos antibióticos para su uso en acuicultura (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). Los antibióticos aprobados por la FDA

corresponden, principalmente al florfenicol, oxitetraciclina, formalina, peróxido de hidrógeno, sulfamerazina y la combinación de sulfadimetoxina ormetropim (FDA, 2022).

1.4.5 Compuestos botánicos

De acuerdo con (Martins *et al.*, 2020), en búsqueda de tratamientos alternativos contra las enfermedades de animales acuáticos, se han puesto en foco de atención compuestos medicinales de origen botánico, específicamente, extractos de plantas y aceites esenciales para controlar parásitos y enfermedades bacterianas. El uso de compuestos derivados de plantas medicinales en el campo de la acuicultura se ha incrementado a través del tiempo debido a que presentan propiedades biodegradables (Srichaiyo *et al.*, 2020).

(Myint *et al.*, 2022) sostienen que la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de plantas está estrechamente relacionada con la presencia de componentes fitoquímicos como saponinas, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y terpenoides. Los motivos principales por los que se usan corresponden a que no presentan residuos en tejidos animales (Alagawany *et al.*, 2021).

1.4.6 Aceites esenciales

Los aceites esenciales corresponden a productos secundarios derivados de plantas medicinales y han sido utilizados como agentes fitoterapéuticos gracias a sus propiedades bioactivas (Magouz *et al.*, 2021). Muchos de esos compuestos contienen un anillo aromático, como los monoterpenos fenólicos timol y carvacrol, o los propenos fenólicos (Cho *et al.*, 2020). Aceites esenciales como el de orégano, canela, árbol de té, entre otros, han sido utilizados en la acuicultura con la finalidad de aprovechar sus propiedades para favorecer la producción acuícola y prevenir enfermedades. Los aceites esenciales han demostrado tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antifúngicas que pueden actuar como una alternativa viable al uso de drogas o aditivos en la producción acuícola (Wickramanayake *et al.*, 2023). Varios de los beneficios de estos aceites esenciales en especies acuícolas son atribuibles a posibles

causas como el incremento del apetito de las especies y la modificación del microbioma intestinal para promover los genes asociados al sistema inmune (Ahmadifar *et al.*, 2021).

1.4.7 Aceite esencial de orégano

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta que pertenece a la familia Lamiaceae. Los aceites esenciales extraídos de sus hojas presentan propiedades antibacterianas debido a su principal componente, el carvacrol. La acción antibacteriana del carvacrol, que es más fuerte contra las bacterias Gram positivas que contra las Gram negativas, se basa principalmente en el daño de la membrana bacteriana; da como resultado la disolución de la fuerza motriz del protón y la posterior reducción de la síntesis de ATP, lo que conduce a la reducción de otros procesos celulares dependientes de energía, incluida la síntesis de enzimas y toxinas (Nostro & Papalia, 2011). En tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la inclusión de aceite esencial de orégano ha brindado beneficios en favor de la respuesta inmune, oxidativa y la tasa de crecimiento (Heluy *et al.*, 2020), por lo que la incorporación de aceite esencial de orégano es ideal para lidiar con los impactos en altas densidades de siembra en tilapia del Nilo (Shourbela *et al.*, 2021).

Los compuestos fenólicos presentes en el ajo como lo son el timol y el carvacrol han reflejado modular la inmunidad a través de dos potenciales vías como la influencia a través de la comunidad microbiana intestinal y la acción directa en el tejido del hospedador (Zhang *et al.*, 2020).

1.4.8 Extractos naturales

Los extractos de plantas medicinales presentan sustancias antimicrobianas que actúan frente a diferentes bacterias que causan una diversidad de enfermedades en animales acuáticos (X. Zhang *et al.*, 2020). Esto también reduce el riesgo de formar patógenos resistentes y reducir los costos económicos a los productores cuando se comparan con químicos tradicionales (Chong, 2020). Estudios han demostrado que la inclusión de hierbas y

sus extractos promueven la resistencia frente a condiciones ambientales desfavorables (Adel *et al.*, 2020). En la acuicultura, diferentes vías de administración de extractos derivados de plantas han sido utilizados, tales como la inyección intraperitoneal, la inmersión o el suministro vía oral siendo este el método más ideal debido a que no genera estrés en los animales (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023b).

1.4.9 Extracto de ajo

El ajo (*Allium sativum*) es un alimento ampliamente consumido alrededor del mundo que presenta un sinnúmero de beneficios medicinales como propiedades antifúngicas, antisépticas, antivirales y antiparasitarias gracias a la presencia de alicina (Shekarabi *et al.*, 2022). Sus bulbos, que comúnmente se conocen como dientes, contienen alicina (Savairam *et al.*, 2023). La alicina es un compuesto organosulfurado y corresponde al principal ingrediente activo del ajo (Jikah & Edo, 2023). La alicina se forma por la reacción de la enzima alinasa y la aliina presente en el ajo (Adineh *et al.*, 2020). El principal efecto antimicrobiano de la alicina se debe a su reacción química con los grupos tiol de varias enzimas, como el alcohol deshidrogenasa, tioredoxina reductasa y ARN polimerasa (Ankri & Mirelman, 1999). Varias presentaciones del ajo han mostrado un amplio espectro de actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Marchese *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Obtención de las colonias de *Vibrio parahaemolyticus*

Las bacterias de la especie *Vibrio parahaemolyticus* fueron suministradas por el Laboratorio de Biomedicina situado en la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Dichas colonias bacterianas fueron aisladas de hepatopáncreas de camarones muestreados de una granja dedicada al cultivo y comercialización de este crustáceo en la zona del estuario del río Guayas.

Se procedió a la resiembra de colonias de *V. parahaemolyticus* en placas Petri con medios de cultivo selectivo para bacterias del género *Vibrio* compuestos por agar TCBS (Tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa) y medios cromogénicos. En primera instancia, se realizó la siembra en agar cromogénico, luego se incubaron estas placas por 24 horas a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ con el objetivo de poder descartar la presencia de otras especies del género *Vibrio*. Se descartó la cepa más antigua de julio del 2023 por su falta de crecimiento activo en la experimentación pese a permanecer incubada durante un tiempo prolongado.

2.2 Preparación del extracto de ajo y obtención del aceite de orégano

Como parte de la preparación del extracto de ajo (*Allium sativum*), se decidió adaptar la metodología descrita por (Ramadhaniah *et al.*, 2023) que consistió en la trituración y macerado del ajo usando etanol 96% como solvente a una proporción de 1:2 por 24 horas. Este proceso se realizó tres veces. El resultado de la maceración fue evaporado por medio de una estufa a 80°C hasta lograr visualizar un concentrado con una coloración café oscura y un olor característico propio del ajo, sin rezagos olfativos de alcohol. Posterior a ello, 10 gramos de

extracto fueron diluidos con agua destilada estéril a concentraciones (Tabla 1). Las diluciones fueron colocadas en tubos de ensayo estériles y almacenadas a 2° C por cuatro horas. El aceite de orégano fue adquirido a través de una compañía dedicada a la venta y distribución de distintos agentes botánicos que son extraídos naturalmente y sin la adición de preservantes. El volumen obtenido fue de 15 mL y la composición química fue suministrada por el vendedor asegurando un 75% mínimo de carvacrol como principio activo de este aceite esencial.

Se obtuvieron las distintas concentraciones de los compuestos botánicos a testearse y fueron colocados en tubos de ensayo con su respectiva rotulación indicando su concentración en µg/mL con el objetivo de poder utilizarlos para los procesos siguientes donde el extracto de ajo fue diluido con agua destilada, mientras que el aceite esencial de orégano por etanol (Figura 1).

Tabla 1. Concentración en µg/mL y nomenclatura para distintos tratamientos acorde a cada compuesto botánico utilizado en la experimentación

Compuesto botánico	Tratamiento	Dosificación (µg/mL)
Aceite esencial de orégano	AEO1	50
Aceite esencial de orégano	AEO2	250
Aceite esencial de orégano	AEO3	500
Aceite esencial de orégano	AEO4	800
Aceite esencial de orégano	AEO5	1000
Extracto de ajo	EA1	50
Extracto de ajo	EA2	1000
Extracto de ajo	EA3	2000
Extracto de ajo	EA4	3000
Extracto de ajo	EA5	3500

Nota. Los solventes utilizados para el aceite de orégano y extracto de ajo fueron etanol 96% y agua destilada, respectivamente

Figura 1.

Tubos ensayos con dosificaciones para el aceite esencial de orégano y extracto de ajo



Nota. La figura muestra las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano y extracto de ajo contenidas en tubos de ensayo

Autor: Bohórquez, 2023

2.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma

Para la prueba de susceptibilidad antibacteriana, se decidió emplear la metodología descrita por (Hudzicki, 2009) y, además, teniendo en consideración las observaciones realizadas por (Ramírez & Marin, 2009) para la evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Previamente, se preparó agar Müeller Hinton y se colocó en las distintas placas Petri a utilizar para este estudio. Estas placas permanecieron en refrigeración hasta su uso. Además, se procedió a realizar un estándar de McFarland 0.5 con el objetivo de poder obtener una turbidez referencial y, a su vez, estandarizar las concentraciones de bacterias para el antibiograma. Para ello fue necesario la adición de 0.05 mL de solución de

cloruro de bario (1.175%) y 9.95 mL de ácido sulfúrico (1%) en un tubo de ensayo de 10 mL. Posteriormente, se preparó la suspensión bacteriana colocando una pequeña cantidad de las colonias malva rosa previamente aisladas en un tubo de ensayo estéril con 10 mL de solución salina al 2% hasta lograr una turbidez semejante al estándar 0.5 de McFarland. Se procedió a comprobar espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 625 nm, que la absorbancia de la suspensión bacteriana se encuentre en el rango de 0.08 a 0.13 permitiendo inferir que la suspensión bacteriana posee 1.5×10^8 UFC/mL. Por medio de hisopos estériles, se realizó la siembra de una alícuota de la suspensión bacteriana en las distintas placas con agar Müller Hinton por el método de barrido por agotamiento. Discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron impregnados con 10, 15, 25, 50 y 100 μ L de extractos de ajo y orégano, y colocados a razón de 2 discos por cada placa Petri y a una separación entre sí de 24 mm centro a centro. Las distintas placas fueron incubadas a $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se situaron las distintas placas en un fondo oscuro no reflectivo y por medio de un calibrador Vernier se procedió a medir los distintos halos de inhibición formados para su posterior análisis.

2.4 Concentración mínima inhibitoria

Las colonias de bacterias se incubaron a 30°C durante 4 horas. Luego, se suspendieron las bacterias con medio líquido TSB ajustándose al estándar 0.5 de McFarland para luego diluirlo hasta una densidad aproximada de 10^6 UFC/mL. Posteriormente, se procedió a diluir el aceite de orégano y extracto de ajo en etanol 95% y agua destilada estéril, respectiva. Luego, se añadió caldo de cultivo TSB con una solución de NaCl al 2%. Se distribuyeron 20 μ L de suspensión bacteriana en los distintos pocillos de una microplaca Elisa junto a 20 μ L de los diferentes extractos utilizados a concentraciones de 50, 250, 500, 800, 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 500, 1000, 2000, 3000 y 3500 $\mu\text{g/mL}$ de aceite de orégano y extracto de ajo, respectivamente. Adicional, se añadieron 160 μ L de caldo TSB con cloruro de sodio al 2%. Se colocó un control

positivo y negativo que consistieron en suspensión bacteriana en caldo TSB con cloruro de sodio 2% y los respectivos compuestos botánicos. Cada tratamiento incluyó tres réplicas.

La microplaca fue incubada a una temperatura de 30°C y las lecturas de densidad óptica fueron realizadas a 620 nm cada dos horas.

2.5 Concentración mínima bactericida

Se procedió a sembrar 100 µL provenientes de cada pocillo de la microplaca Elisa en agar TSB (*Trypticase Soy Broth*). Posteriormente, se incubó a una temperatura de 30° C por un lapso de 24 a 48 horas. Finalmente, se realizó el conteo de colonias mediante la visualización de las diferentes placas Petri con sus respectivos tratamientos en un contador de colonias con luz directa.

2.6 Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos de los distintos tratamientos testeados, así como sus respectivos controles fueron graficados en un diagrama Absorbancia vs Tiempo y, posteriormente analizados por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA). La hipótesis nula fue rechazada con un valor ($p < 0.05$). Los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de todos los tratamientos fueron constatados mediante el test de Barlett y Shapiro-Wilk, respectivamente. Con el fin de hallar diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó un test de comparaciones múltiples de Tukey-Honest. Todas las pruebas estadísticas y gráficos mencionados previamente fueron analizadas por medio del software R-Studio.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Colonias de *Vibrio parahaemolyticus*

La cepa de *V. parahaemolyticus* correspondiente al mes de octubre del presente año presentó un crecimiento activo al momento de realizar la resiembra, permitiendo poder utilizarla para las pruebas posteriores con total normalidad, mientras que la cepa perteneciente al mes de no presentó un crecimiento activo en las horas que fue incubada (Figura 2). Lo cual podría atribuirse a que las bacterias en esta placa Petri ya habían atravesado su fase estacionaria y entrado en la fase final debido al agotamiento de nutrientes, en parte, debido al tiempo en que llevaban siendo reactivadas.

Figura 2.

V. parahaemolyticus en agar TCBS, aislado de muestras de *Penaeus vannamei*



Nota. La figura muestra placas Petri con colonias bacterianas de color verde con bordes translúcidos

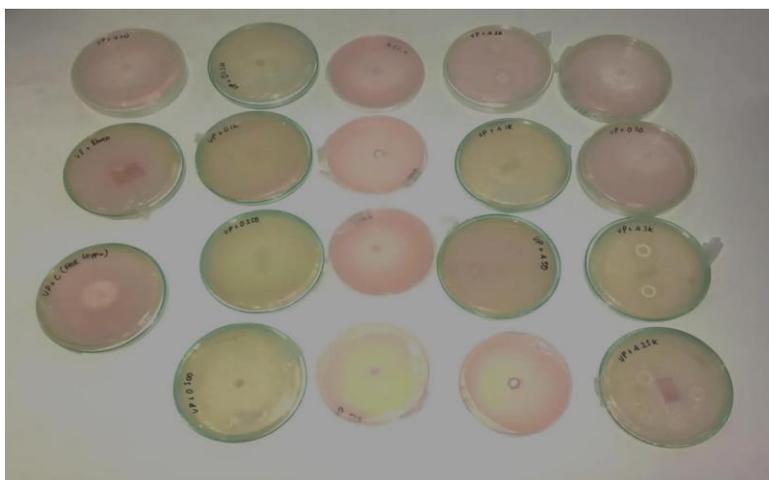
Autor: Lamilla, 2023

3.2 Susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana reflejaron la formación de diferentes halos de inhibición contra *V. Parahaemolyticus* (Figura 3). Los datos fueron tabulados, evidenciando que los tratamientos con aceite esencial de orégano reflejaron diámetros de halos de inhibición mayores comparados a los halos de inhibición de los tratamientos con extracto de ajo y el antibiótico utilizado. Los tratamientos con ajo no fueron tan efectivos ya que no superaron en diámetro del halo de inhibición al antibiótico. Con base a los resultados obtenidos, se escogieron los dos tratamientos con mejores resultados (AEO4 y EA3) para formar una mezcla (50% EA3 y 50% AEO4) denominada A+O, este tratamiento mostró un diámetro mayor (32.670 mm) que el antibiótico (23 mm), relativamente cercano del diámetro de los tratamientos con orégano (>35 mm) que permite inferir que la inclusión de estos compuestos brinda una respuesta antibacteriana en reemplazo del florfenicol, antibiótico reconocido de amplio uso en la industria acuícola.

Figura 3.

V. parahaemolyticus en agar Mueller Hinton con sensidiscos por tratamientos con aceite esencial de orégano y extracto de ajo



Nota. La figura muestra cada una de las placas Petri correspondientes al antibiograma con sus respectivos halos de inhibición

Autor: Bohórquez, 2023

Tabla 2. Halos de inhibición en milímetros por distintos tratamientos de aceite esencial de orégano (AEO), extracto de ajo (EA), antibiótico de amplio espectro y control sin algún tipo de inhibidor o bactericida.

Tratamientos	Diámetro halo de inhibición (mm)
C-	0
Antibiótico	23
AEO1	36.035
AEO2	35.675
AEO3	35.260
AEO4	38.120
AEO5	37.110
EA1	<10
EA2	12.405
EA3	12.415
EA4	14.895
EA5	13.785
A + O	32.670

Nota. La medición de los halos de inhibición fue realizada por medio del uso de un calibrador Vernier

Autor: Lamilla, 2023

3.3 Concentración mínima inhibitoria

Las lecturas de absorbancia de la microplaca ELISA fueron registradas en dos tablas, cada una por tratamiento con aceite esencial de orégano y extracto de ajo (Tabla 3, 4). Con respecto al orégano, todos los tratamientos después de la primera lectura disminuyeron su absorbancia hasta estabilizarse en aproximadamente un lapso de 6 horas donde los tratamientos con más concentración de aceite esencial de orégano reflejaron una menor medida en la absorbancia, o sea, menor presencia de bacterias respecto a la primera lectura

conforme pasa el tiempo dado que la absorbancia es similar al crecimiento bacteriano en UFC/mL (Tabla 3).

Por otro lado, los tratamientos con extracto de ajo reflejaron un comportamiento estable con respecto a la primera lectura, es decir, la absorbancia medida oscilaba cercanamente entre los mismos valores sin variar demasiado, a diferencia del tratamiento EA1 que no reflejó una disminución en la concentración bacteriana, más bien aumentó su absorbancia, lo que refleja que la concentración es muy baja y se permite inferir que no brinda un efecto antibacteriano ideal a diferencia de las demás concentraciones.

Tabla 3. Absorbancia a través del tiempo (horas) de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) con *V. Parahaemolyticus*, medio TSB solo con bacteria (C-), control de asepsia del aceite esencial de orégano (C+) y antibiótico de amplio espectro.

Tratamiento	Tiempo (horas)					
	0	2	4	6	22	24
AEO1	1.695	0.905	0.749	0.759	0.801	0.801
AEO1	1.388	0.587	0.468	0.446	0.358	0.360
AEO1	1.600	1.075	0.784	0.766	0.765	0.763
AEO2	1.653	0.802	0.706	0.716	0.769	0.767
AEO2	1.442	0.637	0.438	0.384	0.342	0.334
AEO2	1.699	1.089	0.595	0.580	0.592	0.587
AEO3	1.567	0.631	0.573	0.607	0.690	0.682
AEO3	1.475	0.606	0.429	0.407	0.364	0.357
AEO3	1.491	0.849	0.458	0.422	0.380	0.364
AEO4	1.672	1.546	1.303	1.171	1.085	1.078
AEO4	1.644	1.483	1.165	1.050	0.971	0.967
AEO4	1.660	1.434	1.184	1.071	1.004	0.992
AEO5	1.522	1.409	1.304	1.237	1.115	1.108
AEO5	1.358	1.132	1.144	1.111	1.069	1.070
AEO5	1.295	0.756	0.670	0.567	0.427	0.414
CONTROL -	0.080	0.612	0.816	0.945	0.947	0.945
CONTROL -	0.072	0.623	0.816	0.900	0.915	0.930
CONTROL -	0.080	0.616	0.767	0.969	0.968	0.971
CONTROL +	0.195	0.197	0.199	0.174	0.165	0.166
CONTROL +	0.178	0.180	0.188	0.195	0.188	0.192
CONTROL +	0.169	0.169	0.190	0.189	0.179	0.181
Antibiótico1	0.052	0.089	0.052	0.069	0.055	0.069
Antibiótico2	0.049	0.051	0.052	0.052	0.062	0.059
Antibiótico3	0.056	0.062	0.057	0.066	0.059	0.059

Nota. Cada tratamiento incluyó tres réplicas

Tabla 4. Absorbancia a través del tiempo (horas) de diferentes concentraciones de extracto de ajo (EA) con *V. Parahaemolyticus*, medio TSB solo con bacteria (C-), control de asepsia del extracto de ajo (C+) y antibiótico de amplio espectro.

Tratamiento	Tiempo (horas)					
	0	2	4	6	22	24
EA1	0.084	0.349	0.290	0.287	0.396	0.398
EA1	0.091	0.340	0.511	0.443	0.502	0.505
EA1	0.089	0.197	0.401	0.346	0.483	0.474
EA2	0.075	0.084	0.090	0.086	0.117	0.119
EA2	0.104	0.114	0.123	0.112	0.132	0.127
EA2	0.079	0.087	0.081	0.079	0.082	0.082
EA3	0.080	0.079	0.078	0.080	0.102	0.101
EA3	0.082	0.079	0.079	0.076	0.095	0.096
EA3	0.096	0.135	0.131	0.131	0.090	0.087
EA4	0.074	0.106	0.112	0.105	0.123	0.128
EA4	0.083	0.087	0.090	0.102	0.118	0.122
EA4	0.083	0.101	0.098	0.100	0.121	0.122
EA5	0.074	0.085	0.087	0.086	0.109	0.108
EA5	0.073	0.079	0.080	0.072	0.081	0.077
EA5	0.076	0.099	0.086	0.089	0.090	0.089
CONTROL -	0.080	0.612	0.816	0.945	0.947	0.945
CONTROL -	0.072	0.623	0.816	0.900	0.915	0.930
CONTROL -	0.080	0.616	0.767	0.969	0.968	0.971
CONTROL +	0.153	0.170	0.170	0.179	0.169	0.171
CONTROL +	0.148	0.157	0.184	0.160	0.177	0.166
CONTROL +	0.147	0.152	0.159	0.179	0.177	0.182
Antibiotico1	0.052	0.089	0.052	0.069	0.055	0.069
Antibiotico2	0.049	0.051	0.052	0.052	0.062	0.059
Antibiotico3	0.056	0.062	0.057	0.066	0.059	0.059

Nota. Cada tratamiento incluyó tres réplicas

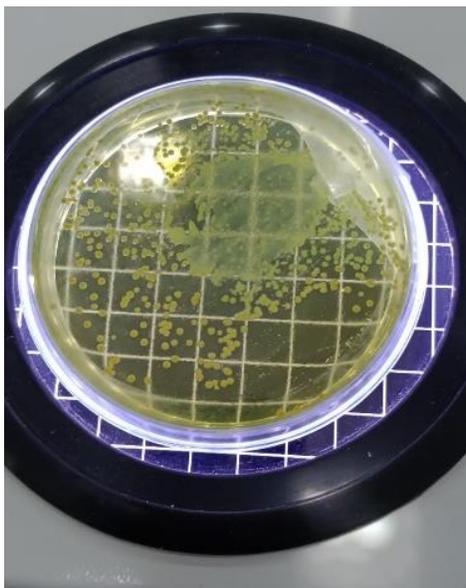
Autor: Lamilla, 2023

3.4 Concentración mínima bactericida

La reducción en la absorbancia de los diferentes tratamientos de aceite esencial de orégano se encuentra entre AEO3, AEO4 y AEO5. Para el control negativo (C-) se observa un gran crecimiento de colonias consecuente a la inexistencia de tratamiento alguno, lo que nos indica que sí hay un crecimiento activo de las colonias de *Vibrio* (Figura 4). Así mismo, en el tratamiento AEO3 se logró efectuar el recuento de un mínimo de colonias bacterianas en las siembras en agar posteriores, mostrando una reducción de colonias gracias a este tratamiento y permitiendo inferir que realmente existió un efecto inhibitorio del crecimiento de *Vibrio* (Figura 5). En lo que compete a los tratamientos AEO4 y AEO5, no se logró observar un crecimiento de colonias verdes en el agar TCBS dentro del rango determinado por la metodología, lo que permite sugerir que la concentración bactericida corresponde a las concentraciones de estos tratamientos (Figura 6, 7).

Figura 4.

Colonias de V. parahaemolyticus en agar TCBS, correspondiente al C-

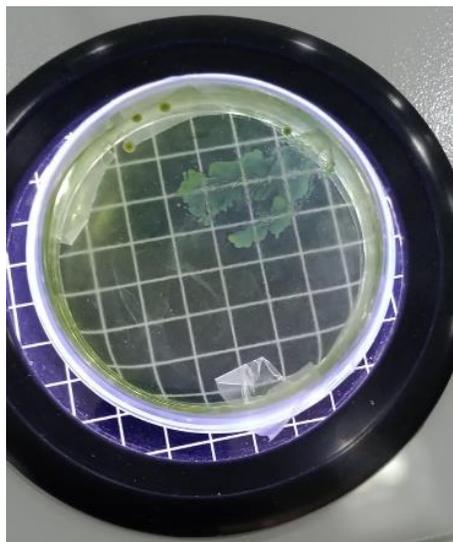


Nota. La figura muestra un crecimiento activo de las colonias bacterianas

Autor: Bohórquez, 2023

Figura 5.

Colonias de V. parahaemolyticus en agar TCBS, correspondiente al AEO3

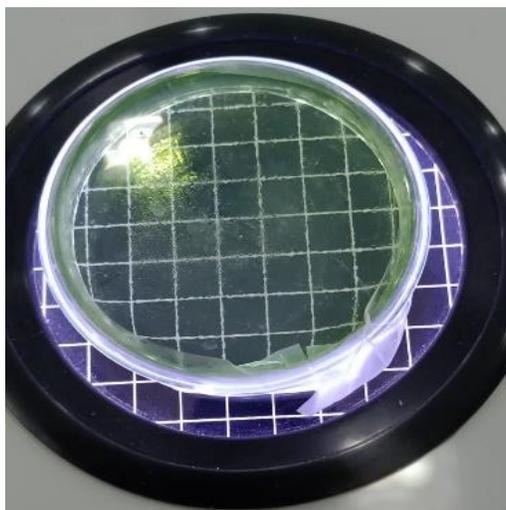


Nota. La figura muestra un crecimiento mínimo de colonias bacterianas en placas Petri con agar TCBS

Autor: Bohórquez, 2023

Figura 6.

Colonias de V. parahaemolyticus en agar TCBS, correspondiente al AEO4

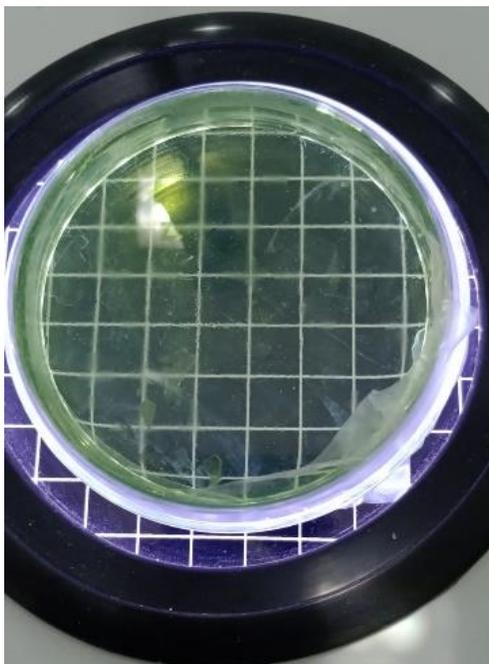


Nota. La figura muestra ausencia de crecimiento de colonias bacterianas en placas Petri con agar TCBS

Autor: Bohórquez, 2023

Figura 7.

Colonias de V. parahaemolyticus en agar TCBS, correspondiente al AEO5



Nota. La figura muestra ausencia de crecimiento de colonias bacterianas en placas Petri con agar TCBS

Autor: Bohórquez, 2023

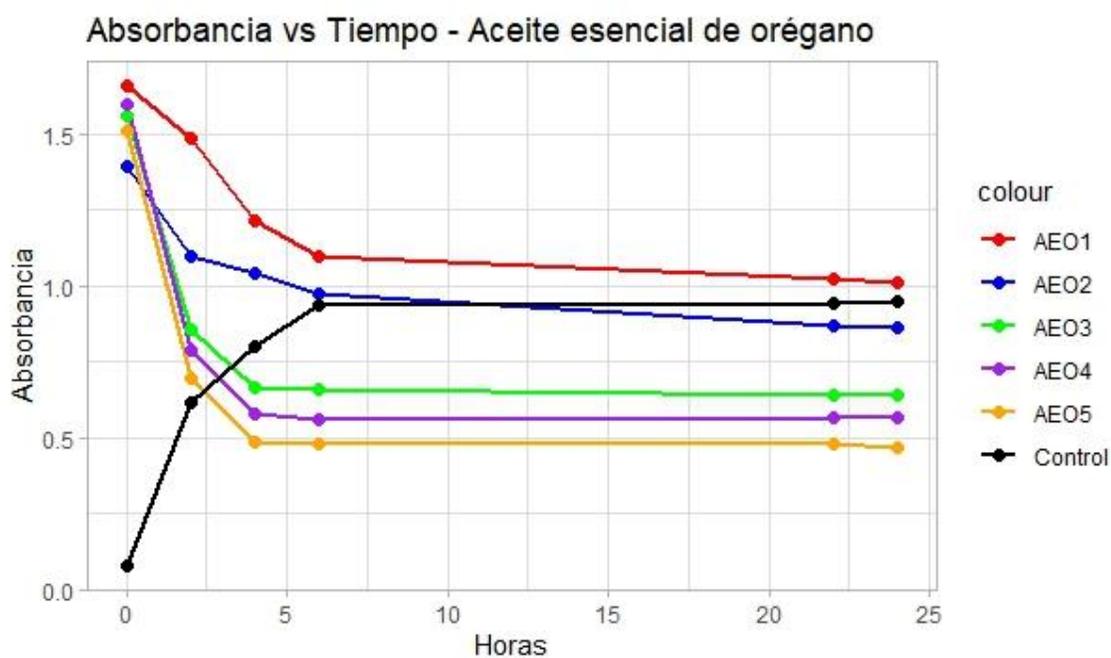
Análisis de datos

Es posible visualizar cómo la absorbancia en los tratamientos AEO 1, AEO 2, AEO 3, AEO 4 y AEO 5 disminuyen a medida que aumenta el tiempo, mientras en control aumenta su valor mostrando crecimiento bacteriano (Figura 8). También se observó cómo se estabilizan los valores de absorbancia en un tiempo aproximado de 20 horas, lo que sugiere, con base a los resultados de otros autores bajo similares condiciones de experimentación, que existe una inhibición del crecimiento bacteriano, por ello, a partir de esta hora, se realizó un análisis estadístico para determinar qué tratamiento tiene mejores resultados. Se comparó los tratamientos a las 22 horas, con la curva de la gráfica ya visualmente estabilizada, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) de los tratamientos AEO 4 y AEO 5 con los demás

tratamientos (Tabla 5). AEO 3 es la concentración del tratamiento que separa a los demás tratamientos ya que posee diferencia significativa ($p > 0.05$), siendo AEO 1 y 2 los menos efectivos de acuerdo con la evidencia estadística, AEO 4 y AEO 5 los más efectivos para reducir la población de *V. parahaemolyticus*. (Sotomayor et al., 2019b) obtuvieron resultados de MIC a partir de 200 hasta 3000 $\mu\text{g/mL}$ en una diversidad de bacterias atribuibles en un 95% a cepas de *V. harveyi* provenientes de diferentes laboratorios de larvas de Ecuador.³²

Figura 8.

Absorbancia a través del tiempo de tratamientos con aceite esencial de orégano (AEO) y control (C-)



Nota. La figura muestra el comportamiento del aceite esencial de orégano frente a bacterias de la especie *Vibrio parahaemolyticus*

Autor: Lamilla, 2023

Tabla 5. Valores de absorbancia (Promedio \pm desviación estándar) de *V. parahaemolyticus* con tratamientos de aceite esencial de orégano (AEO) luego de 22 horas de incubación

Tiempo (horas)	Absorbancia					
	AEO1	AEO2	AEO3	AEO4	AEO5	C-
22	1.020 \pm 0.059 ^a	0.870 \pm 0.185 ^a	0.641 \pm 0.146 ^b	0.568 \pm 0.115 ^b	0.478 \pm 0.184 ^b	0.943 \pm 0.027 ^a

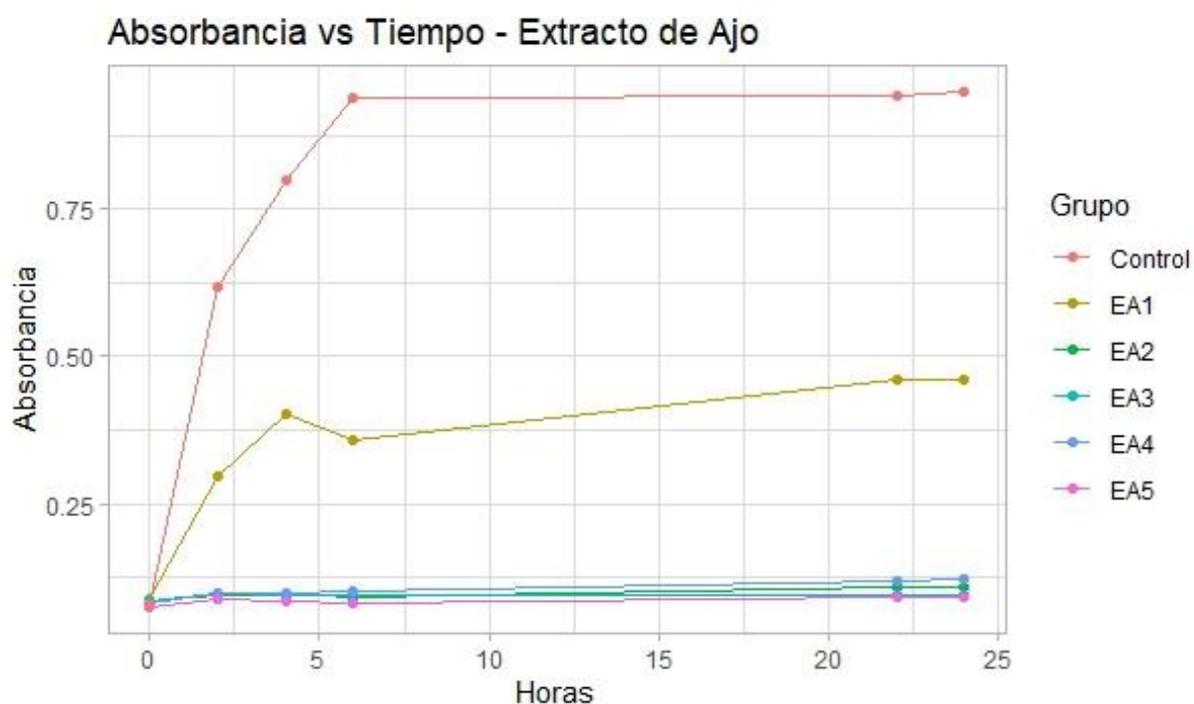
Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p < 0.05$, basado en análisis de ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey

Autor: Bohórquez, 2023

Los tratamientos con ajo se mantuvieron constantes a través del tiempo (Figura 9) a excepción del tratamiento EA 1 que tuvo un comportamiento similar al control al elevar su absorbancia, por ende, la concentración no consiguió ofrecer un efecto antibacteriano alguno. Estos resultados de experimentación nos indica que el ajo no elimina o reduce la carga bacteriana, más bien la mantiene constante a través del tiempo impidiendo que exista una división celular. Los tratamientos EA 2, EA 3, EA 4 y EA 5 no tienen diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos, pero si existe una diferencia ($p < 0.05$) respecto al control y a EA 1 (Tabla 6). Mostrando que la dosis para que el extracto de ajo inhiba el crecimiento bacteriano debe ser mayor o igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 9.

Absorbancia a través del tiempo (horas) de tratamientos con Extracto de ajo (EA) y control (C-)



Nota. La figura muestra el comportamiento del extracto de ajo frente a bacterias de la especie *Vibrio parahaemolyticus*

Autor: Lamilla, 2023

Tabla 6. Valores de absorbancia (Promedio \pm desviación estándar) de *V. parahaemolyticus* con tratamientos de extracto de ajo (EA) luego de 22 horas de incubación

Tiempo (horas)	Absorbancia					C-
	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	
22	0.460 \pm 0.057 ^a	0.110 \pm 0.026 ^b	0.093 \pm 0.004 ^b	0.121 \pm 0.003 ^b	0.093 \pm 0.014 ^b	0.943 \pm 0.027 ^c

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p < 0.05$, basado en análisis de

ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Tukey

Autor: Bohórquez, 2023

3.5 Costos asociados a la experimentación

Los materiales con su costo unitario y valor total están descritos en la tabla 7, dando una inversión en materiales de aproximadamente \$1622 dólares americanos, lo cual compete a precios más costosos dado por el mercado minorista e importación. Esto no incluye valores por compra de equipos (Tabla 8), ya que fueron prestados por laboratorios de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Esta inversión inicial es necesaria ya que se tiene como finalidad evaluar la efectividad a fin de escoger el tratamiento más efectivo que brinde resultados esperados.

Tabla 7. Cantidad y costos de materiales utilizados en el desarrollo del proyecto integrador.

Cantidad	Materiales	Costo Unitario (\$)	Costo Total (\$)
50	Placas Petri plástico 90x10mm	0,50	25,00
1	Asa de platino	10,79	10,79
1	Asa de Drisgalsky	7,00	7,00
1	Medio Agar Cromogénico 500gr	515,00	515,00
1	Medio Agar Mueller Hinton 500gr	225,00	225,00
1	Medio TSB Tryptic Soy Broth 500gr	80,00	80,00
1	TCBS AGAR 454gr	125,00	125,00
1	Micropipeta 100 µl	98,70	98,70
1	Micropipeta 200 µl	281,62	281,62
1	Micropipeta 1 a 10ml	104,61	104,61
50	Puntas para micropipeta 100 ul	0,67	33,50
50	Puntas para micropipeta 200 ul	0,10	5,00
50	Puntas para micropipeta 1-10 ul	0,45	22,50
1	Placa microelisa 96 pocillos	5,00	5,00
10	Tubos de ensayo	1,50	15,00
1	Caja de guantes	20,00	20,00
1	Caja de mascarillas	2,10	2,10
2	Aceite esencial 100% de orégano 5ml	10,00	20,00
0.5 libra	Dientes de ajo orgánico	1,00/libra	0,50
1	Sensidiscos neutros 50 unidades	25,00	25,00
TOTAL (\$)			1621,32

Tabla 8. Laboratorios con equipos específicos para el desarrollo de la metodología

Laboratorio	Equipo	Metodología
Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA)	Cámara de flujo	Siembra Vibrio/Antibiograma/MIC
	Incubadora	Siembra Vibrio/Antibiograma/MIC
	Agitador Vórtex	Siembra Vibrio/Dosificación
	Contador de colonias	Antibiograma
Laboratorio de Bentos	Autoclave	Esterilización de materiales
	Destilador de agua	Dosificación
	Espectrofotómetro	Antibiograma/MIC
Laboratorio de Investigaciones Biomédicas	Agitador	Dosificación
	Lector de microplaca	MIC
	Elisa	

Nota. Los diferentes equipos fueron prestados para su uso por los distintos laboratorios de la Escuela Superior Politécnica del Litoral

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Posterior al análisis de resultados realizado y con base a los resultados de otros autores bajo similares condiciones de experimentación, se evidenció que la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de orégano que mejores resultados antibacterianos y bacteriostáticos brindó fue a partir de 800 µg/mL. Estas características antibacterianas se deben, principalmente, a la acción de los compuestos fenólicos presentes en el aceite esencial de orégano, específicamente, el timol y el carvacrol. Al mismo tiempo, el tratamiento con extracto de ajo brindó propiedades bacteriostáticas inhibiendo el crecimiento de las colonias bacterianas de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de una concentración mínima inhibitoria de 1000 µg/mL bajo el método de microdilución en caldo. Este efecto se genera a causa de la acción de compuestos sulfurados como la alicina presente en el ajo. Además, bajo las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, el extracto de ajo y el aceite esencial de orégano reflejaron causar susceptibilidad antimicrobiana formando halos de inhibición a partir de 12 y 35 mm,

respectivamente. Debido a lo previamente mencionado, los compuestos de origen botánico constituyen una potencial herramienta para erradicar o inhibir el crecimiento de cepas de bacterias patógenas, especialmente colonias de *Vibrio parahaemolyticus* gracias a sus prometedores resultados *in vitro* constituyendo una real alternativa en reemplazo de los antibióticos que promueven la resistencia antibacteriana generando cepas de bacterias patógenas cada vez más resistentes que pueden afectar la fauna marina y poner en riesgo el futuro de la industria acuícola mundial.

4.2 Recomendaciones

Con el objetivo de poder replicar y lograr resultados satisfactorios de cara a la ejecución de esta experimentación, es sugerible contar una especie de bacterias adecuadas para la experimentación, es decir, de ser posible, contar con cepas de *Vibrio parahaemolyticus* certificadas (ATCC 17802T) o, en su defecto, realizar un aislamiento adecuado en medios de cultivo cromogénicos o adecuados seguido de una identificación de la cepa bacteriana por medio del gen 16S ARNr. Además, se propone el uso de discos de papel filtro de celulosa para pruebas de sensibilidad microbiana con un diámetro de 6 mm debido a que realizando micro pozos por medio del uso de una pipeta estéril se corre el riesgo de despegar el agar de la placa Petri provocando que no haya una correcta difusión de la sustancia antibacteriana a utilizarse en los distintos tratamientos. Este inconveniente también puede ser solventado gracias al uso de pequeños perforadores de agar de uso exclusivo para el área de ensayos de microbiología que se ofertan en el mercado. También, es imperativo la incorporación de una escala de McFarland 0.5, cuyo objetivo es comparar espectrofotométricamente la densidad poblacional de bacterias suspendidas en un medio líquido, esto con el objetivo de estandarizar la población bacteriana para todas las pruebas a realizarse. Por último y no menos importante, es permisible recomendar la correcta implementación de medidas de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio durante la

ejecución del experimento con el objetivo de reducir los errores que conduzcan a el desgaste de materiales y los resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

Adel, M., Hossein Omid, A., Dawood, M. A. O., Karimi, B., Pezhman, S., & Shekarabi, H.

(2020). *Dietary Gracilaria persica mediated the growth performance, fillet colouration, and immune response of Persian sturgeon (Acipenser persicus)*.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735950>

Adineh, H., Harsij, M., Jafaryan, H., & Asadi, M. (2020). The effects of microencapsulated garlic

(*Allium sativum*) extract on growth performance, body composition, immune response and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Journal of Applied*

Animal Research, 48(1), 372–378. <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1808473>

Ahmadifar, E., Yousefi, M., Karimi, M., Fadaei Raieni, R., Dadar, M., Yilmaz, S., Dawood,

M. A. O., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). Benefits of Dietary Polyphenols and

Polyphenol-Rich Additives to Aquatic Animal Health: An Overview. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(4), 478–511.

<https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1818689>

Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., Dawood, M. A. O., Elnesr, S. S., & Dhama,

K. (2021). Curcumin and its different forms: A review on fish nutrition. *Aquaculture*,

532, 736030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736030>

Angel, D., Jokumsen, A., & Lembo, G. (2019). Aquaculture Production Systems and

Environmental Interactions. *Organic Aquaculture*, 103–118.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-05603-2_6

Angulo, C., Loera-Muro, A., Trujillo, E., & Luna-González, A. (2019). Control of AHPND by

phages: a promising biotechnological approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 989–

1004. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12275>

Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). *Antimicrobial properties of allicin from garlic*.

Bondad-Reantaso, M. G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Le Groumellec, M., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall'Occo, A., Urbani, R., & Caputo, A. (2023a). Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(4), 1421–1451.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12786>

Bondad-Reantaso, M. G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Le Groumellec, M., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall'Occo, A., Urbani, R., & Caputo, A. (2023b). Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(4), 1421–1451.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12786>

Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., Grard, T., & Midelet-Bourdin, G. (2019). *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 597–610.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1384715>

Bórquez, R. A. (n.d.). *MONITOREO DEL ÍNDICE DE CALIDAD DEL AGUA PARA CAMARONICULTURA POR MEDIO DE UN HARDWARE DE ACCESO ABIERTO Y UN SISTEMA DE INFERENCIA DIFUSA WATER QUALITY INDEX MONITORING FOR SHRIMP AQUACULTURE USING OPEN SOURCE HARDWARE AND FUZZY INFERENCE SYSTEMS*. Retrieved February 9, 2024, from <http://biotecnia.unison.mx>

- Carballeira Braña, C. B., Cerbule, K., Senff, P., & Stolz, I. K. (2021). Towards Environmental Sustainability in Marine Finfish Aquaculture. *Frontiers in Marine Science*, 8, 666662. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.666662/BIBTEX>
- Chen, C.-Z., Li, P., Liu, L., & Li, Z.-H. (2022). Exploring the interactions between the gut microbiome and the shifting surrounding aquatic environment in fisheries and aquaculture: A review. *Environmental Research*, 214, 114202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114202>
- Chong, R. (2020). *Aquaculture Pharmacology 1st Edition*.
- Cho, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J.-H. (2020). Synergistic activities of gaseous oregano and thyme thymol essential oils against *Listeria monocytogenes* on surfaces of a laboratory medium and radish sprouts. *Food Microbiology*, 86, 103357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103357>
- De Silva, L. A. D. S., & Heo, G. J. (2022). Biofilm formation of pathogenic bacteria isolated from aquatic animals. *Archives of Microbiology* 2022 205:1, 205(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S00203-022-03332-8>
- De Souza Valente, C., & Wan, A. H. L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181, 107527. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107527>
- Devadas, S., Zakaria, Z., Shariff, M., Bhassu, S., Karim, M., & Natrah, I. (2024). Methodologies and standards for monitoring antimicrobial use and antimicrobial resistance in shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 579, 740216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740216>

- FAO. (2022). Estado y tendencia generales de la producción. In *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022* (pp. 27–28).
- FAO. (2024, January 8). *Visión general del sector acuícola nacional - Ecuador. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN EL ECUADOR.*
- Fasulkova, *, & Stratev, R. (2024). Insights into foodborne *Vibrio parahaemolyticus*-a review. *Journal Homepage*, 8(1), 190–209. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.8\(1\).267](https://doi.org/10.26656/fr.2017.8(1).267)
- FDA. (2022). Aquaculture Drugs . In *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance* (4th ed.).
- Gonzales, A. P. P. F., Yoshioka, E. T. O., Mathews, P. D., Mertins, O., Chaves, F. C. M., Videira, M. N., & Tavares-Dias, M. (2020). Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. *Aquaculture*, 528, 735500. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>
- Han, J. E., Choi, S. K., Han, S. H., Lee, S. C., Jeon, H. J., Lee, C., Kim, K. Y., Lee, Y. S., Park, S. C., Rhee, G., Park, S. Y., Kim, J. S., Park, S., Kim, J. H., & Lee, K. J. (2020). Genomic and histopathological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from an acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Korea. *Aquaculture*, 524, 735284. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735284>
- Haque, Z. F., Islam, M. S., Sabuj, A. A. M., Pondit, A., Sarkar, A. K., Hossain, M. G., & Saha, S. (2023). Molecular Detection and Antibiotic Resistance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from Shrimp (*Penaeus monodon*)

- and Shrimp Environments in Bangladesh. *Aquaculture Research*, 2023.
<https://doi.org/10.1155/2023/5436552>
- Hasan, M. T., Jang, W. J., Lee, B.-J., Kim, K. W., Hur, S. W., Lim, S. G., Bai, S. C., & Kong, I.-S. (2019). Heat-killed *Bacillus* sp. SJ-10 probiotic acts as a growth and humoral innate immunity response enhancer in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 424–431.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.018>
- Heluy, G. M., Ramos, L. R. V., Pedrosa, V. F., Sarturi, C., Figueiredo, P. G. P., Vidal, L. G. P., França, I. de F., & Pereira, M. M. (2020). Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil as an additive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings reared in salinized water. *Aquaculture Research*, 51(8), 3237–3243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.14658>
- Henares, M. N. P., Medeiros, M. V., & Camargo, A. F. M. (2020). Overview of strategies that contribute to the environmental sustainability of pond aquaculture: rearing systems, residue treatment, and environmental assessment tools. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 453–470. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12327>
- Hernández-Cabanyero, C., Carrascosa, E., Jiménez, S., & Fouz, B. (2023). Exploring the Effect of Functional Diets Containing Phytobiotic Compounds in Whiteleg Shrimp Health: Resistance to Acute Hepatopancreatic Necrotic Disease Caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Animals*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/ani13081354>
- Hudzicki, J. (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*.
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:125831583>
- Jikah, A. N., & Edo, G. I. (2023). Mechanisms of action by sulphur compounds in *Allium sativum*. A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 9, 100323.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100323>

- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Liu, J., Wu, Q., Xu, H., Pan, Y., Malakar, P. K., Zhao, Y., & Zhang, Z. (2024). Change of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. during shrimp culture in Shanghai. *Aquaculture*, 580, 740303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740303>
- López Patricio Colón, V., Reyes Juana Fulvia, S., Pereira Patricia Migdalia, O., Motoche Galo Wilfrido, S., Cordero Patricio, Q., Añasco Roy Manuel, G., & Velásquez López, C. (2023). Characterization of water quality during freshwater culture of shrimp *Litopenaeus vannamei* in southern Ecuador Caracterización de la calidad del agua durante el cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* con agua dulce en el Sur del Ecuador Article history. In *J. Selva Andina Anim. Sci* (Vol. 10, Issue 2).
- Lucía Vásconez. (2022, October 21). 52% de exportaciones de Ecuador proviene del sector acuícola. *El Camarón Se Destaca*.
- Magouz, F. I., Mahmoud, S. A., El-Morsy, R. A. A., Paray, B. A., Soliman, A. A., Zaineldin, A. I., & Dawood, M. A. O. (2021). Dietary menthol essential oil enhanced the growth performance, digestive enzyme activity, immune-related genes, and resistance against acute ammonia exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 530, 735944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735944>
- Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., Izadi, M., Ajami, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 49–56.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.010>

- Marium, A., Manan, A., Chatha, M., Naz, S., Farhan Khan, M., Safdar, W., & Ashraf, I. (2023). Effect of Temperature, pH, Salinity and Dissolved Oxygen on Fishes. *Journal of Zoology and Systematics*, 1(2), 1–12. <https://doi.org/10.56946/JZS.V1I2.198>
- Maurício L. Martins, Gabriela T. Jerônimo, Aline B. Figueredo, Karen R. Tancredo, Elisabeth A. Bertaglia, William E. Furtado, Patrícia F.O. Azevedo, Nicollas B. Lehmann, & José L.P. Mouriño. (2020). Antiparasitic agents. In *Aquaculture Pharmacology* (1st ed., pp. 19–20). Elsevier Science.
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512, 734289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>
- Molina-Quiroz, R. C., Camilli, A., & Silva-Valenzuela, C. A. (2023). Role of Bacteriophages in the Evolution of Pathogenic Vibrios and Lessons for Phage Therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1404, 149–173. https://doi.org/10.1007/978-3-031-22997-8_8/TABLES/1
- Myint, K. Z., Yu, Q., Qing, J., Zhu, S., Shen, J., & Xia, Y. (2022). Botanic antimicrobial agents, their antioxidant properties, application and safety issue. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 100924. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100924>
- Ndraha, N., Huang, L., Wu, V. C. H., & Hsiao, H.-I. (2022). *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: recent progress in understanding influential factors at harvest and food-safety intervention approaches. *Current Opinion in Food Science*, 48, 100927. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100927>

- Nostro, A., & Papalia, T. (2011). Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7, 28–35. <https://doi.org/10.2174/157489112799829684>
- Peña Leidy. (2019). *Vibriosis en camarón blanco del Pacífico Penaeus vannamei: reporte de caso*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Ponce, E. (2023). *Evaluación del uso de vibriófagos encapsulados en el alimento para el control de Vibrio parahaemolyticus causante de AHPND en el camarón Penaeus vannamei*. CIBNOR.
- Purgar, M., Gavrilović, A., Kapetanović, D., Klanjšček, J., Jug-Dujaković, J., Kolda, A., Žunić, J., Kazazić, S., Vardić Smrzlić, I., Vukić Lušić, D., Pikelj, K., Listeš, E., El-Matbouli, M., Lillehaug, A., Lončarević, S., Knežević, D., Hengl, B., Geček, S., & Klanjscek, T. (2023). Assessment of Vibrio spp. abundance as a water quality indicator: Insights from Mali Ston Bay in the Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 295, 108558. <https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2023.108558>
- Ramadhaniah, V., Indrawati, A., & Prasetyo, B. F. (2023). Activity of Garlic (Allium Sativum L.) Extract Against Vibrio Parahaemolyticus Bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1174(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1174/1/012004>
- Ramírez, & Marin. (2009). METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. *Scientia Et Technica*, XV, 263–268. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Saha, C. K. (2024). Governing sociocultural sustainability through standards: Evidence from aquaculture eco-certification schemes. *Aquaculture*, 578, 740011. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2023.740011>

- Salas, R. G., Río, M. M. V. del, & Concepción, I. P. (2021). Uso intensivo de antibióticos profilácticos en la acuicultura: un problema creciente para la salud humana y animal. *Universidad y Sociedad*, 13(S2). <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/2304>
- Sanches-Fernandes, G. M. M., Sá-Correia, I., & Costa, R. (2022). Vibriosis Outbreaks in Aquaculture: Addressing Environmental and Public Health Concerns and Preventive Therapies Using Gilthead Seabream Farming as a Model System. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904815>
- Savairam, V. D., Patil, N. A., Borate, S. R., Ghaisas, M. M., & Shete, R. V. (2023). Allicin: A review of its important pharmacological activities. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 8, 100283. <https://doi.org/10.1016/J.PRMCM.2023.100283>
- Shah, B. R., & Mraz, J. (2020). Advances in nanotechnology for sustainable aquaculture and fisheries. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 925–942.
<https://doi.org/10.1111/RAQ.12356>
- Shekarabi, S. P. H., Javarsiani, L., Mehrgan, M. S., Dawood, M. A. O., & Adel, M. (2022). Growth performance, blood biochemistry profile, and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary Persian shallot (*Allium stipitatum*) powder. *Aquaculture*, 548, 737627.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737627>
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., & Dawood, M. A. O. (2021). Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture*, 542, 736868.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>

Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019a). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, *14*(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>

Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019b). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, *14*(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>

Srichaiyo, N., Tongsir, S., Hoseinifar, S. H., Dawood, M. A. O., Jaturasitha, S., Esteban, M. Á., Ringø, E., & Van Doan, H. (2020). The effects gotu kola (*Centella asiatica*) powder on growth performance, skin mucus, and serum immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture Reports*, *16*, 100239.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100239>

Stratev, D., Fasulkova, R., & Krumova-Valcheva, G. (2023). Incidence, virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood. *Microbial Pathogenesis*, *177*, 106050.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106050>

Thornber, K., Verner-Jeffreys, D., Hinchliffe, S., Rahman, M. M., Bass, D., & Tyler, C. R. (2020). Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry. *Reviews in Aquaculture*, *12*(2), 966–986. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12367>

Victoria Milko. (2023). *Crece la demanda de peces... y los océanos dan todo lo que pueden. ¿Podemos mejorar la acuicultura?*

- Wickramanayake, Kumarage P.M., Majeed Sana, & Heo G.J. (2023). View of An overview of the antimicrobial activity of some essential oils against fish pathogenic bacteria. *Veterinary Integrative Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.12982/VIS.2023.009>
- Xu, W., Chen, M., Chen, X., Su, Y., Tang, L., & Zhang, Y. (2024). *Vibrio parahaemolyticus* infection caused by market sewage: A case report and literature review. *Heliyon*, 10(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23461>
- Yang, F., Xu, L., Huang, W., & Li, F. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aquaculture*, 548, 737605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737605>
- Yildirim-Aksoy, M., Eljack, R., Peatman, E., & Beck, B. H. (2022). Immunological and biochemical changes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105787. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105787>
- Yue, K., & Shen, Y. (2022). An overview of disruptive technologies for aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 7(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.AAF.2021.04.009>
- Yu, Y.-B., Choi, J.-H., Kang, J.-C., Kim, H. J., & Kim, J.-H. (2022). Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review. *Microbial Pathogenesis*, 166, 105545. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105545>
- Zermeño-Cervantes, L. A., Barraza, A., González-Ponce, H. A., Martínez-Díaz, S. F., & Cardona-Félix, C. (2023). *Penaeus vannamei* challenged with a *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain shows hepatopancreatic microbiota imbalance. *Ciencias Marinas*, 49. <https://doi.org/10.7773/cm.y2023.3234>

- Zhang, F., Zhang, J., Lin, G., Chen, X., Huang, H., Xu, C., & Chi, H. (2024). Antibiotic Resistance and Genetic Profiles of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Farmed Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Ningde Regions. *Microorganisms*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010152>
- Zhang, L., & Orth, K. (2013). Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), 70–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.002>
- Zhang, R., Wang, X. W., Liu, L. L., Cao, Y. C., & Zhu, H. (2020). Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 518, 734781. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734781>
- Zhang, X., Sun, Z., Cai, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, Z., & Cao, F. (2020). Effects of dietary fish meal replacement by fermented moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves on growth performance, nonspecific immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Fish & Shellfish Immunology*, 102, 430–439. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.04.051>
- Zheng, Z., Wang, F., Aweya, J. J., Li, R., Yao, D., Zhong, M., Li, S., & Zhang, Y. (2018). Comparative transcriptomic analysis of shrimp hemocytes in response to acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) causing *Vibrio parahemolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 10–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.032>