

Suplementación de extracto de orégano (*Origanum vulgare*) y ácido fórmico para controlar la vibriosis en acuicultura

Supplementation of oregano extract (*Origanum vulgare*) and formic acid to control vibriosis in aquaculture

Sara Anahi Criollo-Nivicela¹ , María José Peña¹ , Brian Mocha Cuenca² , Lita Sorroza Ochoa³ 

¹Carrera de Acuicultura, Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.

²Desarrollo e Integración de Nuevas Tecnologías Agropecuarias (DINTA). Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.

³Grupo de Investigación en Acuicultura Sostenible (GIAS). Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.

Correspondencia: Sara Criollo Nivicela, **E-mail:** anahicriollo8@gmail.com

Artículo original | Original article

Palabras clave

Fitobioticos
ácidos orgánicos
antibiograma
sinergia
Penaeus vannamei

Keywords

Phytobiotics
organic acids
antibiogram
synergy
Penaeus vannamei

RESUMEN | La vibriosis es una enfermedad de origen bacteriano que afecta al cultivo de camarón ocasionando pérdidas económicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la sinergia entre extracto de orégano (*Origanum vulgare*), sales de potasio y ácido fórmico para la reducción de bacterias del género *Vibrio* en el cultivo de camarón. El estudio se efectuó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Machala. Se probó *in vitro* ácido fórmico, formiato de potasio, extracto de orégano y una mezcla denominada "Oseanah" con y sin Tween 80 (T80). Se analizó el efecto inhibitorio de los tratamientos frente a cepas de *Vibrio* sp. totales por 24 horas mediante método Kirby-Bauer en placas con Agar Muller Hinton. Los tratamientos con y sin T80 presentaron un mayor halo de inhibición, por lo tanto, se evaluó en juveniles de camarón. Para ello se aplicó dos tratamientos y un control, por triplicado: T0: control, T1: Oseanah, T2: Oseanah + T80. Se utilizó 45 organismos de *Penaeus vannamei*, repartidos al azar, alimentándolos 2 veces al día. Se hizo recambios de agua al 30 %. Según los resultados del recuento en placa, el tratamiento T1 tuvo una reducción significativa ($p < 0,05$) con 97,67 % de la carga de *Vibrio* sp. mientras que el tratamiento T2 un 92,33 %. Esto indica que la aplicación de "Oseanah" fue más efectiva en reducir la carga bacteriana. Finalmente, la mezcla de aceite de orégano con diformiato de potasio demostró un efecto sinérgico inhibiendo el crecimiento de vibrios, lo que sugiere ser una opción amigable para minimizar la aplicación de antibióticos en la producción acuícola.

ABSTRACT | Vibriosis is a bacterial disease that affects shrimp farming, leading to economic losses. The objective of this study was to evaluate the synergy between oregano extract (*Origanum vulgare*), potassium salts, and formic acid for the reduction of *Vibrio* bacteria in shrimp cultivation. The research was conducted in the Microbiology Laboratory at the Universidad Técnica de Machala. *In vitro* tests were performed using formic acid, potassium formate, oregano extract, and a mixture referred to as "Oseanah," both with and without Tween 80 (T80). The inhibitory effect of the treatments against total *Vibrio* strains was analyzed over 24 h using the Kirby-Bauer method on Muller Hinton agar plates. Treatments with and without T80 exhibited a larger inhibition halo; therefore, they were further evaluated in juvenile shrimp. Two treatments and a control were applied in triplicate: T0: control, T1: Oseanah, T2: Oseanah + T80. A total of 45 *Penaeus vannamei* organisms were randomly distributed and fed twice daily, with a 30 % water change. According to the plate count results, treatment T1 showed a significant reduction ($p < 0.05$) with a 97.67 % reduction in the *Vibrio* sp. load, while treatment T2 showed a reduction of 92.33 %. This indicates that the application of "Oseanah" was more effective in reducing bacterial load. Finally, the mixture of oregano oil with potassium diformate demonstrated a synergistic effect in inhibiting the growth of vibrios, suggesting it was an environmentally friendly option to minimize antibiotic use in aquaculture production.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, la producción del camarón blanco *Penaeus vannamei* comenzó en el año 1968 en la provincia de El Oro, en el cantón Santa Rosa, y se considera uno de los principales productos de exportación de origen no petrolero. Por tal motivo, se ha convertido en una actividad con un gran impacto financiero dentro del país (Varela-Véliz *et al.* 2017). Con el aumento de la demanda del mercado, se ha incrementado la intensidad del cultivo, dando origen a sistemas intensivo, súper-intensivo e hiper-intensivos, con la finalidad de aumentar la densidad de producción y cubrir la demanda alimenticia (Pérez-Chabela *et al.* 2020).

Con una elevada densidad de siembra, se propicia el surgimiento de enfermedades que generan problemas en la producción, con probabilidad de mortalidad en los organismos y por ende pérdida en la producción (Martín *et al.* 2022). Para esta afectación, se hace uso de tratamientos ya sea profilácticos o terapéuticos, para un mejor control del agente patógeno. Uno de estos agentes son las bacterias Gram-negativas, las cuales son microorganismos que se encuentran en las piscinas de cultivo, ocasionando problemas a la crianza de camarón. El tipo más conocido cuando se trabaja con salinidades son *Vibrio* spp. los cuales son los responsables de ocasionar pérdidas a este sector (Casanova-Nodarse *et al.* 2023).

Para el control terapéutico de la vibriosis se usan fármacos antibacterianos; sin embargo, el uso de estas sustancias químicas provoca la reducción de algunos microorganismos presentes en el animal y el estanque, que incluyen bacterias benéficas, ocasionando desequilibrio en el ecosistema. Asimismo, una dosis inadecuada de estos productos genera resistencia del agente patógeno, ocasionando un mayor problema en el cultivo (Gamez-Bayardo *et al.* 2021).

En Ecuador, se encuentra prohibido el uso de antibióticos y se recomienda no usar la oxitetraciclina y florfenicol (Ministerio de Acuicultura y Pesca 2018). Con la restricción de estos medicamentos han surgido otras alternativas como el uso de ácidos orgánicos, productos naturales y bacteriófagos, los mismos que en diferentes investigaciones han presentado resultados benéficos en la industria del camarón (Saucedo *et al.* 2020).

Entre estas alternativas, la aplicación de aceite de orégano, con alto contenido de carvacrol ha demostrado efectividad con un 70 % de sobrevivencia en comparación a la Enrofloxacin con un 50 %, destacando su uso como una opción sostenible para controlar infecciones en acuicultura sin consecuencias perjudiciales relacionadas con la aplicación de antibióticos (García-Valenzuela *et al.* 2012).

El ácido fórmico, formiato de potasio y extracto de orégano "*Origanum vulgare*" son considerados como una opción ante la aparición de bacterias en el sector camaronero debido a sus diversas propiedades. Por lo tanto, estas sustancias se presentan como una alternativa menos agresiva para el ambiente y el organismo, destacando que su aplicación puede generar beneficios económicos al productor.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la sinergia entre extracto de orégano, sales de potasio y ácido fórmico en la reducción de bacterias del género *Vibrio*.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Para realizar este ensayo se adquirió el extracto de orégano comercial con un 80 % de carvacrol y 20 % de timol, obtenido mediante el método de arrastre de vapor. Adicionalmente, se elaboraron stocks de ácido fórmico (AF) al 10 % v v⁻¹ y formiato de potasio (FK) al 8,4 % m v⁻¹.

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

La cepa de *Vibrio* utilizada para medir la sensibilidad a los compuestos, se obtuvo del Grupo de Investigación en Acuicultura Sostenible (GIAS), la cual fue obtenida mediante siembra en agar TCBS del hepatopáncreas (Hp) de *Penaeus vannamei*. Para el ensayo experimental se usó cepas de vibrios sacarolíticas, aislados por agotamiento en agar TSA (Tripton de soya) para obtener cultivos puros.

Para la prueba de sensibilidad bacteriana se utilizó el método Kirby-Bauer. Para ello, se preparó el medio de cultivo Agar Muller-Hilton (MH) con 0,5 % de NaCl y siguiendo las indicaciones del fabricante (121°C, 15 psi durante 15 minutos). Una vez esterilizado, se colocó en cajas de Petri para su solidificación y se expuso a rayos UV en la cámara de flujo laminar por 15 min para su completa esterilización. Esta técnica se realizó por triplicado para garantizar los datos obtenidos. Luego, en este medio, se colocó 100 µL del cultivo de *Vibrio* con una concentración 1,5 x 10⁸ UFC

ml⁻¹ (0,5 Mcfarland), y a continuación se depositaron los discos que fueron impregnados con 60 µL de las soluciones más densas (EO y T80) y 40 µL para soluciones acuosas (AF, FK).

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

Tabla 1. Descripción de los tratamientos evaluados *in vitro*.

Table 1. Description of the treatments evaluated *in vitro*.

Tratamientos	Contenido	Concentración
A	T80	99 % v v ⁻¹
B	EO	0,50 µg mL ⁻¹
C	AF	2,5 % v v ⁻¹
D	FK	4 % m v ⁻¹
E	Oseanah	2,5 % v v ⁻¹ + 4 % m v ⁻¹ + 0,50 µg mL ⁻¹
F	Oseanah + T80	2,5 % v v ⁻¹ + 4 % m v ⁻¹ + 0,50 µg mL ⁻¹

Símbolos: T80, Tween 80; EO, extracto de orégano; AF, ácido fórmico; FK, formiato potásico; Oseanah: combinación de EO, AF y FK.

Para el análisis bacteriológico se tomaron 10 camarones al azar siguiendo la metodología de Gómez *et al.* (2019). A partir de 1 g de hepatopáncreas, se realizó diluciones sucesivas por triplicado en serie (10⁻¹) y se inoculó 100 µL de cada dilución en placas Petri con Agar TCBS para conocer la carga inicial de vibrios. Se dejó las Placas de Petri por 24 h a 30°C y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹ de hepatopáncreas), antes de iniciar el ensayo experimental.

Para la evaluación *in vivo*, se empleó la sustancia que presentó el mayor halo de inhibición, utilizando dos tratamientos y un control, cada uno con sus respectivas réplicas. T0: alimento balanceado; T1 “Oseanah”: balanceado + [AF (2,5 %), FK (4 %), EO (0,50 µg mL⁻¹)] + Pegante; T2 “Oseanah + T80”: Balanceado + [AF (2,5 %), FK (4 %), EO (40 %), T80 (60 %)] + Pegante. Se aplicó 2,5 mL kg⁻¹ de alimento balanceado mezclados de manera manual por 3 min. Los organismos fueron alimentados con una ración equivalente al 4 % de su biomasa (15 g) por un intervalo de 10 días, proporcionando alimento 2 veces al día (8 AM – 2 PM). Se usó un total de 54 g de alimento durante los 10 días. Se aplicó aireación constante y se controlaron parámetros como temperatura (26,5±0.5 °C), amonio (0,010±0,004 mg L⁻¹), pH (6,28±0,08) usando un API ammonia NH₃/NH₄⁺ test kit y un potenciómetro marca Base instruments modelo A120. Los datos obtenidos fueron procesados mediante la aplicación “Blue Aqua-free Ammonia (mg L⁻¹)”.

En el diseño experimental se usaron 9 recipientes plásticos con una capacidad de 15 L, los cuales se llenaron con 10 L de agua con 18 ppm procedente de la camaronera “San Alfonso” (Barbones, El Oro). Se colocó 5 camarones juveniles (3±0,43 g) en cada recipiente seleccionados al azar, para cada tratamiento. Se realizó recambios de agua cada 3 días al 30 %, con el agua de la misma empresa camaronera.

Luego de completar 10 días, se realizó el análisis bacteriológico a partir 1 g de hepatopáncreas, siguiendo la metodología de Gómez *et al.* (2019). En este caso, se tomó un *pool* o mezcla de 5 camarones de cada tratamiento (T0, T1 y T2) para hacer diluciones sucesivas 10⁻¹, 100⁻¹, 1000⁻¹, luego se inoculó 100 µL de cada dilución en Placas de Petri con Agar TCBS selectivo para vibrios. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C para el recuento total de *Vibrio*.

Los datos obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor entre grupos para comparar las variaciones entre los tratamientos con diferentes concentraciones de ácidos orgánicos y EO usando un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Previo a ejecutar el ANOVA, se comprobó la normalidad de los datos por medio de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y evaluando la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene. Estas

observaciones realizadas se llevaron a cabo usando del software estadístico SPSS Statistics versión 25. Para individualizar semejanzas o disimilitudes relevantes entre los tratamientos, se empleó la prueba *post-hoc* de Duncan.

RESULTADOS

Sensibilidad de *Vibrio* sp. frente a los compuestos

Los resultados proyectados en la Tabla 2 evidencian que la combinación de ácido fórmico, formiato de potasio y aceite esencial de orégano (Oseanah) reflejó un mayor halo de inhibición frente al patógeno bacteriano, en comparación con el uso de las sustancias aisladas, con una diferencia en el diámetro que fue desde 1,82 a 6,01 mm, lo que podría indicar que existe sinergia entre los productos al efectuar la mezcla.

Tabla 2. Tratamientos evaluados con su respectivo halo de inhibición a las 24 y 48 h.

Table 2. Treatments evaluated with their respective inhibition halo at 24 and 48 h.

Tratamientos		Diámetro del halo (mm)	
		24 h	48 h
A	T80	-	-
B	EO	7,24	7,24
C	AF	8,75	8,75
D	FK	9,70	9,70
E	Oseanah	13,25	13,25
F	Oseanah + T80	11,43	11,43

T80, Tween 80; EO, extracto de orégano; AF, ácido fórmico; FK, formiato potásico; Oseanah: combinación de EO, AF y FK.

La comparación del diámetro de los halos de inhibición evidenció diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p<0,05$). Por otra parte, se observó que la actividad antimicrobiana de la mezcla los compuestos (Oseanah con y sin Tween 80) fue superior en la inhibición de *Vibrio* totales, aplicado en concentraciones iguales observando halos de 13,25 mm Oseanah, y 11,43 mm para Oseanah + T80 (Fig. 1).

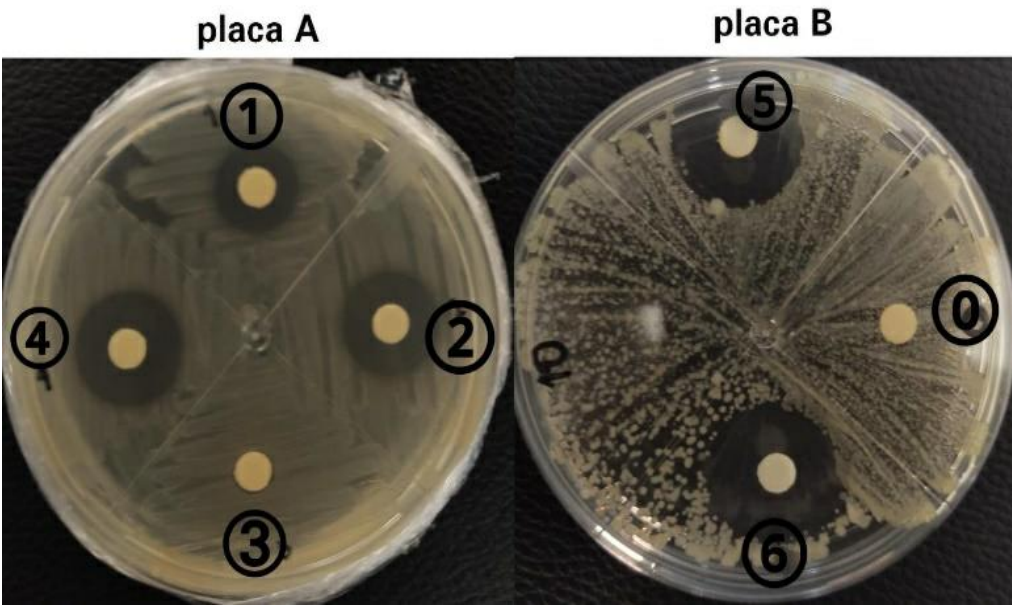


Figura 1. Resultado de los tratamientos evaluados in vitro frente a *Vibrio* sp. Placa A: 1. AF, 2. FK, 3. EO, 4. Oseanah; Placa B: 5. Oseanah+T80, 6. Oseanah, 0: T80.

Figure 1. Results of the in vitro treatments evaluated against *Vibrio* sp. Plate A: 1. AF, 2. FK, 3. EO, 4. Oseanah; Plate B: 5. Oseanah+T80, 6. Oseanah, 0: T80.

Evaluación *in vivo* de la sinergia entre ácidos orgánicos y fitobióticos frente a *Vibrio* sp.

En el recuento de *Vibrio* totales, inicialmente se obtuvo una carga total de $1,5 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de Hp. Con base a los resultados obtenidos, se evidenció que los organismos ya presentaban una concentración considerable de bacterias (Fig. 2).

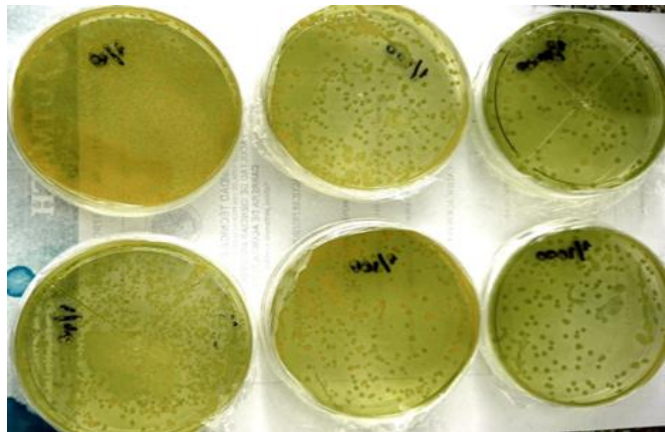
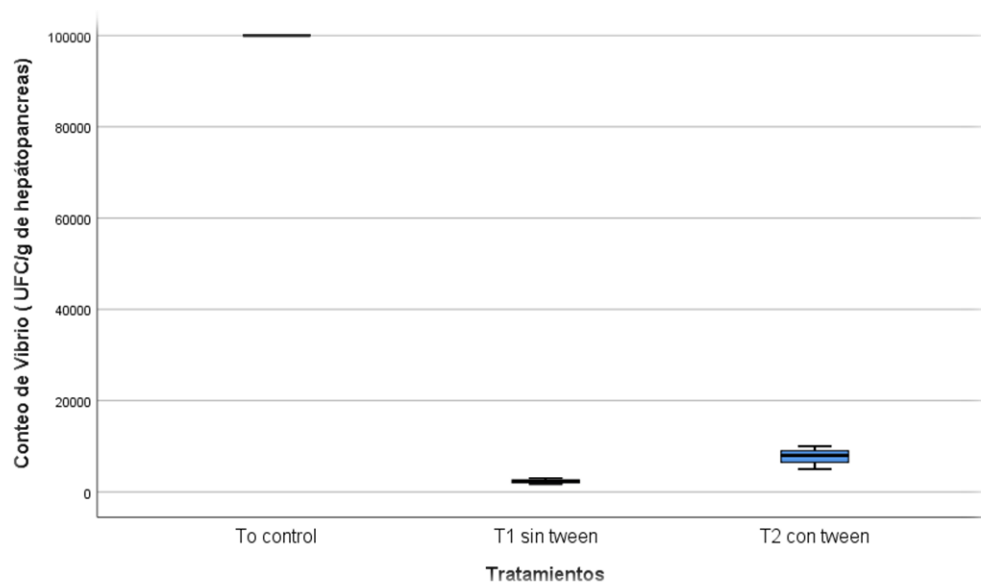


Figura 2. Conteo en placa con agar TCBS 1000^{-1} con un total de $1,5 \times 10^6$ UFC g⁻¹ Hp.

Figure 2. Plate count on TCBS agar 1000^{-1} with a total of $1,5 \times 10^6$ CFU g⁻¹ Hp.

Tras 10 días de aplicación de los tratamientos, se observó que la carga de *Vibrio* en T1 y T2 disminuyó en comparación con el control, lo que podría indicar que la mezcla de las 3 sustancias inhibe el crecimiento de las bacterias.

El ANOVA evidenció diferencia significativa respecto al control ($F=4,1573 \times 10^{-10}$; $p<0,05$). Esto indica que el patógeno bacteriano es sensible a la mezcla de las sustancias. Además, manifiesta que los animales alimentados con T1 “Oseanah sin Tween 80” presentaron una mayor reducción de la carga de *Vibrio* sp. en comparación al tratamiento control (Fig. 3).



Medias con distinta letra presentan diferencias estadísticamente significativas dentro de la misma columna ($p<0,05$ %).

Figura 3. Concentración (media±DE) de *Vibrio* totales en función a los tratamientos utilizados.

Figure 3. Total *Vibrio* concentration (mean±SD) based on the treatments applied.

Al comparar la carga inicial de *Vibrio* spp. ($1,5 \times 10^6$ UFC g⁻¹ Hp) con el control T0 (1×10^5 UFC g⁻¹ Hp) después de 10 días (Tabla 3) mediante una prueba ANOVA, se observó que los recambios de agua posiblemente influyeron en la disminución de las bacterias. No obstante, al analizar la comparación entre los tratamientos T1 y T2, se evidenció que fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), con reducciones de 97,67 % y 92,33 %, respectivamente, denotando que el tratamiento T1 presentó una mayor efectividad en la reducción de bacterias patógenas.

Tabla 3. Recuento de bacterias (UFC g⁻¹ Hp) inicial y final, junto con T1 y T2.

Table 3. Initial and final bacterial count (CFU g⁻¹ Hp), along with T1 and T2.

Recuento de UFC g ⁻¹ Hp			
Carga inicial	T0 (Balanceado)	T1 (Oseanah)	T2 (Oseanah + T80)
1 500 000	100 000 ^a	2333,33 ^b	7666,67 ^c
Reducción		97,67 %	92,33 %

Medias con distinta letra presentan diferencias estadísticamente significativas dentro de la misma fila ($p < 0,05$ %).

DISCUSIÓN

Evaluación de la sinergia entre ácidos orgánicos y extracto de orégano

La prueba de sensibilidad frente a patógenos es fundamental para evaluar la efectividad de una sustancia contra microorganismos específicos, y poder elegir el mejor tratamiento posible frente a una enfermedad, asimismo permite monitorear la aparición de resistencia microbiana a dicha sustancia.

En cuanto a los resultados obtenidos, se pudo evidenciar que cada sustancia por separado presentó diferente sensibilidad a las sustancias, ya que cada uno mostró diferentes tamaños de halos de inhibición. Así se observó que el extracto de orégano (EO) ($0,50 \text{ ug mL}^{-1}$) presentó un halo de 7,24 mm, lo cual coincide con Aguirre (2021), quién trabajó con la extracción del aceite de orégano sin diluir frente a varias cepas de *Vibrio* sp. (HP2-V, HP4-V1, Im-Alg, Im-Tum) y evidenció halos entre 8,4 a 14 mm. Asimismo, Morales-Covarrubias *et al.* (2018) trabajaron con infusión de hojas de orégano para verificar su efecto inhibitorio sobre *Vibrio* sp. describiendo halos de inhibición entre 9 y 17 mm, resultados superiores al de la presente investigación. Esto sugiere que el orégano tiene actividad antibacteriana, pero existe diferente sensibilidad por parte del patógeno, lo cual puede deberse a diferentes factores relacionados con la planta y el método de extracción.

Paredes *et al.* (2007) también presentaron resultados semejantes, trabajando con aceite de orégano al 100 % frente a cepas de *Vibrio* sp. (HP2-V HP4-V1 CD13, CD14), reflejando halos de inhibición de 8,4 a 14 mm, quienes además argumentan que la diferencia de diámetro de halos de inhibición generalmente se debe a la especie de orégano con la que se está trabajando, ya que los niveles del compuestos bioactivos (timol y carvacrol) variarán dependiendo de la especie, condiciones climáticas, método de extracción y medio de dilución, entre otras. Estos hallazgos sugieren que el aceite de orégano tiene un efecto inhibitorio sobre la cepa estudiada, lo que indica que podría ser utilizada frente a patógenos bacterianos.

Por otro lado, López (2018) realizó una evaluación del Tween 80 de manera individual y en mezcla con el extracto de orégano [EO (40 %) + T80 (60 %)] frente a bacterias Gram-negativas en un ensayo de sensibilidad, y concluyó que la aplicación individual del Tween 80 no presenta efectos inhibitorios, argumentando que su uso no afecta la actividad antimicrobiana del EO, lo cual concuerda con los resultados obtenidos del presente trabajo.

Wing-Keong y Chik-Boon (2016) comentan que los ácidos orgánicos representan una variedad de sustancias producto de la fermentación de carbohidratos, señalados por tener al menos un Grupo ácido carboxílico, y que pueden servir para la inhibición de patógenos. En esta investigación se trabajó con ácido fórmico (AF al 2,5 %) que, al ser evaluada su sensibilidad frente al patógeno por método de difusión en placa, se obtuvo un halo de 8,75 mm, lo que indica que también existe inhibición de *Vibrio* spp. y que podría ser utilizado como tratamiento para esta enfermedad. Como lo indican Mine y Boopathy (2011), quienes estudiaron la capacidad inhibitoria del AF frente a *Vibrio harveyi*

por el método de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, señalando que se logró una reducción completa del *Vibrio* a una concentración igual o superior de 0,035 %. Asimismo, Adams y Boopathy (2013) continuaron con la investigación, esta vez usando 5 cepas de *Vibrio* sp. (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) obteniendo resultados similares a sus primeras investigaciones.

De esta manera se destaca que la aplicación del ácido fórmico *in vitro* a bajas concentraciones (2,5 %), ya sea mediante espectrofotometría o difusión en placa, tiene efectos positivos en la reducción de bacterias patógenas, y esto se debe a la capacidad del AF de alterar el pH, la membrana celular de las bacterias y a la desnaturalización de las enzimas y proteínas (Silhavy *et al.* 2010).

En la actualidad, no existe información en acuicultura que indique la sensibilidad de los vibrios frente a una mezcla de ácido fórmico, formiato de potasio o aceite de orégano, pero se respalda la sinergia obtenida de los compuestos “Oseanah” con y sin Tween 80 con bibliografía que corrobora el uso del EO con otros ácidos orgánicos. De este modo, Reyes (2017) verificó que existe efecto sinérgico entre la combinación de ácidos orgánicos y fitoquímicos, y en sus resultados evidenció efecto inhibitorio *in vitro* frente a *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND⁺), exponiendo a ácidos orgánicos con una Concentración Inhibitoria (CI) de 11,23 a 100 mM y de fitoquímicos de 4,18 y 10 % (v v⁻¹). Además, añadió que la efectividad del ácido acético con fitoquímicos presentó una mayor actividad inhibitoria de 94,11 % con un valor de CI de 0,98-10 %. Finalmente, argumenta que su combinación es una alternativa para evitar el uso de antibióticos en el tratamiento de enfermedades.

De manera similar, Lin *et al.* (2005), observaron los efectos de una mezcla de extracto de orégano, arándano y ácido láctico, en la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus*, donde se mostró un efecto sinérgico cuando la concentración fenólica de los extractos totales fue de 0,1 mg ml⁻¹ en relación 50 %:50 % p p⁻¹ con el ácido láctico a un pH 6, generando un halo de inhibición de 20 mm. Esto indica que la combinación de fitobióticos con ácidos orgánicos podría ser una alternativa amigable frente a vibrios, ya que se potencia la sensibilidad frente al patógeno.

Efecto de la mezcla entre ácidos orgánicos y extracto de orégano en *Penaeus vannamei*

En la bacteriología inicial, los organismos presentaron una carga de $1,5 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de Hp. De acuerdo con los intervalos recomendados por Morales-Covarrubias (2011), una cantidad de colonias verdes con conteos de 1×10^6 UFC g⁻¹ de Hp es considerada preocupante por lo que se debería tomar acciones de inmediato para evitar pérdidas en el cultivo.

Por otro lado, en el análisis comparativo entre la carga inicial de *Vibrio* sp. en el hepatopáncreas $1,5 \times 10^6$ UFC g⁻¹ Hp y la del grupo control T0 después de 10 días 1×10^5 UFC g⁻¹ Hp, Tabla 3, resaltó que los recambios periódicos de agua también contribuyeron significativamente a reducir la población bacteriana en los tratamientos, lo que concuerda con Piñeros-Roldan *et al.* (2020), quienes indican que un buen manejo del estanque junto con aireación, contribuye a mantener una buena calidad del agua y por ende una baja carga de microorganismos. Pero, además, al realizar la comparación final entre los tres tratamientos, se enfatiza que el uso Oseanah sin Tween 80 incide de manera significativa en la disminución total de *Vibrio* sp. presentes en el hepatopáncreas.

Con base en los resultados proyectados en la tabla 3, se observó que existe una reducción del 97,67 % y 92,33 % en la carga bacteriana de *Vibrio* en los tratamientos 1 y 2 en comparación con el control, respectivamente, lo que puede indicar que la combinación de los monoterpenos del EO junto con los ácidos orgánicos pueden actuar en conjunto para la reducción del patógeno. Cada sustancia presenta diferentes mecanismos de acción, pero estos pueden ser potenciados cuando se combinan como lo indica Reyes (2017), quién expone que los polifenoles mezclados con ácidos orgánicos son beneficiosos ya que produce una mayor alteración en la membrana celular de las bacterias, contribuyendo a su reducción.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los obtenidos por He *et al.* (2017) quienes también trabajaron con aceites esenciales (timol, 1,7 %; vainillina, 1,0 %) y ácidos orgánicos (cítrico 25 %, sórbico 16,7 %) en el cultivo de *Penaeus vannamei*, y determinaron que 0,3 g kg⁻¹ agregados en la dieta presenta efectos positivos mejorando el sistema inmune específico, la microbiota intestinal y favoreciendo la resistencia ante *Vibrio parahaemolyticus*, lo que se refleja en una reducción en el conteo de bacterias.

De igual manera, Lin *et al.* (2005), trabajaron con una mezcla de extracto de orégano y arándano, junto con ácido láctico, en la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* en camarones. Evidenciaron una reacción sinérgica cuando la concentración fenólica de los extractos totales fue de 0,1 mg mL⁻¹ en 50 %:50 % p p⁻¹, junto con el ácido láctico a un pH 6, observando una reducción total de *Vibrio parahaemolyticus*. Adicionalmente, señalan que la capacidad del ácido láctico frente a vibrios mejora con una mezcla de extractos fitoquímicos, ya que estas sustancias causan daños letales en la membrana celular de dichas bacterias.

En el análisis de los resultados obtenidos *in vivo*, se observó que la aplicación de Oseanah en la alimentación provocó una disminución en la carga bacteriana de *Penaeus vannamei*. Es fundamental asegurarse de que las concentraciones utilizadas en la evaluación de productos sean adecuadas, dado que se trata de organismos vivos. Además, es crucial garantizar que las sustancias sean inocuas, ya que los extractos vegetales pueden tener efectos adversos en los animales de cultivo. Armijos y Vacacela (2022) demostraron que una alta concentración de extracto de orégano (>50 µg mL⁻¹) puede ocasionar una reducción en el conteo total de hemocitos.

CONCLUSIONES

A través de los resultados obtenidos mediante la prueba de sensibilidad, se evidenció que la formulación realizada para obtener una posible sinergia entre ácido fórmico, formiato de potasio y extracto de orégano fue efectiva, demostrando un efecto inhibitorio frente a bacterias del género *Vibrio*. Además, la dosificación de Oseanah mostró resultados más efectivos en la disminución de *Vibrio* sp. después de un intervalo de aplicación de 10 días en el alimento bajo las condiciones descritas. Aunque este estudio sugiere una sinergia positiva, la efectividad de estas combinaciones puede depender de varios factores, como la concentración de cada compuesto, el tipo de microorganismos, y su aplicación en el campo acuícola.

Declaración de conflicto de interés de los autores

Los autores declaran no tener conflictos de interés relacionado con el presente trabajo.

Declaración de buenas prácticas en el uso de seres vivos

La investigación ha seguido todas las normativas internacionales y nacionales de Ecuador para el cuidado y uso de animales, incluyendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki y las directrices de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE). También se ha respetado la Constitución de la República del Ecuador y el Código Orgánico de Ambiente (COA), que regulan el uso de fauna en investigaciones. Además, se han adoptado los 5 Dominios del Bienestar Animal, asegurando condiciones óptimas de nutrición, ambiente, salud y bienestar, con especial énfasis en minimizar el estrés de los animales involucrados.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Técnica de Machala por permitirnos realizar el presente proyecto de la mano de nuestros especialistas, Dra. Lita Sorroza e Ing. Brian Mocha y a las sugerencias de los revisores y editores del manuscrito, que contribuyeron de manera significativa a su mejora.

REFERENCIAS

- Adams D., Boopathy R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biología*, 68(6):1017-1021. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0251-x>
- Aguirre L., Sánchez-Suarez H., Ordinola-Zapata A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* sp. aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4):1-15. [doi:http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386](http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386)

- Armijos C., Vacacela L. (2022). Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la disminución de bacterias totales en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala, Ecuador
- Casanova-Nodarse E. Rodeiro I., Ponce, L. (2023). Potencialidades como antivirales de compuestos de origen marino: una revisión. *Revista de Investigaciones Marinas* 42(2): 67-92. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7407450>
- Gámez-Bayardo S. Espinoza-Plascencia A. Jiménez-Edeza M. Pérez-Álvarez A., García-Galaz A., Bermúdez-Almada M. (2021). Estudio de caso: evaluación y efecto del alimento con oxitetraciclina preparado industrialmente y con un procedimiento establecido en granja sobre el desarrollo del camarón *Penaeus vannamei* y su acumulación en músculo y hepatopáncreas. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 24:1-13. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.305>
- García-Valenzuela M., Orozco-Medina C., Molina-Maldonado C. (2012). Antibacterial effect of essential oregano oil (*Lippia berlandieri*) on pathogenic bacteria of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica*, 22(3): 201-206.
- Gómez, C., Carbay Y., Sorroza L., Rivera I. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibrios en sistema productivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas* 2(3):91-98. <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/188/246>
- He W., Rahimnejad S., Wang L., Kai C., Lu K., Zhang C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 7(1):164–173. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- Lin Y.T., Labbe R.G., Shetty K. (2005). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6(4):453-458. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.002>
- López E. (2018). Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador
- Martín L., López G., Farnés O. (2022). Sistema inmune de camarones peneidos de cultivo: una revisión. *Revista de Producción Animal* 34(1):127-153. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpa/v34n1/2224-7920-rpa-34-01-127.pdf>
- Mine S., Boopathy R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current microbiology* 63(1):1-7. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9932-2>
- Ministerio de Acuacultura y Pesca. (2018). ACUERDO Nro. MAP-SCI-2018-0001-A <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/08/MAP-SCI-2018-0001-A.pdf>
- Morales-Covarrubias M.S., Ruiz-Luna A., Moura-Lemus A. P., Montiel V. T. S., Conroy G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Red de Revistas científica de América Latina, el Caribe, España y Portugal* 21(5):434-446.
- Morales-Covarrubias M., Cuéllar-Anjel J., Varela-Mejías A., Elizondo-Ovares C. (2018). Shrimp Bacterial Infections in Latin America: A Review. *Asian Fisheries Science* 1(31):76-87. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2018.31.S1.005>
- Paredes M., Gastélum M., Silva R., Nevárez-Moorillón G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnica Mexicana* 30(3):261 – 267. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61003008.pdf>

- Pérez-Chabela M., Álvarez-Cisneros Y., Soriano-Santos J., Pérez-Hernández M. (2020). Los prebióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una revisión. *Hidrobiológica* 30(1):93-105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/Pérez>
- Piñeros-Roldan A., Gutiérrez-Espinosa M., Lapa-Viana M., Coelho-Emerenciano M. (2020). Aireación en la tecnología Biofloc (BTF): principios básicos, aplicaciones y perspectivas. *Revista politécnica* 16(31):29-40. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v16n31a3>
- Reyes G. (2017). Efecto sinérgico antimicrobiano in vitro de ácidos orgánicos y fotoquímicos, frente a *Vibrio parahaemolyticus*, potencialmente patógenos aislados de cultivos de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de maestría, Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. México
- Saucedo-Urriarte J., Honorio-Javes C., Vallenas-Sánchez Y., Acuña-Leiva A. (2020). Bacteriófagos: aliados para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura. Un primer punto de parte en la acuicultura ecológica. *Journal of the Selva Andina Animal Science* 7(2), 107-121. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2020.110200107>
- Silhavy T. J., Kahne D., Walker S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(5):a000414.
- Varela-Véliz H., Elizalde B. Solórzano S., Varela-Véliz G. (2017). Exportación de camarón de la provincia del Oro en el contexto del tratado comercial con la Unión Europea. *Revista Espacios* 38(61):24. <https://www.revistaespacios.com/a17v38n61/a17v38n61p24.pdf>
- Wing-Keong N., Chik-Boon K. (2016). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in aquaculture* 9(4):342-368. <https://doi.org/10.1111/raq.12141>
- Zhang Q., Lin L., Ye W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine* 13(1):1-26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

