



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

“ACEITES ESENCIALES COMO INHIBIDORES DE LA VIRULENCIA DE *Vibrio*
spp. PATÓGENOS DE CAMARÓN *P. vannamei*”

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister En Ciencias de
la Acuicultura Marina**

Presentado por: Cristóbal Leonardo Domínguez Borbor

Director de tesis: Jenny Rodríguez León. Ph.D.

Codirector: Aminaél Sánchez Rodríguez. Ph.D.

Guayaquil – Ecuador, 2020

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradecido con Dios, nuestro creador por ser mi fuente de vida, por darme las fuerzas necesarias día a día para sobreponerme a las adversidades.

Extiendo mi agradecimiento, a mi familia de manera muy especial a mi amada esposa Mirian Laínez y mis queridos hijos (Ian, Jerson y Cristopher), por la paciencia y el apoyo brindado, para la culminación de esta etapa de mi vida. A mi amada Madre, aunque ya no estés en este mundo terrenal, siempre serás mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme a obrar bien en la vida, por tus sabios consejos que todo se aprende y al final todo viene por añadidura.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) de manera especial al director, Ph.D. Stanislaus Sonnenholzner, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi Tesis de grado.

De manera muy especial, a mi tutora-CENAIM, Ph.D. Jenny Rodríguez León, la mentalizadora de esta propuesta de investigación, por su amistad, disponibilidad, asesoría y confianza para mi libre desempeño tanto intelectual como experimental en el desarrollo de mi tesis de grado.

A mis compañeros(as) de trabajo de trabajo, del área de biodiversidad, Gaby, Marissa, Paúl, Bolívar, Cecilia y Karla. De igual forma a mis compañeros de salud animal, Bonny, Leandro, Ramiro, Martha, Rosa, Irma, Fanny, Betsy. Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Dedico este trabajo de investigación a toda mi familia, compañeros de labores, y de manera especial a mi tutora.

1.1 Tribunal de Graduación

María del Pilar Cornejo Rodríguez. Ph.D.
Decana FIMCM-ESPOL

Jenny Antonia Rodríguez León. Ph.D.
Directora de tesis

Aminael Sánchez Rodríguez. Ph.D.
Codirector de tesis

Nardy del Valle Diez García. Ph.D.
Miembro del tribunal 1

Bonny Narcisa Bayot Arroyo. Ph.D.
Miembro del tribunal 2

1.2 Declaración Expresa

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral - Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

Cristóbal Leonardo Domínguez Borbor

C.I 0921536843

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	II
1.1 Tribunal de Graduación	III
1.2 Declaración Expresa	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	IX
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVO GENERAL	6
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
4. MARCO TEORICO	7
4.1. Los vibrios en el cultivo de camarón	7
4.2. Medidas terapéuticas contra los vibrios.....	8
4.3. Estrategia Antivirulencia	8
4.4. Productos naturales en la estrategia antivirulencia	10
5. METODOLOGÍA Y MÉTODOS	11
5.1 Metodología	11
5.2 Métodos	13
5.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.	13
5.2.2. Aceites esenciales evaluados.....	13
5.2.4. Efecto de los EOs sobre la bioluminiscencia de <i>V. harveyi</i> y <i>V. campbellii</i>	14
5.2.5. Efecto de los EOs sobre la formación de las biopelículas de los <i>Vibrio</i> spp.	15
5.2.6. Efecto del EOOv en la producción de exopolisacáridos (EPS) en <i>V. parahaemolyticus</i> positivo a pirA/B.	16
5.2.7. Efecto de los EOs sobre motilidad de enjambre	17
5.2.8. Efecto de EOOv sobre la motilidad de enjambre y la formación de biopelículas en <i>V. parahaemolyticus</i> positivo a pir A/B mediante análisis transcriptómico.	17
5.2.9. Toxicidad de los EOs <i>in vitro</i>	18
5.2.10. Toxicidad de los EOs <i>in vivo</i>	19
5.2.11. Efecto antivirulencia <i>in vivo</i> de los EO	19

5.2.12. Efecto del uso de los EOs en estanques de engorde de <i>P. vannamei</i>	20
5.2.13. Análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	21
6.1. Determinación de dosis subletales de los EOs.....	21
6.2. Inhibición de la bioluminiscencia de <i>V. harveyi</i> y <i>V. campbellii</i>	23
6.3. Efectos de los EOs en la formación de biopelículas de los <i>Vibrio</i>	25
6.4. Efecto del EOOv en la producción de exopolisacáridos (EPS) en <i>V. parahaemolyticus</i>	28
6.5. Efectos de los EOs en la motilidad de enjambre	29
6.6. Efecto de EOOv sobre la motilidad de enjambre en <i>V. parahaemolyticus</i> mediante análisis transcriptómico.	33
6.7. Toxicidad de los EOs <i>in vitro</i>	36
6.8. Toxicidad de los EOs <i>in vivo</i>	37
6.9. Efecto de los EOs sobre la virulencia de los <i>Vibrio</i> spp.....	39
6.9.1. Efecto sobre la virulencia de <i>V. campbellii</i> en larvas de <i>P. vannamei</i>	39
6.9.2. Efecto sobre la virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> en juveniles de <i>P. vannamei</i> 40	
6.10. Efecto beneficioso de los EOs en estanques de cultivo de <i>P. vannamei</i>	41
7. Conclusiones y recomendaciones.....	43
8. Bibliografía.....	44
9. Anexos o apendices	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del quorum sensing en vibrios.....	9
Figura 2. Principales compuestos activos anti-QS presente en los EOs.....	11
Figura 3. Representación pictórica en la búsqueda de aceites esenciales con actividad antivirulencia para el control de vibrios patógenos en el cultivo de camarón <i>P. vannamei</i> . 12	
Figura 4. Efecto de los EO en el crecimiento de los <i>Vibrio</i> spp. (A) <i>V. harveyi</i> , (B) <i>V. campbellii</i> , (C) <i>V. vulnificus</i> y (D) <i>V. parahaemolyticus</i> . A la concentración máxima anti-QS (10.0 µg ml ⁻¹). Los valores se presentan como como la media de seis réplicas, de las lecturas de OD ₆₀₀ de los cultivos tratado con EOs y control	23
Figura 5. Efecto de varias concentraciones de EO sobre bioluminiscencia de los <i>Vibrio</i> (a) <i>V. harveyi</i> y (b) <i>V. campbellii</i> . Los datos de luminiscencia mostrados se realizaron 12 h después de la adición de los EOs. La bioluminiscencia en el tratamiento control se estableció al 100% y los otros tratamientos se normalizaron en consecuencia. Las barras de error representan la desviación estándar de seis réplicas. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).....	25
Figura 6. Efecto de varias concentraciones de los dos EOs en <i>Vibrio</i> , sobre la formación de biopelículas. (a) efecto del EOOv y (b) el EOMa. Los datos se representan como media \pm SD de seis réplicas del porcentaje de formación de biopelículas. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).	27
Figura 7. Efecto del EOOv a varias concentraciones sobre las biopelículas de los vibrios patógenos. Biopelículas teñidas con naranja de acrídida observada en microscopio de epifluorencia. Barra de escala 20 µm.....	28
Figura 8. Efecto del EOOv sobre la inhibición en la producción de EPS del <i>V. parahaemolyticus</i> (BA94C2). Los datos se representan como media \pm SD de seis réplicas del porcentaje de producción de EPS. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).....	29
Figura 9. Efecto de varias concentraciones de EO en <i>Vibrio</i> motilidad enjambre. (a) efecto de EOOv y (b) EOMa. Los datos se representan como media \pm SD, seis réplicas de los diámetros de la motilidad migratoria enjambre de los <i>Vibrio</i> spp. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).....	31
Figura 10. Efecto de los EOs sobre el enjambre de los vibrios. Después de 72 h de incubación	32

Figura 11. EOs efecto atenuador sobre el enjambre de <i>V. vulnificus</i> (resistente a la oxitetraciclina) en presencia de antibiótico oxitetraciclina. Después de 96 h.	33
Figura 12. Los puntos rojos en la parte superior representan cada gen que se sobreexpresó y en la parte inferior los genes reprimido y los puntos negros los genes sin cambio respecto al control en <i>V. parahaemolyticus</i> positivo a pir A/B. En 12A) Efecto del EOOv respecto al control y en 12B) Efecto del antibiótico respecto al control.	35
Figura 13. Prueba de toxicidad realizada con aceites esenciales en hemocitos de camarones (2 h, de exposición a los EOs). La viabilidad de los hemocitos en el tratamiento de control se estableció al 100% y los otros tratamientos se normalizaron en consecuencia. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).	36
Figura 14. Resultados de supervivencia de larvas de <i>P. vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de aceites esenciales en tres etapas de desarrollo. Supervivencia acumulada después de 72 horas de exposición. Se muestran los valores promedio con DS (n = 6). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).	38
Figura 15. Efecto de dos EO sobre la virulencia de <i>V. campbellii</i> , mortalidad acumulada (%) de <i>P. vannamei</i> PLs 96 horas después de la exposición al patógeno <i>V. campbellii</i> , crecido con EO a dos dosis subletales. La barra de error representa el S.D. de la media (n = 6). El asterisco (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P < 0.05$, Dunnett's)	40
Figura 16. Efecto del mejor aceite esencial EOOv sobre la virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> , mortalidad acumulada (%) de juveniles de <i>P. vannamei</i> 96 horas después de la exposición al patógeno <i>V. parahaemolyticus</i> , crecido con EO a dos dosis subletales. La barra de error representa el S.D. de la media (n = 6). El asterisco (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P < 0.05$, Dunnett's).	41

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
±	Desviación estándar
µg	Microgramos
µl	Microlitro
ADNasa	Enzima desoxirribonucleasa
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
AI	Autoinductores
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CV	Cristal violeta
EOCc	Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>
EOCv	Aceite esencial de <i>Cinnamomum verum</i>
EOMa	Aceite esencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
EOOv	Aceite esencial de <i>Organum vulgare</i>
EOs	Aceites esenciales
EOTv	Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>
EPS	Exopolisacáridos
g	Gramos
h	Horas
ha	Hectáreas
hpe	Horas después de la exposición
Kg	Kilogramos
LBa	Medio de cultivo microbiológico Luria Bertani agar
LBb	Medio de cultivo microbiológico Luria Bertani caldo
LD50	Dosis que causa el 50% de mortalidad
M-1	Mysis-1
m ²	Metros cuadrados
MBC	Concentración mínima bactericida
MIC	Concentración mínima inhibidora
ml	Mililitro

mm	Milímetros
MTT	Sal de tetrazolio (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
OD	Densidad óptica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PirA y PirB	Toxina altamente letal para camarones
PL	Postlarva
QS	Quorum sensing
SS	Solución salina
Tween-80	Monooleato de sorbitán de polietilenglicol
UCF	Unidades formadoras de colonias
Z-1	Zoea-1

1. RESUMEN

La aparición de nuevas cepas de vibrios virulentos y resistentes a los antibióticos comunes ha causado importantes pérdidas económicas a la industria del cultivo del camarón. Por lo tanto, es necesario adoptar nuevas estrategias para el control de los vibrios. Los aceites esenciales (EO) han mostrado diferentes propiedades biológicas, incluidas las propiedades antimicrobianas. En este trabajo, evaluamos el potencial de cinco EO a dosis subletales para interrumpir los siguientes indicadores de detección de quórum (QS), la bioluminiscencia en dos cepas de vibrios bioluminiscentes y la formación de biopelículas y la motilidad enjambre en cuatro cepas de *Vibrio* spp. de interés acuícola: *V. harveyi* (cepa E22), *V. campbellii* (cepas LM2013), *V. parahaemolyticus* (cepa ATCC 27969), *V. vulnificus* (cepa S2) y *V. parahaemolyticus* (cepa BA94C2) positivo a pir A/B. Dos EO, el aceite de orégano (EOOv) y el aceite de árbol de té (EOMa) afectaron significativamente ($P < 0.05$) los indicadores QS de los cinco *Vibrio* evaluados. El EOOv fue más eficiente para inhibir el QS en comparación con el EOMa y se obtuvo un efecto similar usando $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EOOv y $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EOMa. Con la finalidad de desentrañar el mecanismo de acción del mejor EO sobre la virulencia del *V. parahaemolyticus* causante de enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda en camarón se usó un abordaje transcriptómico, donde el *Vibrio* fue cultivado con el aceite a dosis subletal. El análisis transcriptómico reveló que el EOOv desacoplo el genoma del *Vibrio*, y múltiples genes fueron reprimidos significativamente ($P > 0.05$), destacando los genes involucrados en la producción de proteínas de sideróforos, proteína de resistencia a múltiples fármacos, proteína de repuestas a factores estresantes, formación de biopelículas, motilidad, enjambre y afectación del sistema de secreción tipo VI, asociado a la producción de toxina pir A/B. La inocuidad de ambos EOs (EOOv y EOMa) se evaluó en hemocitos estadios larvales tempranos de camarón *P. vannamei*. Las dosis activas más bajas que inhiben los indicadores de QS no exhibieron efectos tóxicos en los hemocitos ni en las larvas de *P. vannamei*. Se realizó una prueba de desafío con *V. campbellii* en postlarvas (PL8) y con *V. parahaemolyticus* (cepa BA94C2) en camarones juveniles (2.7 g) de *P. vannamei*. Las dos cepas fueron cultivadas en presencia de EO a dosis activas subletales. Ambos EOs

redujeron significativamente ($P < 0.05$) la tasa de mortalidad acumulada de las PL y juveniles de *P. vannamei* desafiada con las dos cepas de *Vibrio*. Estas observaciones indican que la virulencia de *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* fueron afectada por los EO. Se realizó un bioensayo en un estanque de cultivo de *P. vannamei*. Los EO se administraron diariamente en la alimentación a dos concentraciones diferentes de 2.5 y 5.0 mg Kg⁻¹ durante todo el ciclo de crecimiento de 102 días. En la cosecha, se evaluaron varios parámetros de producción. La supervivencia y el rendimiento fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) en los estanques donde los camarones fueron tratados con EO en comparación con los estanques donde los camarones no fueron tratados (control), obteniendo $93.1 \pm 4.4\%$ y 1041 ± 89.5 Kg/ha usado EOOv y $86.2 \pm 4.5\%$ y 912 ± 67.6 Kg / ha usado EOMa. La supervivencia y el rendimiento en los estanques del control fueron $72.0 \pm 8.7\%$ y 715.9 ± 96.4 Kg/ha respectivamente. En conclusión, los EO constituyen herramientas adecuadas para controlar la vibrios en los sistemas de cultivo de camarones mediante la adopción de la estrategia antivirulencia.

2. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarones *P. vannamei*, es una de las actividades acuícolas más ampliamente desarrollada en el mundo, debido a su adaptabilidad y alto rendimiento, se estima que la producción para el 2018 fue de 4.8 millones de toneladas, cuatro veces más que hace dos décadas (FAO, 2018). Para el Ecuador el cultivo de camarón representa la principal actividad acuícola y actualmente es el primer producto de exportación no petrolero. Además, la camaronicultura se considera un motor principal de la economía ecuatoriana, ya que genera 210,000 empleos directos e indirectos (CNA, 2017). A pesar del crecimiento exitoso de la industria camaronera en estas dos últimas décadas, constantemente la producción se ve afectada por la aparición de nuevas enfermedades, principalmente las causadas por virus o bacterias altamente letales (Flegel, 2012; Walker and Mohan, 2009). Particularmente, las enfermedades de origen bacteriano son ocasionadas por bacterias pertenecientes al género *Vibrio*, conocidas como vibriosis (Jayasree et al., 2006; Noriega-Orozco et al., 2008). Recientemente, se ha informado la aparición de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) provocada por varias cepas de vibrios que producen la toxina, PirA y PirB, altamente virulenta para camarones peneidos (Lai et al., 2015; Xiao et al., 2017). El rol patogénico del género *Vibrio* en el cultivo de camarón ha sido bien documentado por ocasionar grandes pérdidas económicas a nivel global (De Schryver et al., 2014; Shinn et al., 2018; Soto-Rodriguez et al., 2015; Stentiford et al., 2017).

Una de las estrategias más recurrente para tratar las vibriosis en el cultivo de camarón son los antibióticos, pero su uso conlleva al surgimiento de cepas resistentes, anulando su acción terapéutico (Brunton et al., 2019; Santos and Ramos, 2018). Los antibióticos también afectan la microbiota benéfica propias de los animales, y lo más relevante, las trazas de los antibióticos en los animales cultivados conllevan el riesgo del desarrollo de cepas multirresistentes (Santos and Ramos, 2018; Yen et al., 2020), que pueden constituirse en un serio riesgo de salud pública (Rohr et al., 2019). Por lo tanto, otras estrategias se deben emplear para el control de las bacterias virulentas en acuicultura. La implementación de la terapia antivirulencia propuesta para organismos acuícolas (Tom Defoirdt et al., 2008; Zhao

et al., 2015) resulta muy prometedora para el control de vibrios patógenos (Naik et al., 2018; Natrah et al., 2011).

La estrategia antivirulencia se basa en la interrupción de la comunicación bacteriana, conocida como Quorum Sensing (QS, por sus siglas en inglés) (Clatworthy et al., 2007; Defoirdt, 2018; Waters and Bassler, 2005). La terapia antivirulencia minimiza el riesgo de aparición de resistencia microbiana (Lesic et al., 2007; Totsika, 2016), debido a que el mecanismo de acción se basa en la inhibición de la virulencia sin afectar el crecimiento de bacterias, a diferencia de las estrategias basadas en antibióticos que matan (bactericidas) o inhiben (bacteriostático) el crecimiento de bacterias causando una presión de selección dentro de la comunidad bacteriana (Cabello, 2006; Watts et al., 2017). Mediante el QS, las bacterias se comunican a través de pequeñas moléculas químicas llamadas autoinductores (Nealson, 1977; Reading and Sperandio, 2006; Rutherford and Bassler, 2012), adquiriendo un comportamiento colectivo para regular la expresión de varios factores de virulencia, incluida la producción de bioluminiscencia (T. Defoirdt et al., 2008; Dunlap, 1999), desarrollo de biopelículas (Dickschat, 2010; Zhou et al., 2012), producción de exopolisacáridos (Maunder and Welch, 2017; Shrout and Nerenberg, 2012), motilidad de enjambre (Daniels et al., 2004; Shrout et al., 2006), transferencia de plásmidos (Lang and Faure, 2014), producción secundaria de metabolitos. Interacciones con El huésped y otros microbios dependen de la densidad de población.

Es bien conocido que la bioluminiscencia, la formación de biopelículas, la motilidad enjambre y la producción de toxinas en el género *Vibrio* están mediadas por la detección del sistema QS (Henke and Bassler, 2004; Yang et al., 2015; Yildiz and Visick, 2009), que permite a los vibrios distinguir entre alta o baja densidad de población y coordinar la expresión genética de toda la comunidad. A través del QS, los vibrios pueden lanzar un ataque coordinado que facilite la superación de las barreras de defensa del anfitrión. El QS influye en la virulencia de los vibrios patógenos en la acuicultura (Brackman et al., 2008a; Defoirdt, 2019; Kiran et al., 2016). Prevenir la comunicación de los vibrios o una alteración en el QS puede reducir o incluso abolir su virulencia (Tom Defoirdt et al., 2008; Zhao et al., 2015).

Estudios recientes han demostrado que los productos naturales, específicamente los aceites esenciales (EO, por sus siglas en inglés) en concentraciones no microbicidas, pueden alterar el sistema QS y, por lo tanto, la virulencia de las bacterias patógenas (Ferro et al., 2016; Myszka et al., 2016). Omonijo et al. (2018) propone como una alternativa eficiente y segura a los EO como un reemplazo para los antibióticos. Sin embargo, la investigación sobre el uso de aceites esenciales en el cultivo de camarones *P. vannamei* es limitada (Bandeira et al., 2017). El propósito de este estudio fue identificar EO que interfieran con el QS de los vibrios patógenos del camarón *P. vannamei*. Se evaluaron cinco EO *in vitro* para determinar su capacidad de afectar los indicadores de QS. Los fenotipos evaluados fueron bioluminiscencia, formación de biopelículas, producción de exopolisacáridos y crecimiento de enjambres en cinco cepas de vibrios patógenos de camarones, a dosis subletales que no afectan el crecimiento de los vibrios. Dos EO fueron elegidos por su capacidad de afectar los indicadores de QS en los vibrios evaluados. Se seleccionó el mejor EO para dilucidar el mecanismo de acción sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* positivo a pirA/B focalizando en formación de biopelículas y el crecimiento en enjambre, mediante el uso de transcriptómica. Para los ensayos *in vivo* se evaluó la seguridad de los EO a concentraciones activas mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, en hemocitos y estadios larvarios de camarones. Finalmente, se evaluó el efecto de los EO sobre la virulencia de *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* positivo PirA/PirB en ensayos de desafío. Además, se realizó un bioensayo en los estanques de cultivo de camarones *P. vannamei*, donde se suministraron EO diariamente en el alimento. Los resultados obtenidos indican la viabilidad de utilizar EO como agentes de control de virulencia para vibrios patógenos en la acuicultura de camarones.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar aceites esenciales inhibidores de factores de virulencia de vibrios a fin de emplearlos para el control de vibriosis en el cultivo de camarón *P. vanammei* mediante la adopción de la estrategia antivirulencia.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar aceites esenciales que afecten fenotipos de virulencia (bioluminiscencia, biopelículas y crecimiento en enjambre) en cinco vibrios patógenos de camarón, mediante ensayos *in vitro*.
2. Determinar el mecanismo de acción del aceite esencial más activo sobre la virulencia del *V. parahaemolyticus* causante de la enfermedad necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *P. vannamei* mediante transcriptoma.
3. Evaluar la inocuidad de los aceites esenciales a dosis activas anti-QS a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* hemocitos y estadios larvarios susceptible de *P. vannamei*.
4. Evaluar *in vivo* en *P. vannamei* los mejores aceites esenciales, mediante su aplicación en desafíos con vibrios patógenos y en estanques de producción.

4. MARCO TEORICO

4.1. Los vibrios en el cultivo de camarón

La acuicultura es el sector alimentario de más rápido crecimiento a nivel mundial. Pero, actualmente, el mayor problema que enfrenta la industria acuícola son las enfermedades causadas por diversos agentes biológicos (Flegel, 2012; Lightner, 2011; Thitamadee et al., 2016). Las bacterias particularmente las del género *Vibrio* han sido reportados como agentes causales de varias enfermedades en el cultivo de camarón, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en varios países productores de camarón, a través de la historia de la industria del cultivo de camarón (Phiwsaiya et al., 2017; Shinn et al., 2018; T. A. Bell, 1988; Tran et al., 2013). Se ha documentado el papel patogénico de varias cepas de vibrios para camarón, destacando entre ellas *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. owensis*, *V. vulnificus*, *V. campbellii*, *V. orientalis* (Gopal et al., 2005; Phuoc et al., 2009; Sotomayor et al., 2019). Recientemente, varias cepas de vibrios han sido reportadas como causante de AHPND en camarones peneidos (Liu et al., 2017; Restrepo et al., 2018). Si bien es cierto existen varios informes que destacan el rol patogénico de los vibrios para los camarones de cultivo, también hay cepas de vibrios que son usadas como probióticos para el cultivo de *P. vannamei* (Gullian et al., 2004; Rodríguez et al., 2007).

Las enfermedades provocadas por los vibrios son conocidas comúnmente como vibriosis, inicialmente se creía que los vibrios eran patógenos secundarios en los cultivos de camarón, pero informes recientes demuestran que las vibrios también puede ser patógenos primarios, tal es el caso cepas que causan la AHPND, al producir la toxina pir A/B altamente letal para camarones (Dong et al., 2019; Xiao et al., 2017). Ante, esta problemática ocasionada por los vibrios se ha vuelto común el uso de antibióticos, como medida profiláctica para su control en los cultivos de camarón. Sin embargo, el uso de antibiótico genera otros efectos perjudiciales como, matar a la flora microbiana propia de los animales (Zeng et al., 2019), ocasiona daños irreversibles en el ambiente, debido a que alteran la flora microbiana en el entorno e inducir el surgimiento de resistencia microbiana (Santos and Ramos, 2018), comprometiendo su eficacia. Además, pueden conllevar al desarrollo de bacterias multiresistente que pueden constituirse en serios problemas de salud pública (Albuquerque Costa et al., 2015; Okocha et al., 2018; Yen et al., 2020).

4.2. Medidas terapéuticas contra los vibrios

Varias son la estrategia empleada para el control de vibrios patógeno en el cultivo de camarón, usando productos preventivos como, por ejemplo, bacterias probióticas (Domínguez-Borbor et al., 2019; Farzanfar, 2006; Kumar et al., 2016), inmunoestimulantes betaglucanos (Mohan et al., 2019; Rodríguez et al., 2007), productos naturales extractos de plantas (Chaudhari et al., 2014). Productos antimicrobianos como ácidos orgánicos (He et al., 2017; Mroz, 2005), aceites esenciales (Pezzani et al., 2017), y antibióticos (Albuquerque Costa et al., 2015; Henriksson et al., 2018). En estos últimos años se ha visto un crecimiento acelerado de bacterias resistente a los antibióticos comunes en sistemas de producción de camarón (Kitiyodom et al., 2010; Sotomayor et al., 2019). Este escenario ha conllevado a la búsqueda de nuevas sustancias alternativas eficientes que replacen a los antibióticos sin afectar la salud humana, y a explorar otros mecanismos de acción de las moléculas para hacer frente los vibrios patógenos. Los agentes antimicrobianos tradicionales resultan en la muerte celular del patógeno, lo que induce a la resistencia microbiana siendo fundamental abordar otras estrategias menos agresivas pero eficientes para contra la virulencia de los vibrios patógenos de camarón.

4.3. Estrategia Antivirulencia

La interrupción del QS, está siendo explorada en esta ultimada década. Este mecanismo juega un rol importante en el éxito patogénico de bacterias (LaSarre and Federle, 2013). Mediante el QS las bacterias pueden distinguir entre una alta o baja densidad poblacional y coordinar la expresión genética de toda la comunidad, regulando la expresión de genes de virulencia, incluyendo la bioluminiscencia, formación de biopelículas, producción de exopolisacáridos, transferencia de plásmidos y crecimiento en enjambre (Rutherford and Bassler, 2012). La comunicación de las bacterias está dada por pequeñas moléculas de señalización química denominadas autoinductores (AIs) (Dickschat, 2010; Nealson, 1977; Sedlmayer et al., 2018). Estas señales permiten a los patógenos lanzar un ataque coordinado que facilita la superación de las barreras de defensa del huésped. Una alteración en el QS puede reducir o incluso abolir la virulencia en las bacterias (Defoirdt et al., 2005; Enomoto et al., 2017). La estrategia antivirulencia en acuicultura ha sido propuesta por varios autores como una herramienta promisorio para el control de las bacterias patógenas (Defoirdt et al., 2011). Se ha descrito

que la detección del QS en los vibrios utiliza un sistema de tres canales (Fig.1), el canal 1, que consiste en el autoinductor HAI-1 dependiente de LuxM y el sensor HAI-1, LuxN. El canal 2, consiste en el autoinductor AI-2 dependiente de LuxS y el detector AI-2, LuxPQ. El Canal 3, consiste en el autoinductor CAI-1 dependiente de CqsA y un sensor llamado CqsS (Wadsworth and Cockell, 2017; Yang et al., 2011). Regulando, la bioluminiscencia, formación de biopelículas, producción de hemolisinas, motilidad y movimiento en enjambre y la virulencia (Santhakumari et al., 2018; Yang et al., 2015; Yildiz and Visick, 2009). Un estudio in vivo realizado por Defoirdt et al. (2005) describió que la virulencia de *V. harveyi* en *Artemia franciscana* está mediada por los canales AI2 y CAI-1, de hecho, cuando inactiva el luxS AI-2 sintasa o el gen del receptor AI-2 luxP, se elimina la virulencia de *V. harveyi*.

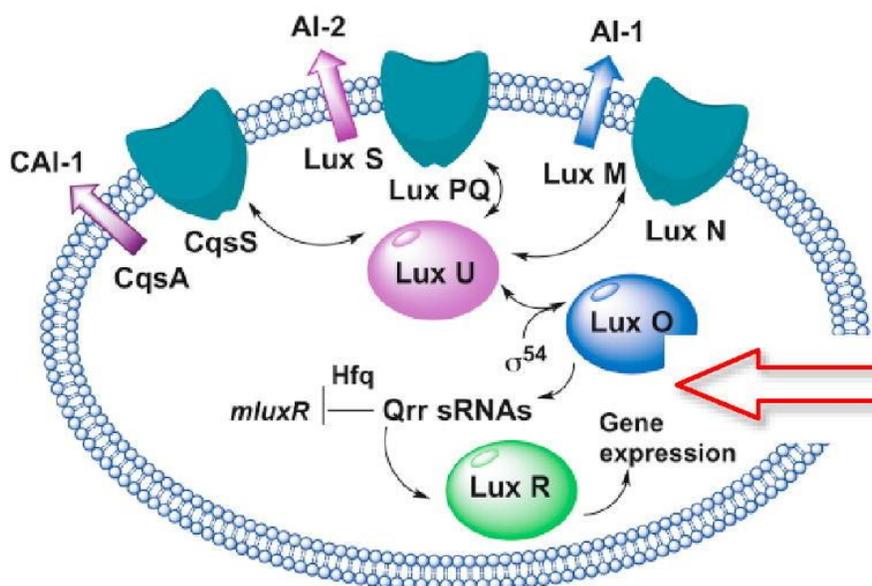


Figura 1. Esquema del quorum sensing en vibrios.

Fuente: Martín-Rodríguez et. (2015)

La producción de bioluminiscencia es una de las características fenotípicas importantes de los vibrios luminiscentes que participa en el establecimiento del patógeno en el huésped (Kiran et al., 2016). De igual forma, la motilidad de enjambre es necesaria para desarrollar una población bacteriana colonial tanto dentro como fuera del huésped y es fundamental para el desarrollo de las biopelículas (Fünfhaus et al., 2018; Shrouf et al., 2006). Varios estudios indican que las biopelículas son importantes para la supervivencia, la virulencia y la

resistencia al estrés en *Vibrio spp.* La formación de biopelículas generalmente se asocia con la colonización y la posterior patogénesis de vibrios en huéspedes de ambientes marinos. Por ejemplo, *V. harveyi* es capaz de formar biopelículas en las superficies de una losa de cemento, cupones de plástico y acero (Karunasagar et al., 1996), elementos ampliamente utilizados en los sistemas de cultivo de camarones. La formación de biopelículas conduce a una mayor resistencia a los antibióticos (King et al., 2008), debido a que las bacterias quedan dentro de una matriz extracelular de exopolisacáridos (EPS) de producción propia, compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular, que puede restringir la difusión de agentes antimicrobianos (Bai A and Vittal, 2014; Maunders and Welch, 2017; Powell et al., 2018). Por lo tanto, interferir con la bioluminiscencia, formación de biopelículas, producción de exopolisacáridos y crecimiento en enjambre en los vibrios es esencial para afectar su virulencia.

4.4. Productos naturales en la estrategia antivirulencia

Los productos naturales, particularmente los aceites esenciales (EOs), son sustancias aromáticas y lípidas que se pueden obtener de diferentes partes de las plantas, y su efectividad está dada por las proporciones de las moléculas bioactivas (Bassolé and Juliani, 2012; Faleiro M.L., 2011), pudiendo variar en un amplio y diverso espectro de acción dentro del mismo género de planta. Además, la misma especie de planta puede diversificar y presentar una composición química diferente dependiendo también de las condiciones ambientales y climáticas en las que crecen, la etapa de madurez y el método de extracción (Ozdemir et al., 2017). En esta última década los EOs han despertado el interés de varios científicos por su actividad anti-Quorum (Alvarez et al., 2014; Joshi et al., 2016; Nazzaro et al., 2013; Poli et al., 2018; Szabó et al., 2010), afectando la formación de biopelículas y otros factores de virulencia en varias bacterias patógenas, incluyendo vibrios (Brackman et al., 2008a; Sun et al., 2019). Varios estudios han demostrado que la actividad anti-QS de los EOs se debe a las moléculas presente en los EOs (Fig. 2) (Camele et al., 2019), por ejemplo, el carvacrol con 0.8 mM inhibió efectivamente las biopelículas de *Chromobacterium violaceum*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. Mith et al. (2015), documentó que el carvacrol presente en EO de (*Origanum heracleoticum*) es el compuesto activo que afecta la producción de toxina en *E. coli*. Aunque las moléculas suelen proporcionar mejores

resultados de bioactividad, también el efecto se puede reducir debido a que la actividad puede estar ligado a la mezcla complejas de moléculas presente en los EOs. Además, en términos económicos resulta más aplicable usar como tal los EOs que a moléculas purificadas, debido a que esto puede incrementar considerablemente los costos de producción. Los EOs han sido reconocidos durante mucho tiempo como compuestos antimicrobianos ecológicos con bajas toxicidades en mamíferos, y clasificados como sustancias seguras (GRAS) por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, 2016), sin riesgo para los consumidores, según la Comisión Europea (Burt, 2004).

Plant scientific name	Family	Essential oils	Raw materials	Principal bioactive constituents	References
<i>Carum carvi</i> (L.) Sprengel	Apiaceae	Caraway	Fruits	Limonene 51%, sabinene 0.3%, β -myrcene 0.4%, β -pinene 0.2%, linalool 0.2%, Bornyl acetate	Raal et al., 2012; Al-Haidari et al., 2016
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Oregano	Leaves	Carvacrol 75%, linalool 1.3%, limonene 1.3%, (E)-citral 2.5%, γ -terpinene 0.1%, 1,8-cineole 0.2%, eugenol 1.2%	Mancini et al., 2014; Elshafie et al., 2017; Asfour, 2018
<i>Majorana hortensis</i> L.	Lamiaceae	Marjoram	Flowers	α -pinene 9%, β -pinene 3.8%, limonene 6.4%, 1,8-cineole 33.5%, γ -terpinene 0.1%, linalol 9.8%	Kerekes et al., 2013; Elshafie et al., 2016a; Luciardí et al., 2016
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Thyme	Leaves	Carvacrol 3.5%, <i>p</i> -cymene 11.2%, terpinene 4.8%	Elshafie et al., 2015a; Asfour, 2018
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	Sage	Leaves	Camphor 13.9%, limonene 1.4%, α -pinene 4.4%, 1,8-cineole 4.2%	Elshafie et al., 2016a; Asfour, 2018
<i>Verbena officinalis</i> L.	Verbenaceae	Vervain	Leaves	Limonene 2.3%, 1,8-cineole, <i>cis</i> -Anethole 0.2%, linalol 0.1%, camphor 0.2%	Duke, 1992; Rehecho et al., 2011; Chalchat and Garry, 1995
<i>Lavandula stoechas</i> L.	Lamiaceae	Lavender	Flowers	Fenchone 34.9%, camphor 28.9%	Poli et al., 2018
<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tan.	Rutaceae	Clementina	Peel	Sabinene 31.4%, linalool 20.4%	Kerekes et al., 2013; Luciardí et al., 2016; Poli et al., 2018
<i>Murraya koenigii</i> (L.) Sprengel	Rutaceae	Curry tree	Leaves	Caryophyllene 9.49%, caryophyllene oxide 1.02%, α - and β -phellandrene 0.07%, α -Terpinene 2.37%, linalol 0.19%	Chowdhury et al., 2008; Bai and Vittal, 2014
<i>Hyptis suaveolens</i> L.	Lamiaceae	Pignut	Leaves	<i>Trans</i> - β -caryophyllene 11.3%, α -pinene (2.3), camphor 2.6%, β -myrcene 1.5%, <i>p</i> -cymene (11.2), limonene (7.2), γ -terpinene (1.5)	Stashenko et al., 2013
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Rosemary	Leaves	α -pinene (26%), 1,8-cineole (25%), camphor 12%	Alvarez et al., 2012; Melito et al., 2019

Figura 2. Principales compuestos activos anti-QS presente en los EOs.

Fuente: Ippolito Camele et al. (2019)

5. METODOLOGÍA Y MÉTODOS

5.1 Metodología

Cinco aceites esenciales fueron emulsionados en solución salina 2% NaCl + Tween-80 (1.0%), para determinar la mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida con la finalidad de trabajar con dosis subletal, es decir que afecten la virulencia

de las bacterias sin afectar el crecimiento de los vibrios. Establecida las dosis que no afectaban el crecimiento de los vibrios se realizó el cribado de cinco aceites esenciales, sobre tres indicadores de comunicación bacteriana (bioluminiscencia, biopelículas y crecimiento en enjambre) en cinco cepas de vibrios patógenos de camarón. Identificando las dosis y los aceites esenciales más bioactivos anti-QS, se determinó *in vitro* e *in vivo* su inocuidad en hemocitos y estadios larvarios temprano de *P. vannamei*. Posteriormente se evaluó *in vivo* el efecto de los aceites esenciales sobre la virulencia en dos aislados de vibrios patógenos de camarón, mediante prueba de desafío con inóculos de los vibrios crecido en exposición con aceite esencial y sin aceite esencial. Finalmente se determinó el efecto de los aceites esenciales mediante un experimento donde se adicione aceites esenciales en el alimento durante todo un ciclo de cultivo de *P. vannamei* a dosis activas previamente identificadas evaluando al final de la cosecha la supervivencia, rendimiento, factor de conversión alimenticia y días de cultivo. La (Fig. 3), muestra un esquema de la metodología del estudio investigativo.

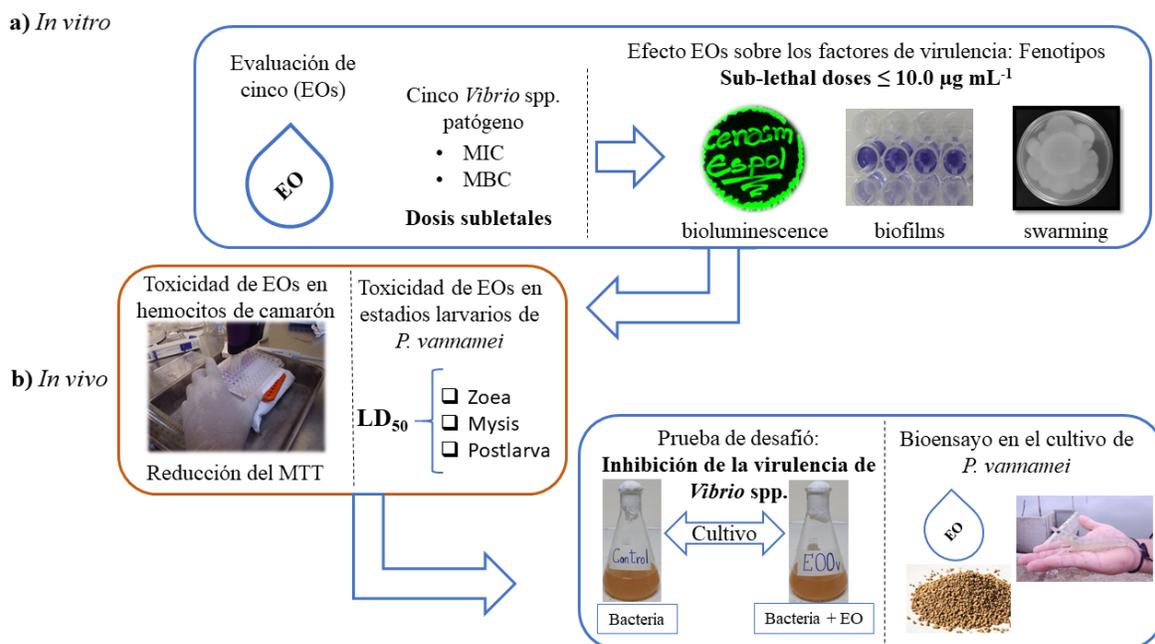


Figura 3. Representación pictórica en la búsqueda de aceites esenciales con actividad antivirulencia para el control de vibrios patógenos en el cultivo de camarón *P. vannamei*.

5.2 Métodos

5.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

En este estudio se utilizaron cinco cepas de vibrios patógenas de camarón, *V. harveyi* (cepa E22), *V. campbellii* (cepas LM2013), *V. parahaemolyticus* (cepa ATCC 27969), *V. vulnificus* (cepa S2) y *V. parahaemolyticus* (cepa BA94C2) positivo a pir A/B (Restrepo et al., 2016). Los vibrios fueron proporcionados por el departamento de microbiología del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), Ecuador. Todas las cepas se cultivaron aeróbicamente en agar Luria Bertani con NaCl al 2% (LBa + NaCl al 2%), mediante siembra de estrías y se incubaron durante 18 horas a 28°C. Luego, colonias individuales se transfirieron al caldo Luria-Bertani suplementado con NaCl al 2% (p/vol) (LBb + NaCl al 2%) y se incubaron a 28 °C con agitación constante (200 rpm) durante 8 h de crecimiento. Los cultivos de *Vibrio* se diluyeron en LBb + NaCl al 2% para obtener suspensiones bacterianas de 2×10^8 UFC ml⁻¹ mediante densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) de 0.4 – 0.6 a 600_{nm}, según la cepa de *Vibrio*. A partir de estas suspensiones bacterianas se hicieron diluciones en serie usando solución salina estéril (SS-2% NaCl), para análisis posteriores.

5.2.2. Aceites esenciales evaluados.

Se evaluaron cinco aceites esenciales (EO sigla en inglés), aceite esencial de *Organum vulgare* (EOOv), aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (EOMa), aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (EOCc) aceite esencial de *Cinnamomum verum* (EOCv) y aceite esencial de *Thymus vulgaris* (EOTv). Para los ensayos anti-QS, los EO se emulsionaron en SS-2 % NaCl + Tween-80 (1.0 %), se usó Tween-80 como agente emulsionante (Deng et al., 2016, informe científico). Para las pruebas de toxicidad *in vitro*, con los EO se emulsionaron en solución salina equilibrada de Hanks (Gibco 14185-052) + Tween-80 (1.0 %). Previamente, se determinó que la sustancia utilizada, como emulsionante (Tw-80) no influya sobre los parámetros evaluados.

5.2.3 Determinación de la dosis subletal, concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y bactericidas (MBC) de los EOs

La concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) y la concentración bactericida mínima (MBC, por sus siglas en inglés) se determinaron con el fin de establecer dosis subletales, para afectar solo la bioluminiscencia, el desarrollo de biopelículas y la motilidad en enjambre, sin afectar la viabilidad de los vibrios. Los valores de MIC se obtuvieron usando una técnica de ensayo de dilución en micropocillos previamente descrita por Sokovicx et al. (2010) con pequeñas adaptaciones. Brevemente, se usaron microplacas de 96 pocillos. Se añadieron 160 μl de LBb + NaCl al 2%, en cada pocillo más 20 μl de EO previamente ajustados a diferentes concentraciones (100, 200, ... 3000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (seis réplicas para cada concentración analizada) y 20 μl de suspensión bacteriana 2×10^8 UFC ml^{-1} . Se incluyeron un control positivo (que contenía inóculo, pero no EO) y un control negativo (que contenía EO, pero no inóculo) en cada microplaca. Las microplacas se incubaron a 28 °C durante 24 h. Este ensayo se realizó para cada una de las cuatro cepas. Los valores de MIC se determinaron como la dosis más baja que afectó crecimiento bacteriano determinado por OD, midiendo la turbidez a 600_{nm} (OD₆₀₀) en un espectrofotómetro de microplacas (VarioskanLux_0315). Para la determinación de la MBC, se sembraron los cultivos de los pocillos seleccionados para el MIC, tres concentraciones superiores e inferiores en placas de TSA + NaCl al 2 %, las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h. Las cajas donde no se observó crecimiento bacteriano (colonias) por la fue concentraciones de los EOs fueron considerado como la MBC y se expresó en (mg L⁻¹), de EO para cada cepa de *Vibrio* evaluada.

5.2.4. Efecto de los EOs sobre la bioluminiscencia de *V. harveyi* y *V. campbellii*.

Dado que la bioluminiscencia en las especies de *Vibrio* es uno de los fenotipos controlados del QS (Manefield et al., 2000), se consideró la posibilidad que los EOs puede afectar la bioluminiscencia de las cepas de *V. harveyi* y *V. campbellii*, cepas bioluminiscentes de tipo salvaje. Para evaluar el efecto de los EOs sobre la bioluminiscencia se siguiendo la metodología descrita por Nackerdien et al. (2009), con ligeras adaptaciones. Brevemente, los cultivos de *Vibrio* se ajustan por OD₆₀₀ ~ (0.40 *V. harveyi*) y (0.46 *V. campbellii*), correspondientes a 2×10^8 UFC ml^{-1} . Las suspensiones bacterianas se diluyeron 1:100 en LBb + NaCl al 2% (concentración final 10^6 UFC ml^{-1}), se transfirieron 20 μL de la suspensión bacteriana a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, que contenía 180 μL de LBb +

NaCl al 2% estéril a diferentes concentraciones subletales (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) de cada EO evaluado. Como control, suspensión bacteriana + LBb + NaCl al 2% sin EO. Seis réplicas para cada concentración. Las microplacas se incubaron a 28 °C durante 12 h. La emisión luminiscente de los *Vibrio* se cuantificó mediante un detector de luminiscencia (VarioskanLux_0315) cada hora durante el bioensayo (12 h). Se consideró como 100% de bioluminiscencia a las bacterias no tratadas con EO.

5.2.5. Efecto de los EOs sobre la formación de las biopelículas de los *Vibrio* spp.

Para determinar el efecto de los EOs sobre la formación de las biopelículas de los vibrios, se utilizaron las cinco cepas de vibrios antes mencionadas. La biomasa de la biopelícula bacteriana se tiñó con cristal violeta (CV) y se cuantificó espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento descrito por Djordjevic et al., (2002) con ligeras modificaciones. Brevemente, se prepararon suspensiones bacterianas de concentración 1×10^6 UFC ml^{-1} de las cinco cepas de *Vibrio* como se describió previamente. Los inóculos bacterianos se diluyeron 1:100 en LBb + NaCl al 2%, 20 μl de suspensión bacteriana se transfirieron a cada pocillo en una microplaca de 96 pocillos, que contenía 180 μl de LBb + NaCl al 2% estéril a diferentes concentraciones subletales de EO (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Como control se utilizó, suspensión bacteriana LBb + NaCl al 2% sin EO. Seis réplicas para cada concentración. Además, se incluyó un antibiótico comercial (oxitetraciclina) a una concentración de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las placas se incubaron a 28 °C durante 36 h. Se eliminaron las células planctónicas y las biopelículas se lavaron cuidadosamente dos veces utilizando 200 μl de tampón (PBS pH. 7.2). Las biopelículas se secaron a 50 ° C durante 30 minutos y se tiñeron con 220 μl de 0.1% de cristal violeta (p/v) (Merck_ C0775), durante 15 minutos. Luego se enjuagaron las placas para eliminar el exceso de tinte y se secaron a temperatura ambiente (28 °C). El colorante impregnado se solubilizó con 220 μl de etanol. Del producto solubilizado, se transfirieron 150 μl de cada pocillo a una nueva microplaca de 96 pocillos y se leyó la densidad óptica a 590_{nm} (OD₅₉₀). Se consideró, como 100%, la biomasa de biopelículas bacterianas no tratadas (control negativo). El nivel de inhibición de la biopelícula se calculó utilizando la fórmula. Porcentaje de inhibición = $[(\text{Control OD} - \text{EO OD}) / \text{Control OD}] \times 100$. Este procedimiento se repitió para cada EO. Adicionalmente, también se visualizaron las biopelículas tratadas con EOs y sin EOs, usando un microscopio

de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE E200) después de la tinción con naranja de acridina (AO, Sigma) (longitud de emisión entre 520 y 650 nm), siguiendo la metodología descrita por Campana and Baffone (2018), con ligeras adaptaciones. En resumen, se transfirieron 4 ml de la suspensión bacteriana de vibrios a una SlideFlask (Nunc cat. No. 170920) especial para cultivo celular, y se añadió 1 ml de solución salina estéril (2% de NaCl) con EO (concentración final 1.0 µg ml). Como tratamiento de control, se empleó una solución salina NaCl al 2% sin EOOv, tres replicas para cada concentración evaluada. Los SlideFlasks se incubaron a 28 °C durante 3 días. Después, se descartaron las células flotantes y se realizaron 2 lavados con tampón (PBS pH. 7.2). Las biopelículas tratadas con y sin EO se tiñeron con 1 ml de solución de naranja de acridina (0.25%) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de la incubación, el SlideFlask se lavó nuevamente con (PBS pH. 7.2) y los portaobjetos de SlideFlask fueron retirados y montados para la observación en un microscopio de epifluorescencia con los juegos de filtros apropiados, se realizaron fotos con una cámara (MshOt MS60) acoplada al microscopio y con software work 2.0 se determinó el volumen de las biopelículas de las imágenes en 3D. Comparando las biopelículas tratadas con EOs respecto al grupo control.

5.2.6. Efecto del EOOv en la producción de exopolisacáridos (EPS) en *V. parahaemolyticus* positivo a pirA/B.

La cuantificación de exopolisacáridos, se realizó siguiendo la metodología descrita previamente por Zhang et al. (2018). Brevemente, la cepa *V. parahaemolyticus* positivo a pirA/B se cultivó en caldo LB 2% NaCl en ausencia y presencia de EOOv a concentraciones (0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 µg ml⁻¹) sin movimiento durante 48 h a 28 ° C. Después de la incubación, los tubos de cultivo se centrifugaron a 5000 × g durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró (0.22 µm) y EPS se precipitó mediante la adición de tres volúmenes de etanol al 95% helado (20 ° C) y se colocó a 4 ° C durante la noche. El EPS precipitado se recogió por centrifugación a 5000 × g durante 30 minutos a 2 ° C, y el sedimento se disolvió en 1 ml de agua desionizada, y se almacenó a -40 ° C hasta su uso posterior. El contenido total de carbohidratos en el EPS se cuantificó por el método del ácido fenol-sulfúrico utilizando glucosa como estándar (Dubois et al., 2019). La absorbancia se midió a 490 nm (OD₄₉₀). El porcentaje de inhibición en la producción de EPS se calculó utilizando la fórmula. Porcentaje de inhibición = [(Control OD - Prueba OD) / Control OD] × 100.

5.2.7. Efecto de los EOs sobre motilidad de enjambre

El efecto de los EOs sobre la motilidad de los cinco vibrios fue evaluado, siguiendo el método descrito por Finchaos et al. (2018), con ligeras adaptaciones. El LBb suplementado con agar al 0.6% + NaCl al 2% se esterilizó en autoclave (esterilizador SN510). El medio LB después de enfriar a $45 \pm ^\circ\text{C}$, se agregaron los EOs por separado a cada concentración a evaluar (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). El medio LB se dispensó en placas de Petri de (100 x 15 mm). Las placas se secaron durante 15 minutos e inmediatamente, se inocularon (5 μL) de 2×10^6 de inóculo *Vibrio* en el centro de las placas. Como control se incluyeron placas Petri con LB suplementado con 0,6% de agar + NaCl al 2% sin EO. Además, se incluyeron placas con la misma cantidad de agar y NaCl + antibiótico (oxitetraciclina) a una sola dosis (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Las placas se incubaron a $26 ^\circ\text{C}$ durante 72 h, luego se midió (mm) la migración de la motilidad de enjambre de cada uno de los vibrios. La migración de la motilidad de enjambre de los vibrios tratados con EO se comparó con la migración de la motilidad de enjambre de los vibrios no tratados. Además, se realizó un ensayo para determinar de efecto de los EOs en presencia de antibiótico, utilizando discos de susceptibilidad antimicrobiana (diámetro 6 mm) de oxitetraciclina (T, 30 μg , oxid). Cajas Petri con LBb suplementado con agar al 0.6% + NaCl al 2%, con EO a una concentración final única de (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y sin EO como (control), fueron preparadas como se describió previamente. Inmediatamente, se inocularon 5 μL de suspensión de bacteria (2×10^6) en el centro de las placas de Petri, y se colocó un disco antibiótico por placa. Las placas Petri se incubaron a $26 ^\circ\text{C}$ durante 72 h en una cámara húmeda. Luego, se midió el diámetro del halo de inhibición, por el del antibiótico en (mm), y se compararon los tamaños de los halos de las placas tratadas con EO con respecto al grupo de control.

5.2.8. Efecto de EOOv sobre la motilidad de enjambre en *V. parahaemolyticus* positivo a pir A/B mediante análisis transcriptómico.

Para dilucidar el mecanismo de acción del EOOv, sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus*, se realizó un análisis transcriptómico sobre la expresión genética involucrada en el enjambre importante fenotipo controlados por QS. Para el ensayo, se seleccionó la dosis más baja pero activa para el QS (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Se prepararon placas con y sin EOOv como se describió anteriormente, cuatro réplicas por tratamiento. También se incluyó un antibiótico

ampliamente utilizado por los acuicultores (oxitetraciclina) a una única dosis $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Después de 72 h, las células que crecen en los bordes de las placas de cada tratamiento se tomaron cuidadosamente con un asa de platino para extraer el ARNm. Se usaron biopelículas de *V. parahaemolyticus* de 72 h de incubación de los tres grupos, con y sin EOOv y antibiótico, para la extracción del ARNm. El ARN se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit (MasterPure™ RNA Purification Kit. Cat. No. MCR85102, Epicenter y la compañía Illumina). Brevemente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, se descartó el sobrenadante y, al sedimento bacteriano, se añadió solución de lisis celular y de tejido que contenía proteinasa K. Se añadió reactivo de precipitación de proteína MPC y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, el sobrenadante se transfirió a tubos limpios de microcentrífuga y se añadió isopropanol y se centrifugó nuevamente para precipitar los ácidos nucleicos. Se añadió solución de ADNasa (ADNasa libre de ARNasa) a las muestras. Posteriormente, se añadieron una solución de lisis 2X T y C y un reactivo de precipitación de proteínas MPC. La muestra se centrifugó nuevamente y los sobrenadantes que contenían el ARN se transfirieron a tubos limpios de microcentrífuga. Posteriormente, se añadió isopropanol y las muestras se centrifugaron, luego los gránulos se enjuagaron dos veces con etanol al 70%. Finalmente, estos se centrifugaron nuevamente, se eliminó el etanol y el residuo pudo evaporarse. El ARN se suspendió en agua ultrapura y se almacenó a ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) hasta su envío a la compañía MACROGEN de Corea para secuenciación por Illumina.

5.2.9. Toxicidad de los EOs *in vitro*

La toxicidad de los EOs fue determinada por exposición directa de los EOs en hemocitos de camarón, siguiendo la metodología previamente descrita por Domínguez et al. (2018). Brevemente, se extrajo hemolinfa de camarones sanos, y se realizó un cultivo primario de hemocitos, a una concentración de $1 \times 10^6 \text{ ml ml}^{-1}$, en placas de 96 pocillos con sales de Hanks (Gibco 14185-052), suplementado con Cl_2Ca 13 mM y 26 mM Cl_2Mg . Las placas fueron incubadas durante 75 minutos a $26 \text{ }^\circ\text{C}$, se retiró el sobrenadante y se colocaron de inmediato 100 μl de sales de Hanks suplementadas con Cl_2Ca 12 mM y Cl_2Mg 6 mM, conteniendo EO a varias concentraciones (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Seis réplicas para la concentración evaluada. Como control hemocitos sin exposición a los EOs. Después de 120 minutos de exposición, se agregaron 10 μl de MTT (5 mg / ml de MTT en sales de

Hanks) a todos los pocillos. Se incubó durante 120 minutos a 27 °C. El sobrenadante se eliminó y los cristales de formarán se disolvieron con 150 µl de isopropanol HCL 0.04 N. Esta reacción colorimétrica se leyó 620nm (OD₆₂₀). Los resultados se transformaron en porcentajes de viabilidad celular usando la siguiente fórmula.

Viabilidad celular OD = (OD células expuestas EO / células de control OD) x 100%.

5.2.10. Toxicidad de los EOs *in vivo*

Para confirmar la inocuidad de los EOs se realizaron *in vivo* tres ensayos independientes, usando tres estadios larvales de alta susceptibilidad, Zoea 1 (Z-1), Mysis 1 (M-1) y Post-larva (PL-3) de camarones *P. vannamei*. Las larvas de *P. vannamei* fueron provistas por un laboratorio comercial en Santa Elena (130 km de Guayaquil). El agua utilizada en las pruebas se filtró y esterilizó en autoclave. Para la prueba con los estadios Z-1 y M-1, la densidad fue (1000 ind. Lt⁻¹), se usaron 6 réplicas para cada concentración evaluada de EO (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 µg ml⁻¹). Los EOs se aplicaron cada 8 horas en relación con el volumen total de agua de cada unidad experimental. Como control, se usaron larvas sin exposición a EOs. Las larvas fueron monitoreadas durante 48 horas. Los datos se transformaron en porcentajes de supervivencia, considerando como 100% la supervivencia de las larvas que no recibieron EO. En la prueba con PL3, la densidad fue (100 ind. Lt⁻¹), se usaron 6 réplicas para cada concentración (0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 µg ml⁻¹). Se inoculó una dosis equivalente a la concentración establecida cada 8 horas. Las larvas fueron monitoreadas durante 96 horas después de la inoculación de los EOs. Los datos se transformaron en porcentajes de supervivencia, considerando como 100% la supervivencia de las larvas que no recibieron los EOs. Además, con los datos obtenidos se determinaron dosis que causaron un 50% de mortalidad (DL50) para cada etapa larval del camarón.

5.2.11. Efecto antivirulencia *in vivo* de los EO

A fin de determinar *in vivo* el efecto antivirulencia de los EOs se realizaron dos bioensayos independientes, donde dos vibrios patógenos fueron crecidos en presencia o ausencia de los EOs a dosis subletales. Bioensayo 1. El efecto antivirulencia de los EOs se verificó mediante una prueba de desafío utilizando larvas sanas de *P. vannamei* de etapa (PL8). Los PL8 fueron alimentados con una dieta comercial cada 4 horas durante todo el bioensayo (96 h). El inóculo

bacteriano se preparó como se describe a continuación, un cultivo de *V. campbellii* crecido durante 10 h, se ajustó a una concentración de 10^8 UCF ml^{-1} . A partir de este inóculo ajustado se transfirió (1.0 ml) diferentes matraces que contenían 1000 ml de caldo fresco LB + NaCl al 2%, con EOs a dos concentraciones subletales (1.0 y $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y sin EOs como control. Los cultivos se incubaron durante la noche a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, con movimiento constante. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron (3500 g, 10 min, $25 \text{ }^\circ\text{C}$), los sobrenadantes se descartaron y las células de pellet se suspendieron en SS-2% NaCl, se ajustaron a 10^7 UFC ml^{-1} y se inocularon inmediatamente a las unidades experimental con las PL-8, a cada tratamiento asignado. El intercambio de agua fue del (50%), se realizó 12 horas después de la exposición (hpe) y la supervivencia se determinó contando el PL8 cada cuatro horas hasta 96 hpe. Considerando el 100% de la virulencia al inóculo de *V. campbellii* cultivado sin EO. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones con 100 post larvas. Se usó agua de mar filtrada y esterilizada con UV, se proporcionó aireación continua y la temperatura se ajustó a $30.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Bioensayo 2. El efecto antivirulencia del EOOv se verificó mediante una prueba de provocación con juveniles sanos de *P. vannamei* de peso $2.52 \pm 0.36 \text{ g}$. Los camarones se dividieron en tres tratamientos, para ser expuestos a *V. parahaemolyticus* (cepa BA94C2) cultivado en presencia o ausencia de EOOv. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones con 15 camarones. El inóculo bacteriano de BA94C2 crecido con EOOv a dos concentraciones (1.0 y $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y sin EOOv fue preparado de la misma forma que se describió para el *V. campbellii*. Los inóculos de BA94C2 ajustado a concentración 10^7 UFC ml^{-1} fue inmediatamente usado para la prueba de desafío de los camarones juveniles, inoculando a cada tratamiento asignado. El intercambio de agua del (50%) se realizó a las 24 hpe y la supervivencia se determinó contando los camarones cada cuatro horas hasta las 120 hpe. Considerando el 100% de la virulencia de BA94C2 a los camarones expuestos al inóculo de BA94C2 cultivado sin EOOv.

5.2.12. Efecto del uso de los EOs en estanques de engorde de *P. vannamei*

El efecto protector de los EOs se evaluó en estanques de producción de camarones *P. vannamei*. Se utilizaron doce estanques de tierra de 400 m^2 cuadrados de la Estación Experimental del CENAIM (Provincia de Santa Elena, Ecuador), para evaluar los dos EOs más prometedores. Se incluyó un grupo de control sin aplicación EO. Cada tratamiento tenía

cuatro réplicas. Un total de 3200 camarones postlarvas (PL12) fueron sembrados en cada estanque (densidad de población de 12 PL m²). Los EOs se aplicaron a dos dosis diarias en los alimentos a una concentración de (2.5 y 5.0 mg Kg⁻¹), desde el primer día de cultivo durante todo el ciclo de producción que duró 102 días. Cada día, las EOs se incorporaron al alimento granulado comercial (28% de proteína) y se suministraron inmediatamente a los estanques asignados. El alimento suministrado a los camarones fue del 3% respecto al peso corporal promedio, y cada semana fue ajustada la cantidad de alimento. Los parámetros ambientales tales como temperatura, O₂ disuelto y salinidad, fueron monitoreados diariamente. La supervivencia final de los camarones (%), el peso promedio (g), los rendimientos de producción (kg/ha) y la relación de conversión alimenticia (FCR) se evaluaron en el momento de la cosecha.

5.2.13. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en seis réplicas, excepto en el bioensayo en estanques de crecimiento donde se utilizaron cuatro réplicas. Los resultados se expresaron como un promedio (\pm desviación estándar) de las réplicas. Los análisis estadísticos se realizaron para determinar diferencias significativas ($P \leq 0.05$) utilizando ANOVA de una vía, después de la verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Cuando se detectaron diferencias significativas, se aplicó un análisis post hoc de Dunnett (grupos de control y tratados). Los datos expresados en porcentajes se transformaron (usando arcoseno), y los supuestos se cumplieron antes de realizar el análisis estadístico. La dosis que causa el 50% de mortalidad (LD₅₀), se estimó mediante regresiones de Probit. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico SPSS (versión 21)

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Determinación de dosis subletales de los EOs

Cada una de los EOs exhibieron diferentes valores de MIC y MBC frente a las cuatro cepas de vibrios evaluadas como se muestra en la (Tabla 1). Los valores de MIC y MBC de EOOv y EOMa fueron los más bajos, con valores de 700–900, 800-1100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (MIC, MCB), para EOOv y 600–1000, 700-1200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (MIC, MCB) para EOMa, lo que demuestra que las actividades inhibitorias y bactericidas fueron más fuertes con respecto a los otros aceites

esenciales evaluados (Tabla 1). Los valores de MIC y MBC se usaron como referencias para pruebas posteriores, y solo a concentraciones subletales inferiores a la MIC se seleccionaron (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) uniformemente para los cinco EO. Además, se verificó que la dosis más alta evaluada (10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) no afecte el crecimiento de los vibrios patógenos (Fig. 4).

Tabla 1. Concentración inhibitoria mínima (MIC) y concentración bactericida máxima (MBC) para cada una de los EOs evaluadas, valor expresado en ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

		Aceites esenciales (EOs)				
<i>Vibrio</i> strains	($\mu\text{g ml}^{-1}$)	EOOv	EOMa	EOCc	EOCv	EOTv
<i>V. campbellii</i> (LM_2013)	MIC	800	800	1500	1000	1900
	MBC	800	900	1500	1200	2000
<i>V. harveyi</i> (E_22)	MIC	700	800	1000	900	2000
	MBC	800	800	1100	900	2100
<i>V. vulnificus</i> (S_2)	MIC	900	1000	2000	1000	1800
	MBC	1100	1200	2200	1100	1800
<i>V. parahaemolyticus</i> (ATCC_27969)	MIC	800	600	1400	1500	1500
	MBC	900	900	1500	1600	1500
<i>V. parahaemolyticus</i> (BA94C2)	MIC	900	1000	1300	1100	900
	MBC	1000	1300	1300	1200	1000

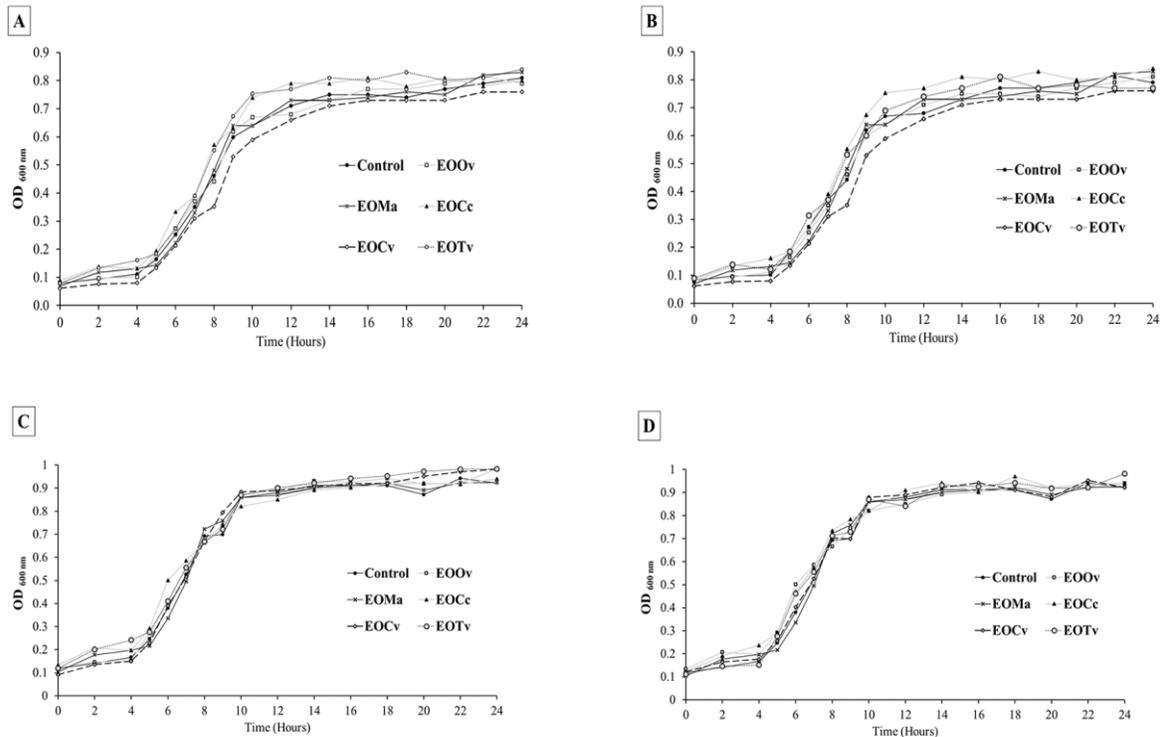
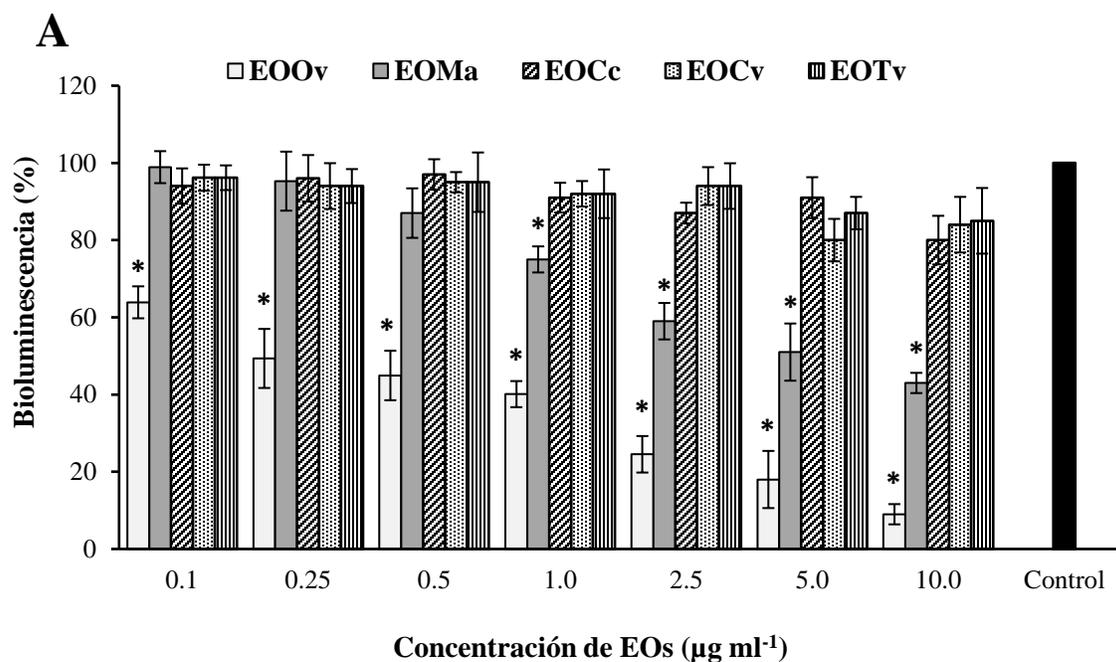


Figura 4. Efecto de los EO en el crecimiento de los *Vibrio* spp. (A) *V. harveyi*, (B) *V. campbellii*, (C) *V. vulnificus* y (D) *V. parahaemolyticus*. A la concentración máxima anti-QS ($10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los valores se presentan como como la media de seis réplicas, de las lecturas de OD₆₀₀ de los cultivos tratado con EOs y grupo control (sin EOs).

6.2. Inhibición de la bioluminiscencia de *V. harveyi* y *V. campbellii*

Los dos EOs, EOOv y EOMa redujeron significativamente ($P < 0.05$) la bioluminiscencia de los dos *Vibrio* spp. evaluados *V. harveyi* (Fig. 5 A) y *V. campbellii* (Fig. 5 B), y el porcentaje de inhibición de la bioluminiscencia, para cada cepa bacteriana, fue dependiente de la concentración de EO (Fig. 5). El EOOv fue el más eficiente para inhibir la bioluminiscencia, por ejemplo, a concentración de $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de EOOv, inhibió más del 50% de la bioluminiscencia de ambos *Vibrio* spp. Mientras que tres EOs (EOCc, EOCv y EOTv) no mostraron ningún efecto sobre la bioluminiscencia de *V. harveyi* y *V. campbellii* en ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 5). La producción de bioluminiscencia es una de las características fenotípicas importantes de los vibrios luminiscentes (Manefield et al., 2000; Vanmaele et al., 2015), que está regulada positivamente por el QS y participa en el establecimiento del patógeno en el huésped (Niu et al., 2006; Wang et al., 2013). Los vibrios

luminiscentes son ampliamente como modelos en la búsqueda de productos anti-QS (Brackman et al., 2008b; T. Defoirdt et al., 2008; Naik et al., 2018; Noor et al., 2019; Vikram et al., 2011), debido a que este fenotipo solo se expresa cuando las bacterias alcanzan el quórum. Por ejemplo, Kiran et al. (2016) utilizaron la inhibición de la luminiscencia de *V. campbellii* para evaluar las características antivirulencia del polihidroxitirato.



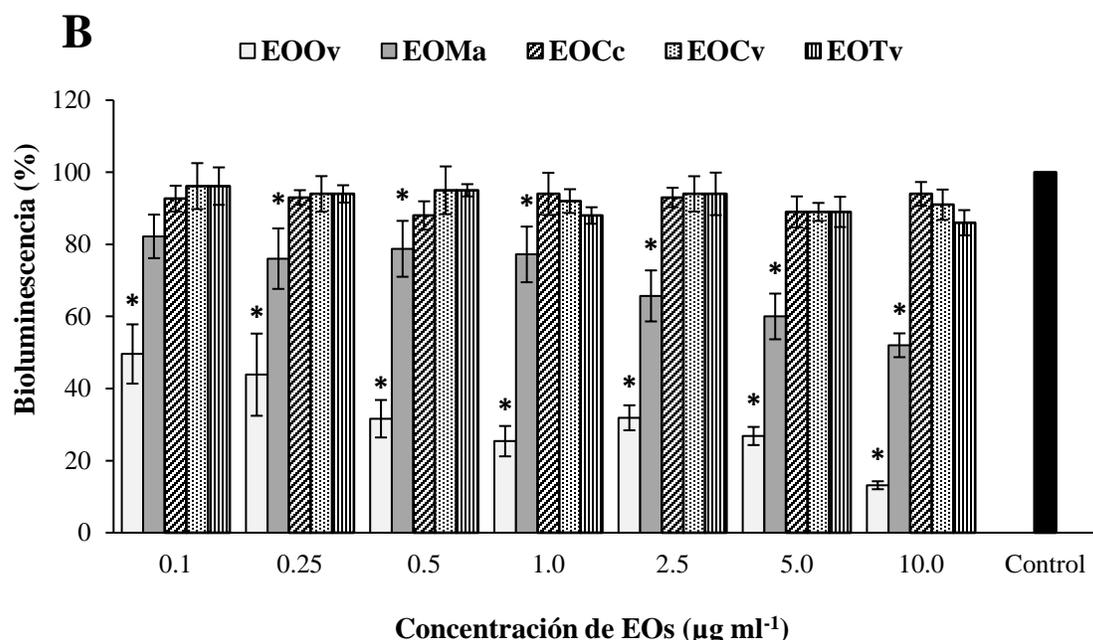


Figura 5. Efecto de varias concentraciones de EO sobre bioluminiscencia de los *Vibrio* (a) *V. harveyi* y (b) *V. campbellii*. Los datos de luminiscencia mostrados se realizaron 12 h después de la adición de los EOs. La bioluminiscencia en el tratamiento control se estableció al 100% y los otros tratamientos se normalizaron en consecuencia. Las barras de error representan la desviación estándar de seis réplicas. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).

6.3. Efectos de los EOs en la formación de biopelículas de los *Vibrio* spp.

Los tres EOs (EOCc, EOCv y EOTv) no exhibieron efecto inhibitorio sobre las biopelículas de los cuatro vibrios patógenos evaluados, por lo que se descartaron para los próximos ensayos. Mientras que EOOv y EOMa redujeron significativamente ($P < 0.05$) las biopelículas de los cuatro vibrios, y el porcentaje de reducción de las biopelículas estuvo en función de la concentración del EO y la cepa de *Vibrio* evaluada (Fig. 6). Cuando se agregaron $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de EOOv, se redujeron las biopelículas $58.2 \pm 6.5\%$ para *V. harveyi*, $53.3 \pm 9.1\%$ para *V. campbellii*, $45.4 \pm 5.3\%$ para *V. vulnificus* $50.4 \pm 8.7\%$, para *V. parahaemolyticus* $52.7 \pm 2.9\%$ y $26.2 \pm 8.4\%$ para *V. parahaemolyticus* (BA94C2), y cuando se adiciono EOOv a concentraciones de 1.0, 2.5 y $5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$, se redujo más del 50% de las biopelículas de los cinco vibrios, y con la dosis máxima evaluada ($10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), solo se desarrolló $22.9 \pm 5.5\%$, $25.8 \pm 7.8\%$, $35.2 \pm 11.3\%$, $27.4 \pm 7.1\%$ y $22.7 \pm 12.0\%$ de las

biopelículas para los cinco vibrios (Fig. 6A). Para el EOMa, la concentración activa más baja, que redujo significativamente ($P < 0.05$) la formación de biopelícula para los cinco vibrios fue de $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, ($24.6 \pm 5.3\%$, $19.4 \pm 2.7\%$, $19.4 \pm 4.9\%$, 23.3 ± 8.0 y $12.3 \pm 6.6\%$), para biopelículas de *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. parahaemolyticus* BA94C2, respectivamente. Y solo a la dosis más alta evaluada ($10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de EOMa), se redujo el 50% de las biopelículas de *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. vulnificus*, pero no de *V. parahaemolyticus* de ambas cepas, que se vio afectado solo en el 35% de la biopelícula (Fig. 6B). La formación de las biopelículas de los cinco vibrios también se vio afectada por el antibiótico (oxitetraciclina). Sin embargo, con el antibiótico, se registró un mayor porcentaje de biopelículas para los cinco vibrios en comparación con los tratados con EO, como podemos ver en la (Fig. 6). La eficacia de los EOs en la prevención de la formación de biopelículas en bacterias de interés clínico y veterinario ha sido bien documentada (Alvarez et al., 2014; Kerekes et al., 2019; Vikram et al., 2011; Zhang et al., 2018), incluso para bacterias resistentes a los antibióticos comunes (Yap et al., 2015). Hasta la fecha, solo se han realizado unos pocos estudios sobre la inhibición de las biopelículas en *Vibrio* spp. patógenos de camarones que utilizan diferentes moléculas como tiofenonas (Yang et al., 2015), polihidroxitirato (Kiran et al., 2016), indol (Yang et al., 2017), catecolamina (Suong et al., 2017), 2, 6-Di-terc-butil-4-metilfenol (Santhakumari et al., 2018). El EOOv y EOMa mostraron un claro efecto para evitar la formación de las biopelículas de los cinco vibrios evaluados. Sin embargo, el EOOv fue el más eficiente. Por ejemplo, a concentración de $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$, afectó al 50% de las biopelículas de los cinco vibrios evaluados (Fig. 6). Hasta donde sabemos, es el primer informe donde EOOv se evalúa como agentes para prevenir la formación de biopelículas en vibrios patógenos de *P. vannamei*. En el presente estudio, el EOOv fue el más eficiente para inhibir los indicadores QS de los cinco vibrios evaluados como podemos apreciar en la (Fig. 7), probablemente la actividad anti-QS observada está relacionada con las considerables proporciones de carvacrol y timol, 45.6% y 5.2%, respectivamente presentes en este EOOv. Burt et al. (2014), 0.8 mM de carvacrol inhibió efectivamente las biopelículas de *Chromobacterium violaceum*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. Mith y col. (2015), documentan que el carvacrol presente en EO de (*Origanum heracleoticum*) es el compuesto activo que afecta la producción de toxina en *E. coli*.

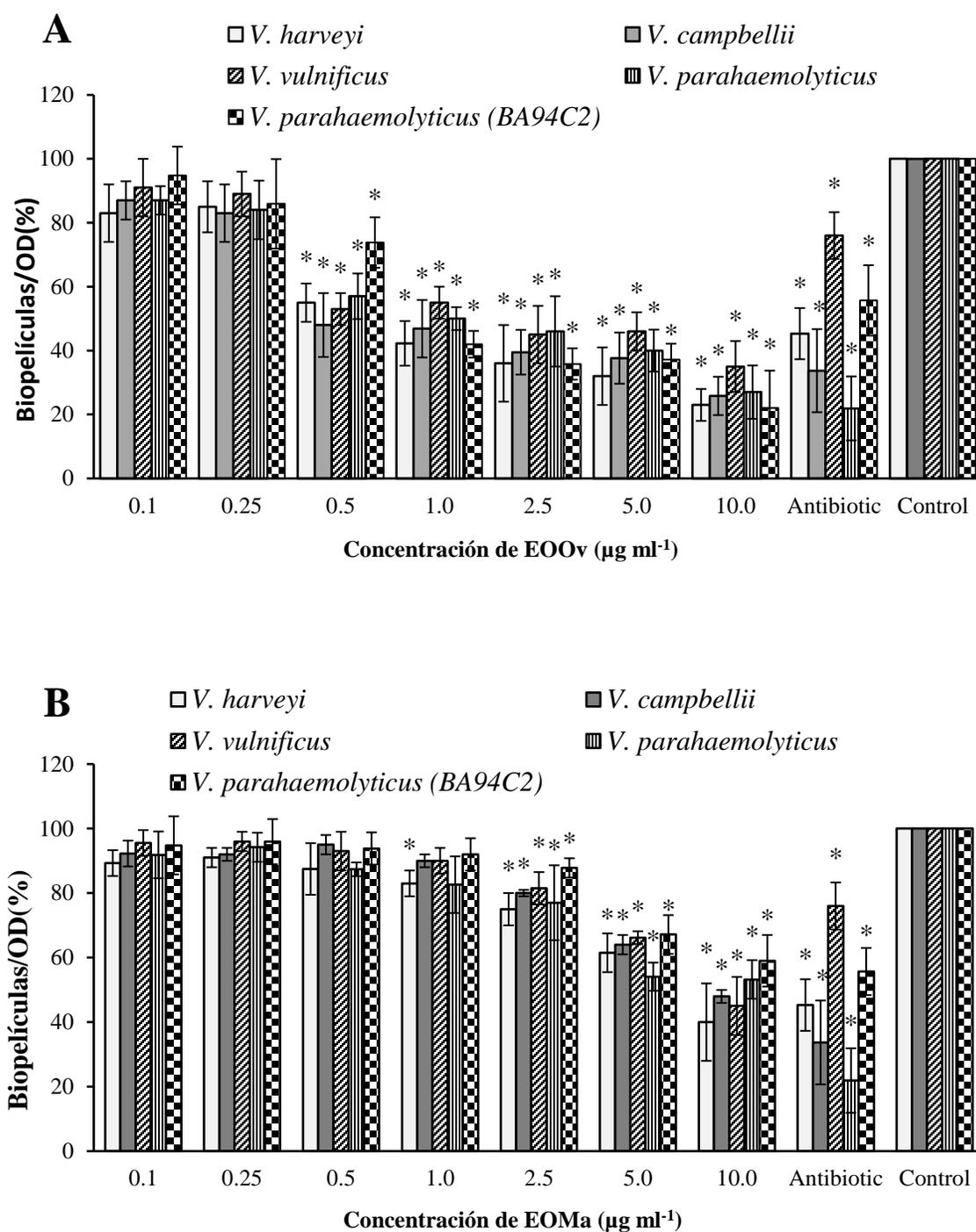


Figura 6. Efecto de varias concentraciones de los dos EOs sobre la formación de biopelículas en los *Vibrio* spp. (a) efecto del EOOv y (b) el EOMA. Los datos se representan como media \pm SD de seis réplicas del porcentaje de formación de biopelículas. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).

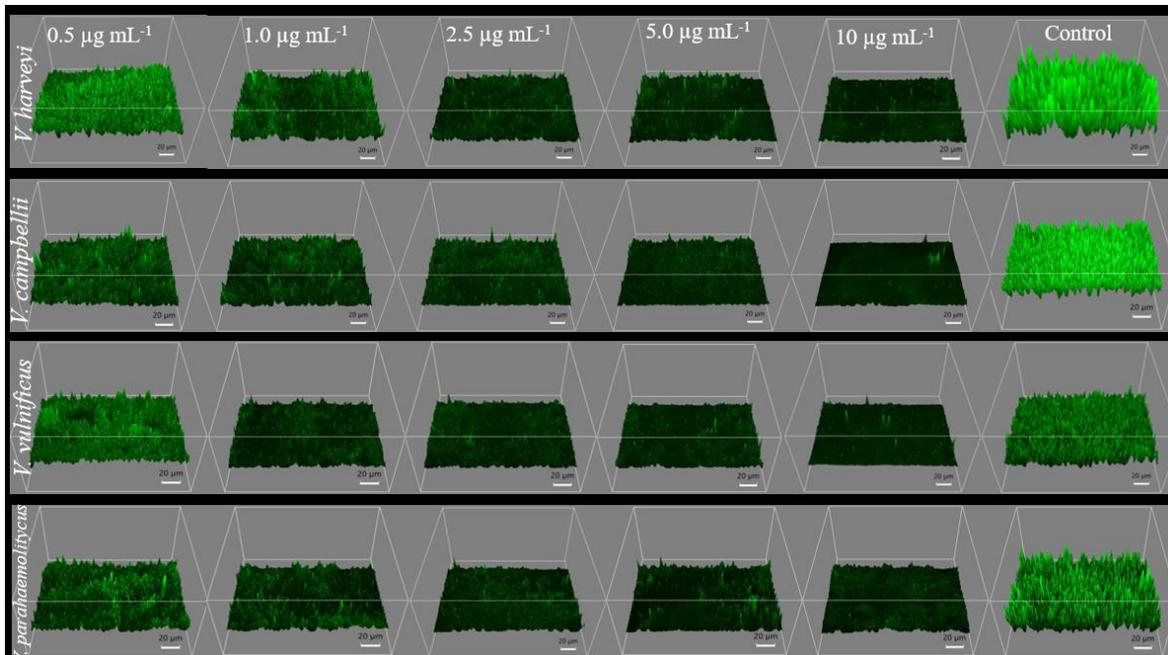


Figura 7. Efecto del EOOv a varias concentraciones sobre las biopelículas de los *Vibrio* spp. patógenos. Biopelículas teñidas con naranja de acrídida observada en microscopio de epifluorescencia, fotos tomadas en 3D. Barra de escala 20 µm.

6.4. Efecto del EOOv en la producción de exopolisacáridos (EPS) en *V. parahaemolyticus*

La producción de EPS totales de los vibrios patógenos de camarón también se afectó por la exposición a los EOs. El EOOv, fue eficaz para reducir la producción de EPS del *V. parahaemolyticus* positivo a pirA/B causante de AHPND en camarón *P. vannamei*. El porcentaje de EPS se redujo significativas ($P < 0.05$) cuando se adiciono $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EOOv, la reducción fue del $22.8 \pm 4.5\%$ y más del 50% de los EPS se redujo cuando se agregó $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EOOv. La máxima concentración evaluada ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EOOv), redujo el 90% de los polisacáridos (Fig. 8). Los EPS constituye la parte más extensa de la biopelícula y tiene muchas funciones, incluida la de proporcionar estructura y estabilidad mecánica (Neu and Lawrence, 2009). Además, las bacterias incrustadas en los EPS exhiben una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos convencionales (Srinivasan et al., 2017). Como la síntesis de EPS está regulada por el QS (Vu et al., 2009), la inhibición de QS da como resultado una síntesis reducida de EPS o impide su producción. Varios autores han documentado el efecto de los EOs para impedir la producción de EPS de varias cepas

patógenas de interés clínico (Amrutha et al., 2017; Zhang et al., 2018). En nuestro estudio el EOOv afecto la producción de EPS de la cepa causante de AHPND de camarones.

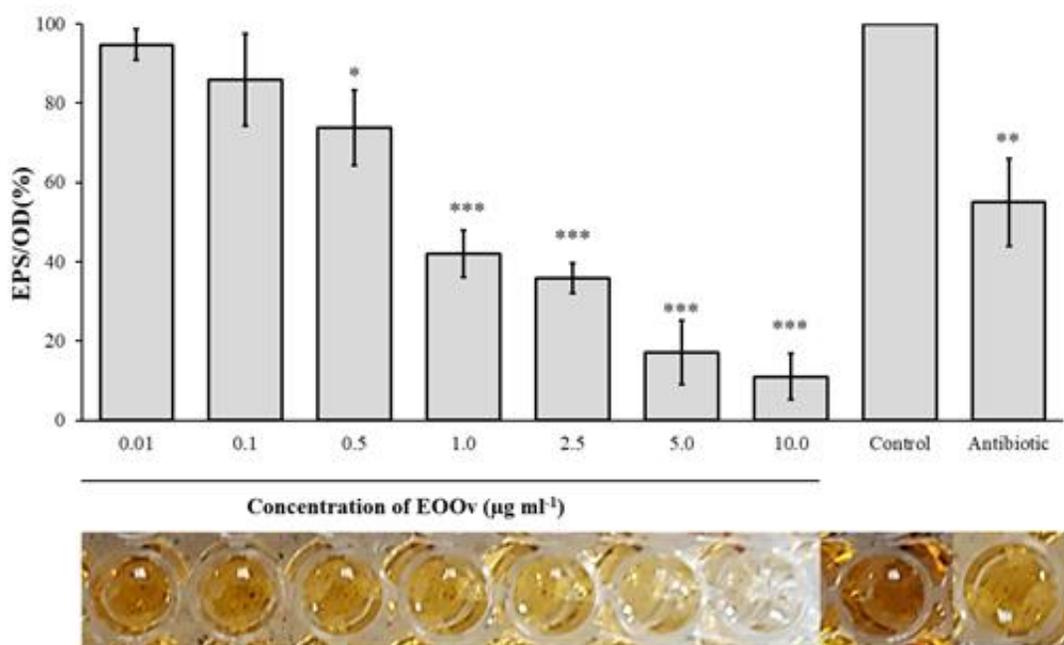


Figura 8. Efecto del EOOv sobre la inhibición en la producción de EPS del *V. parahaemolyticus* (BA94C2). Los datos se representan como media \pm SD de seis réplicas del porcentaje de producción de EPS. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).

6.5. Efectos de los EOs en la motilidad de enjambre

La motilidad de enjambre de las cinco cepas de vibrios patógenos también fue afectado por los EOs, reduciendo significativamente ($P < 0.05$) los diámetros de migración de la motilidad de enjambre de los cinco vibrios expuestos a los EO, y fue dependiente de la concentración de EO empleadas (Fig. 9). Cuando se agregó $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ EOOv, se registraron diámetros de migración de motilidad de enjambre ($> 20 \text{ mm}$) para los cinco vibrios (Fig. 9A), siendo significativamente más pequeño ($P < 0.05$) que los diámetros de migración respecto al grupo control ($< 50 \text{ mm}$). En cuanto, a el EOMa redujo significativamente ($P < 0.05$) la motilidad del enjambre a una dosis de $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, registrando diámetros de migración de la motilidad de enjambre de ($< 30 \text{ mm}$) (Fig. 9B). Sin embargo, el EO más eficiente fue el EOOv, porque la adición de $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ registró diámetros de migración de la motilidad de enjambre de $< 20 \text{ mm}$ en comparación con el EOMa, que produjo diámetros similares cuando se utilizaron

5.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, es decir cinco veces más de producto para lograr el mismo efecto. Además, se observó que la motilidad de enjambre aumentó significativamente ($P < 0.05$) con el antibiótico respecto al grupo de control como podemos apreciar en la (Fig. 10). En el ensayo de swarming motility en presencia de antibiótico, seleccionamos la cepa de *V. vulnificus* resistente a la oxitetraciclina, por su capacidad en realizar swarming, ya que le demora 96 horas para cubrir toda la placa de Petri, en LBb con 0.6% de agar. En el ensayo, encontramos que los EOs también afectan la resistencia a los antibióticos. Debido a que los EOs disminuyeron el enjambre de *V. vulnificus*, los diámetros de los halos de inhibición producidos por el antibiótico donde se agregó EOs se mantuvieron hasta el final del experimento 96 h (Fig. 11). En comparación con el grupo control, los diámetros del halo de inhibición se redujeron a medida que pasaban las horas. Los halos de inhibición, producto del antibiótico oxitetraciclina en aquellas placas tratadas con EOOv fluctuaron 25-39 mm y 35-47 para 0.5 y 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. En cuanto a EOMa, solo a la dosis más alta de 1.0 hubo un efecto atenuador sobre el enjambre del *Vibrio* (Fig. 11), presentando halo de 22-33 mm. Mientras que para el grupo de control el enjambre de *Vibrio* llegó hasta el disco de antibiótico (Fig. 11). Los *Vibrio* spp. son bacterias altamente móviles, debido a la rotación de los flagelos que facilitan el movimiento. Se ha descrito que la motilidad enjambre de varios vibrios patógenos de interés acuícola también está positivamente regulada por el QS, como es el caso de *V. harveyi* (Yang and Defoirdt, 2015), *V. campbellii* (Kiran et al., 2016) y *V. alginolyticus* (Liu et al., 2020). La motilidad de enjambre en los vibrios les permite desarrollar la población bacteriana colonial tanto dentro como fuera del huésped, formar biopelículas y volverse resistentes a los antibióticos (Karunasagar et al., 1996; Saxena et al., 2019). Por lo tanto, interferir con la motilidad de los *Vibrio* spp. es esencial para afectar su virulencia.

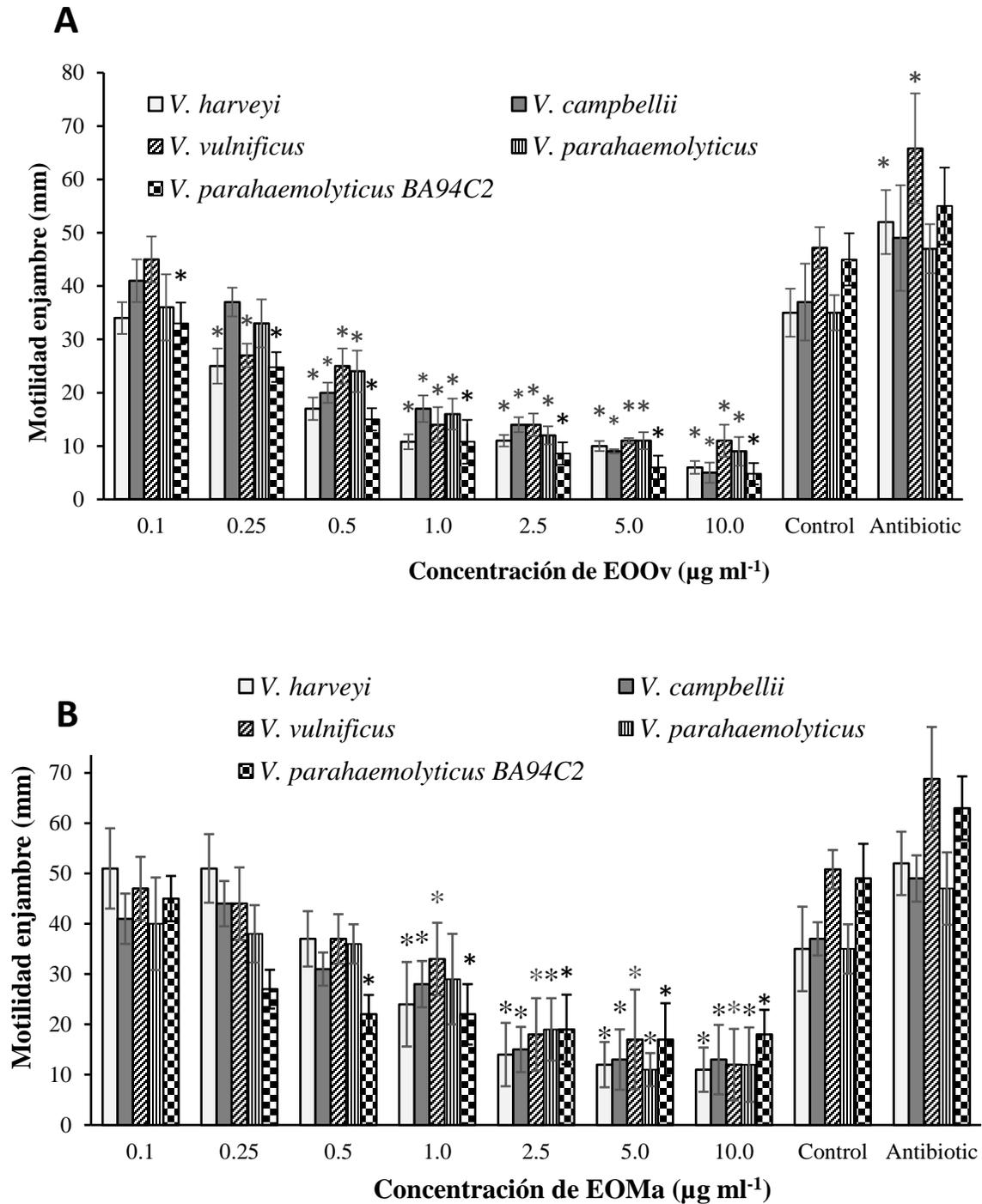


Figura 9. Efecto de varias concentraciones de los EO en *Vibrio* motilidad enjambre. (a) efecto de EOOv y (b) EOMa. Los datos se representan como media \pm SD, seis réplicas de los diámetros de la motilidad migratoria enjambre de los *Vibrio* spp. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).

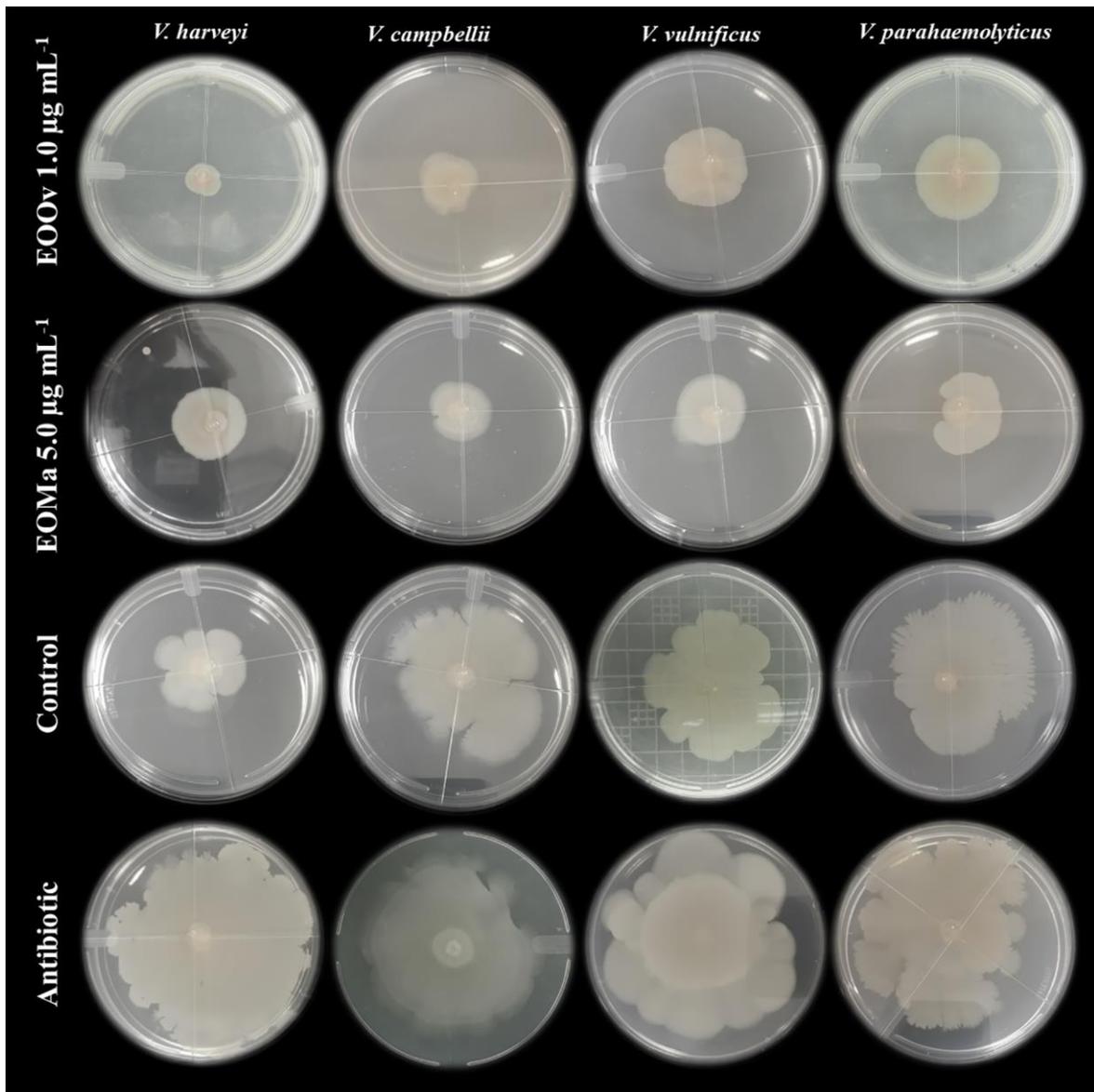


Figura 10. Efecto de los EOs sobre el movimiento en enjambre de los *Vibrio* spp. después de 72 h de incubación.

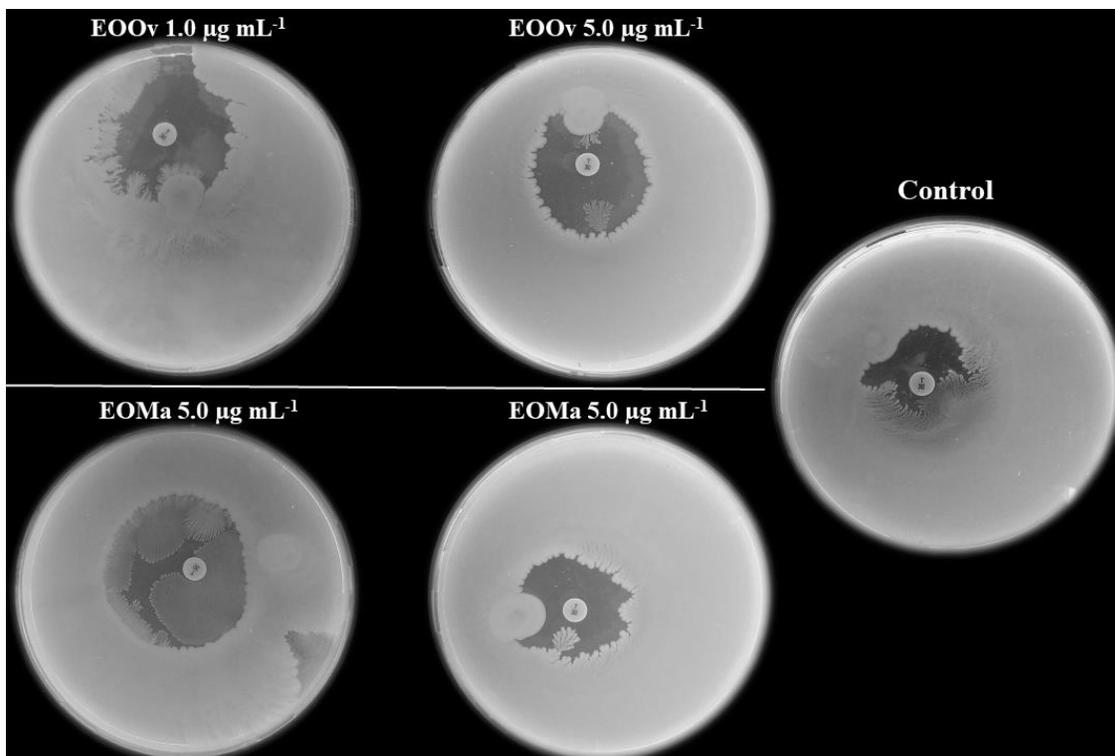


Figura 11. EOs efecto atenuador sobre el enjambre de *V. vulnificus* (resistente a la oxitetraciclina) en presencia de antibiótico oxitetraciclina. Después de 96 h.

6.6. Efecto de EOOv sobre la motilidad de enjambre en *V. parahaemolyticus* mediante análisis transcriptómico.

Se identificaron un total de 4484 genes expresados diferencialmente (DEG) involucrados en una variedad de procesos y vías biológicas. Nuestros resultados revelan que el EOOv tiene varios mecanismos de acción sobre la cepa de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en camarones, debido a que altero el 72.56% del genoma de la cepa de *V. parahaemolyticus*, desacopla todo el genoma del *Vibrio* y haciendo que se repriman y se sobreexpresen una diversidad de genes involucrados en múltiples vías metabólicas. Un total de 2303 genes que representan el 50.86% del genoma total del *V. parahaemolyticus* fueron reprimidos significativamente ($P > 0.05$) respecto al control y un total de 974 genes que representan el 21.73% del genoma total se sobreexpresaron respecto al control, tras la exposición al EOOv a la única dosis subletal evaluada (Fig. 12A).

Entre los principales los genes que fueron reprimidos respecto al control en *V. parahaemolyticus* tras la exposición al EOOv, destacan los genes involucrados en la

producción de proteínas de utilización de sideróforos, proteínas de resistencia a múltiples fármacos, proteínas de ensamblaje de pilus, proteínas que aceptan metilo involucradas en quimiotaxis, proteínas de biosíntesis del anillo P del cuerpo basal flagelar FlgA, proteína de choque de fagos B, transportador familiar AcrB / AcrD / AcrF, proteína de estrés universal UspB, Chaperonina tipo Hsp33, trigger factor, proteína chaperona TorD, quinolinato sintetasa NADH deshidrogenasa, aminoácido transportador ABC proteína de unión a ATP, proteína adhesina, proteasa tipo ClpA/B. Los sistemas de secreción tipo II (T2SS, por sus siglas en inglés), tipo IV (T4SS) y tipo VI (T6SS) del *V. parahaemolyticus* también fueron afectados por el EOOv. Se reprimió significativamente ($P > 0.05$) la expresión de varios genes involucrados en la motilidad y formación de biopelículas secretado por T2SS (Apel and Surette, 2008; Johnson et al., 2014; Zielke et al., 2014), y en la producción de proteínas de ensamblaje de pilus secretado por T4SS (Johnson et al., 2014; Xu et al., 2013). El T6SS en *V. parahaemolyticus* causante de AHPND ha sido asociado a la secreción de la toxina pir A/B (Li et al., 2017), en nuestro estudio el EOOv reprimió significativamente ($P > 0.05$) los genes involucrados en el T6SS, afectando la virulencia del *Vibrio*. Este resultado ayuda a explicar el incremento de la supervivencia de los camarones tratados con EOOv en la prueba de desafío, donde reducimos significativamente ($P > 0.05$) la tasa de mortalidad acumulada de los camarones desafiados con inóculo bacteriano cultivado con EOOv a dosis subletal ($1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) respecto al grupo control.

En contraste el mecanismo de acción del antibiótico oxitetraciclina sobre la cepa de *V. parahaemolyticus* es local, específico y tiene pocas dianas moleculares para afectar al *Vibrio*. El antibiótico alteró muy pocos genes respecto al control como podemos apreciar en la (Fig. 12B). Curiosamente, los genes que se sobreexpresaron por efecto del antibiótico, fueron genes involucrados en la síntesis de proteínas a resistencia a múltiples fármacos, genes que codifican el flujo de salida de antibiótico, genes del T2SS y proteína de la biosíntesis de los flagelos. Esto puede explicar porque los *Vibrio* spp. generan resistencia a los antibióticos en particular a la oxitetraciclina que su mecanismo de acción es local (Ian and Marilyn, 2001), matando a las bacterias y ejerciendo un efecto de presión de selección (Cudkowicz and Schuldiner, 2019), induciendo de esta forma a la resistencia microbiana.

Los sideróforos son considerados fundamentales para la supervivencia de las bacterias en medios limitados de hierro (McRose et al., 2018). El EOOv reprimió significativamente la expresión de genes involucrado en la producción de los sideróforos, disminuye la posibilidad al desarrollo de resistencia bacteriana. Debido, a que reprimió a los genes involucrados en la producción proteínas de resistencia a múltiples fármacos. El EOOv también afecta la transferencia de plásmidos en bacterias ya que en nuestro estudio reprimió a los genes involucrados en la proteína de ensamblaje de pilus. Además, el afecto a los genes involucrados en la proteína de biosíntesis de los flagelos, estructuras fundamentales para la motilidad y quimiotaxis de las bacterias (Apel and Surette, 2008; Kehry and Dahlquist, 1982; Qutyan et al., 2010; Sauer et al., 2016). Esto explicaría el efecto de los EOs sobre el enjambre de los *Vibrio* spp. evidenciado *in vitro* (Fig. 10). Los genes involucrados en la producción varias proteínas de estrés involucradas en la supervivencia de las bacterias condiciones adversas y en la generación de toxinas para competir con otras bacterias. También fueron reprimidos significativamente ($P > 0.05$). varios genes involucrados en la síntesis de varias proteínas de transportes de electrones vitales para el normal funcionamiento de las bacterias.

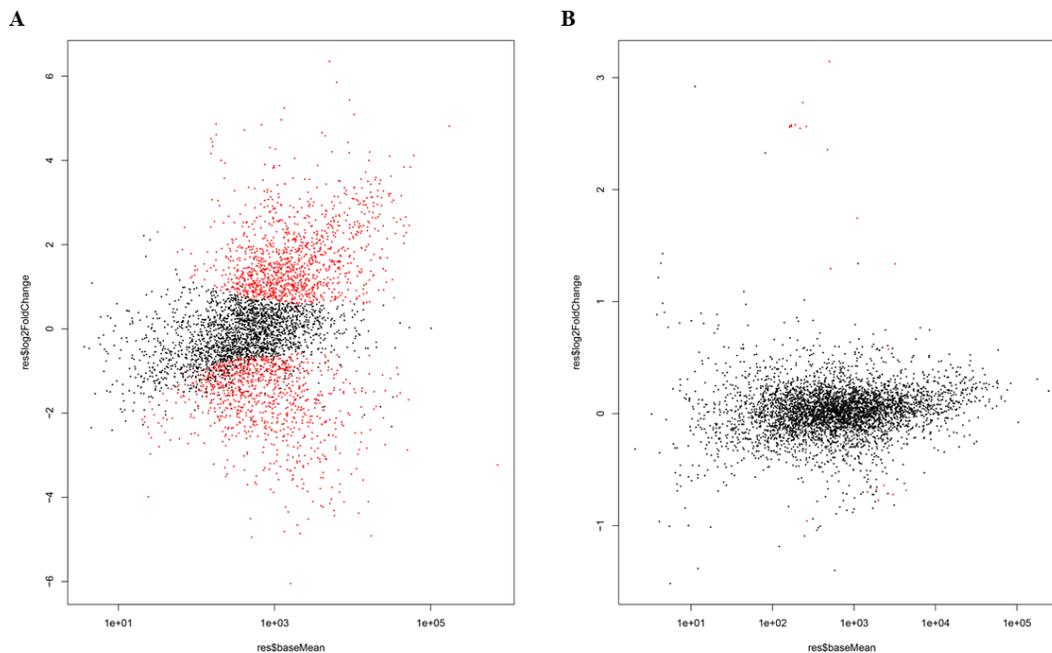


Figura 12. Los puntos rojos en la parte superior representan cada gen que se sobreexpresó y en la parte inferior los genes reprimido y los puntos negros los genes sin cambio respecto al

control en *V. parahaemolyticus* positivo a pir A/B. En 12A) Efecto del EOOv respecto al control y en 12B) Efecto del antibiótico respecto al control.

6.7. Toxicidad de los EOs *in vitro*.

Los dos EOs no afectaron la viabilidad de los hemocitos de *P. vannamei* a las dosis de (0.1, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Sin diferencias significativas en la viabilidad ($P < 0.05$) de los hemocitos expuestos a los EOs respecto al grupo de control (sin EO). Sin embargo, a la concentración máxima evaluada (10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$), ambos EOs afectaron significativamente ($P < 0.05$) la viabilidad de los hemocitos en comparación con el grupo de control (Fig. 13). Reduciendo la viabilidad de los hemocitos en $15.1 \pm 4.0\%$ y $13.3 \pm 3.1\%$ con el EOOv y EOMa, respectivamente (Fig. 13).

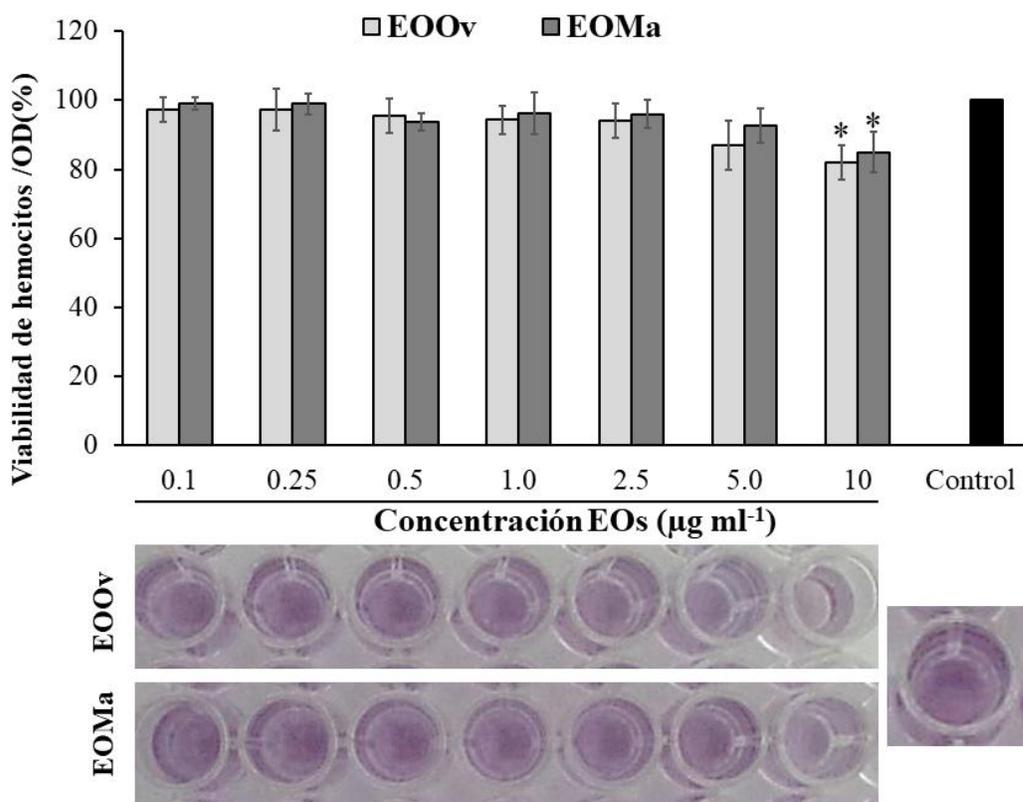


Figura 13. Prueba de toxicidad realizada con aceites esenciales en hemocitos de camarones (2 h, de exposición a los EOs). La viabilidad de los hemocitos en el tratamiento de control se estableció al 100% y los otros tratamientos se normalizaron en consecuencia. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).

6.8. Toxicidad de los EOs *in vivo*.

El ensayo reveló que cuanto más pequeña es la etapa larval, mayor es la susceptibilidad a los EOs. En la etapa de Zoea-1 los dos EO afectaron la supervivencia de las Zoea-1, reduciendo significativamente la supervivencia ($P < 0.05$) de las Zoea-1 en las concentraciones superiores de EO evaluado (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y solo a concentraciones inferiores a 0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ no se afectó la supervivencia de la Zoea-1 (Fig. 14). Con respecto a la etapa de Mysis, ambos EOs solo mostraron un efecto negativo sobre la supervivencia a las dos dosis más altas evaluadas (5.0 y 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Sin efectos significativos ($P > 0.05$) sobre la supervivencia de las Mysis en las dosis inferiores a 5.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 14). En cuanto a las PL, expuesta a los EOs, solo se vio afectada la supervivencia a la concentración mayor 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ con el EOOv, mientras que a dosis inferiores a 10.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pero activas anti-QS, no se observaron efectos negativos sobre la supervivencia de las PL (Fig. 14A). Mientras que el EOMa, no afectó la supervivencia de los PL en ninguna concentración evaluada (Fig. 14B). En la (Tabla 2), se muestran los valores estimados de LD_{50} para cada uno de los estadios larvales de *P. vannamei*, obtenidos mediante el análisis probit para los dos EOs más eficiente, para afectar los indicadores de QS. Los EO son excelentes sustancias antibacterianas (Nazzaro et al., 2013)(Kovács et al., 2016), que incluso se han propuesto como reemplazo de antibióticos (Yap et al., 2014). Sin embargo, se requieren dosis considerable para causar el efecto microbicida, que puede resultar tóxico para los camarones (Sotomayor et al., 2019). En el presente estudio, los EOs, EOOv y EOMa a dosis inferiores a 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ afectaron los factores de virulencia de los vibrios, sin efectos tóxicos para Mysis y PLs de *P. vannamei*, siendo el EOOv más efectivo. Sin embargo, en etapas larvales más tempranas, como *P. vannamei* Zoea, los dos EOs afectaron la supervivencia, por lo que se sugiere comenzar los tratamientos de aplicación de los EOs desde Mysis, a dosis inferiores a 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y en PL hasta un máximo de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Además, los EOs han sido ampliamente utilizados en la preparación de alimentos y como conservantes de alimentos para consumo humano desde la antigüedad, son considerados de baja toxicidad para mamíferos, y clasificados como sustancias seguras (GRAS) por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, USA), y sin riesgo para los consumidores, según la Comisión Europea. Hasta donde sabemos, no está prohibido su uso en la cría de animales para consumo humano.

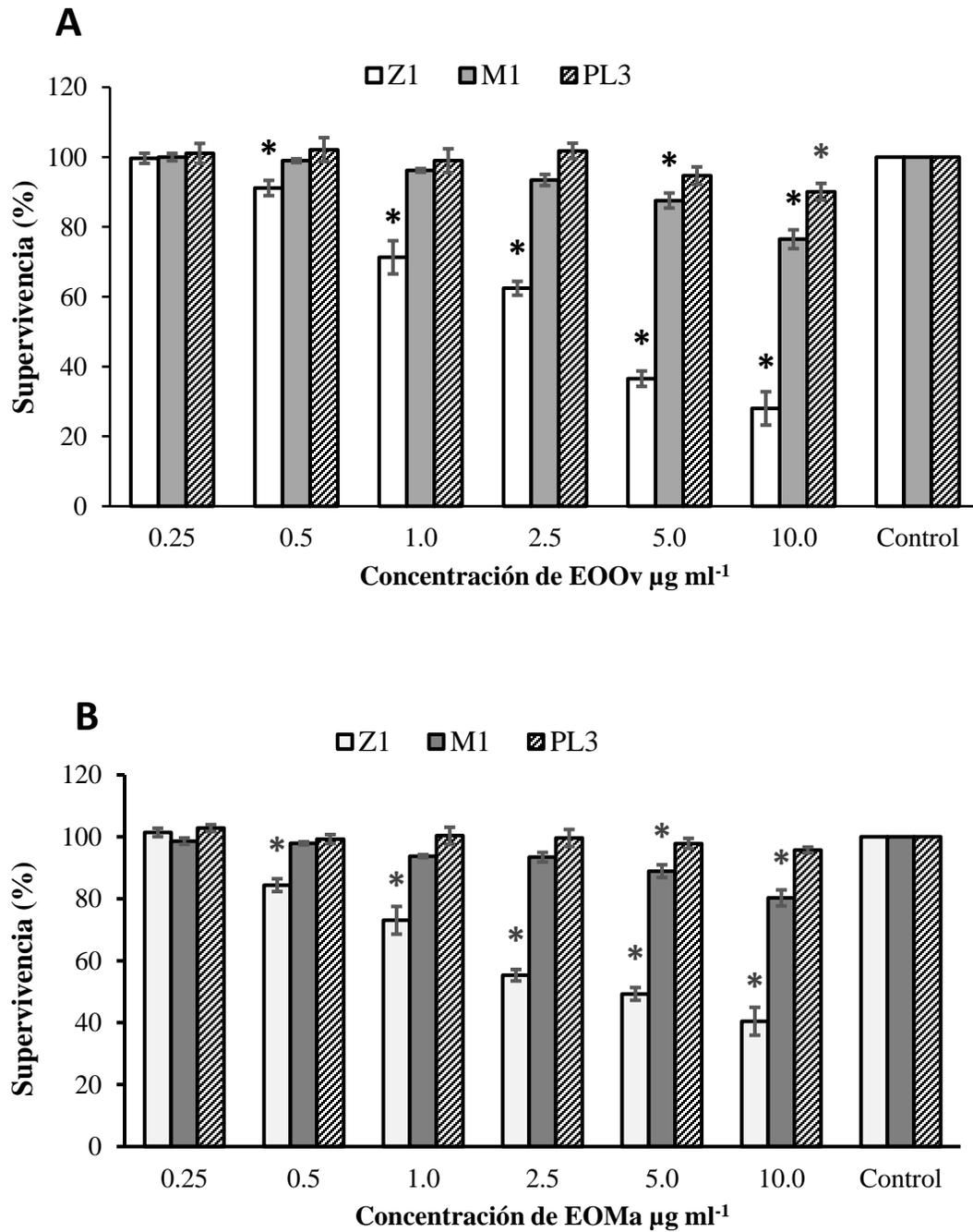


Figura 14. Resultados de supervivencia de larvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de aceites esenciales en tres etapas de desarrollo. Supervivencia acumulada después de 72 horas de exposición. Se muestran los valores promedio con DS (n = 6). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P \leq 0.05$, Dunnett's).

Tabla. 2. Estimación de la dosis letal (LD₅₀) mediante análisis probit para los dos aceites esenciales más activos, los valores puntuales se muestran en (µg ml⁻¹) con sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95% para cada etapa larval.

Essential Oils	LD ₅₀ Larval stages shrimp <i>P. vannamei</i>					
	Zoea		Mysis		PL	
	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%
EOOv	2.5	1.7 - 3.4	18.5	15.3 - 32.1	54.4	32.7 - 103.3
EOMa	3.4	1.7 - 5.4	39.7	22.7 - 99.4	91.7	65.5 - 146.7

6.9. Efecto de los EOs sobre la virulencia de los *Vibrio* spp.

6.9.1. Efecto sobre la virulencia de *V. campbellii* en larvas de *P. vannamei*

Aunque se inoculó la misma concentración de *V. campbellii* (10⁷ UFC ml⁻¹) en cada tratamiento, se registraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las tasas de mortalidad acumulada de las PL de *P. vannamei*, desafiadas con *V. campbellii* crecido en presencia y ausencia de EO. Cuando se usaron 1.0 µg ml⁻¹ de EOOv, la tasa de mortalidad acumulada se redujo un $23.3 \pm 7.5\%$, un mayor efecto se obtuvo con 2.5 µg ml⁻¹, mortalidad se redujo un $35.7 \pm 9.1\%$, con ambas concentraciones de EOOv la virulencia del *V. campbellii* hacia las larvas de *P. vannamei* se redujo significativamente ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control (Fig. 14). Para el EOMa, solo a dosis de 2.5 µg ml⁻¹, la tasa de mortalidad se redujo significativamente ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control, la tasa de mortalidad acumulada para las PL fue $62.7 \pm 4.4\%$, y para el grupo control la tasa de mortalidad acumulada fue de $83.7 \pm 6.4\%$ (Fig. 14).

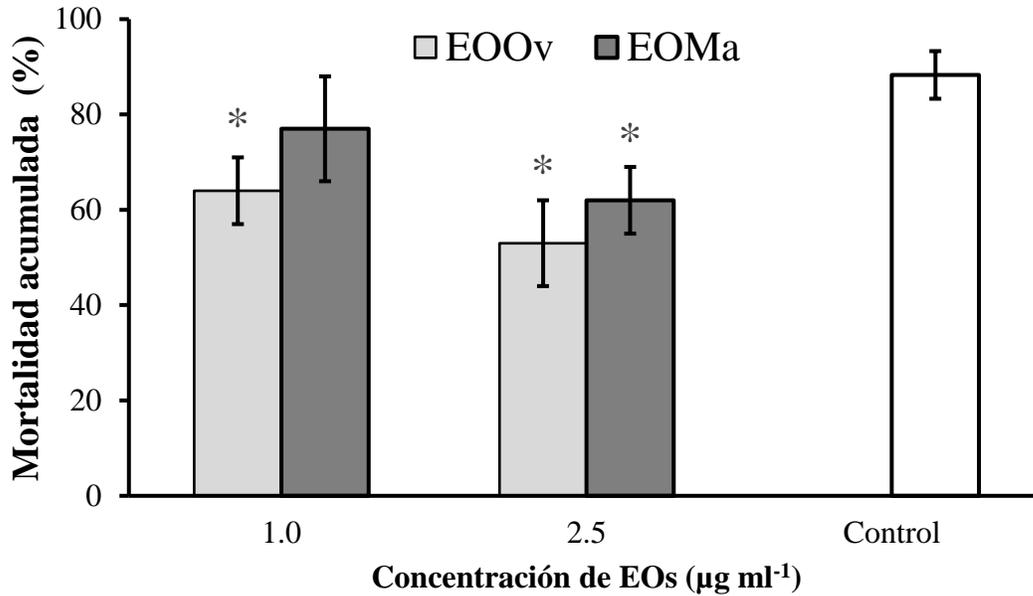


Figura 15. Efecto de dos EO sobre la virulencia de *V. campbellii*, mortalidad acumulada (%) de *P. vannamei* PLs 96 horas después de la exposición al patógeno *V. campbellii*, crecido con EO a dos dosis subletales. La barra de error representa el S.D. de la media (n = 6). El asterisco (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P < 0.05$, Dunnett's)

6.9.2. Efecto sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* en juveniles de *P. vannamei*

Los camarones expuestos a *V. parahaemolyticus* exhibieron una mortalidad de $95.3 \pm 3.5\%$ en el grupo control (BA94C2 cultivado sin EOOv). Estos camarones exhibieron varios síntomas clínicos, características de AHPND (Fig. 15). Mientras que EOOv inhibió efectivamente la virulencia de la cepa BA94C2, reduciendo significativamente ($P < 0.05$) la mortalidad ($55.7 \pm 12.4\%$).

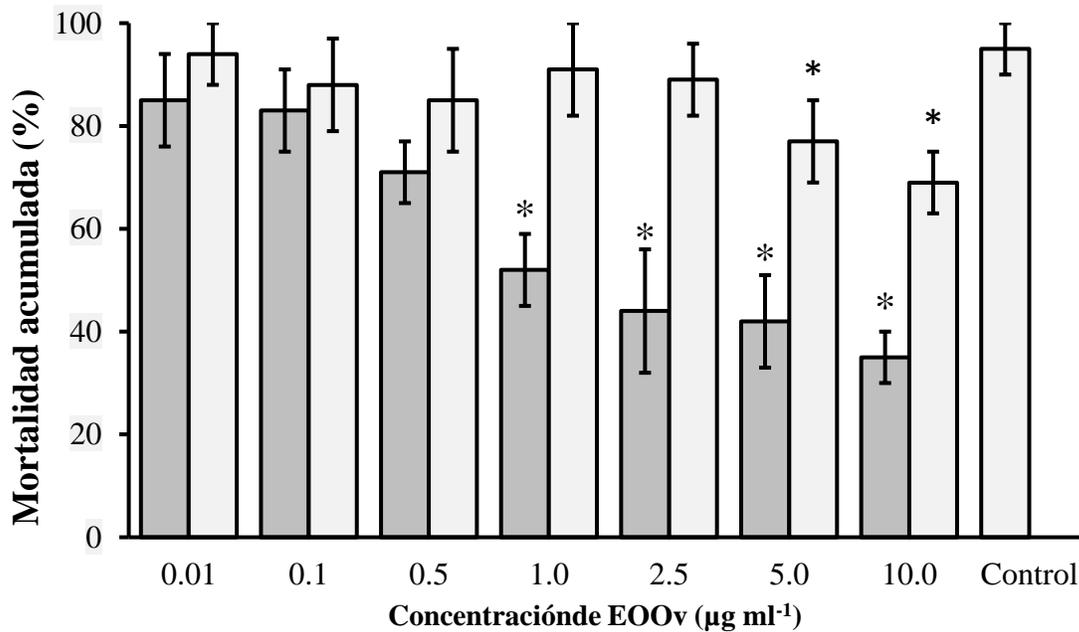


Figura 16. Efecto del mejor aceite esencial EOOv sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus*, mortalidad acumulada (%) de juveniles de *P. vannamei* 96 horas después de la exposición al patógeno *V. parahaemolyticus*, crecido con EO a dos dosis subletales. La barra de error representa el S.D. de la media (n = 6). El asterisco (*) representan diferencias significativas respecto del control ($P < 0.05$, Dunnett's).

En nuestro estudio observamos un claro efecto de los EOs sobre la virulencia de los dos patógenos evaluados *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus* aislado local, altamente virulento para las larvas de camarones, observando una reducción significativa en la mortalidad de las PL expuestas a *V. campbellii*, y juveniles expuesta a *V. parahaemolyticus* en los inóculos bacterianos cultivado en presencia de EOs a dosis subletales. La reducción en la mortalidad indica la efectividad de los dos aceites para inhibir la virulencia de los *Vibrio*.

6.10. Efecto beneficioso de los EOs en estanques de cultivo de *P. vannamei*

En los estanques, los parámetros ambientales se mantuvieron dentro de los rangos aceptables para el cultivo de *P. vannamei* durante todo el experimento. La temperatura fluctuó entre 25.5 - 29.4 °C, los niveles de O₂ disuelto siempre se mantuvieron por encima de 3.5 mg L⁻¹ y la salinidad entre 34 - 45 g L⁻¹. La supervivencia acumulada (%) y el rendimiento (kg / ha) fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) en los estanques tratados con EOOv en ambas dosis evaluadas, en comparación con el grupo control. Con respecto a EOMa solo a la dosis

más alta evaluada (5.0 mg kg^{-1}), el rendimiento y la supervivencia se mejoraron significativamente ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control (Tabla 3). La supervivencia final de los camarones tratados con EOOv a una dosis de 2.5 y 5.0 mg kg^{-1} , aplicada en alimentos fue de $92.2 \pm 5.6\%$ y $93.1 \pm 4.8\%$, respectivamente. Para los camarones tratados con EOMa a la misma dosis, la supervivencia fue de $87.1 \pm 6.8\%$ y $89.2 \pm 4.5\%$ respectivamente, y para el grupo control la supervivencia final fue de $72.0 \pm 8.7\%$. No hubo mejoras significativas ($P > 0.05$) en términos de peso promedio, tasa de crecimiento específico y factor de conversión alimenticia entre el camarón tratado y el grupo de camarones de control. (Tabla 3). Aunque no hubo brote de vibriosis, fue posible obtener mayores rendimientos de supervivencia y producción en la cosecha. Aunque se obtuvo excelentes resultados con ambos EOs evaluados, los mejores resultados se obtuvieron mejores con el EOOv. Resultado que está relacionado con los obtenidos *in vitro*, en que el EOOv fue más efectivo para detener los indicadores de QS.

Tabla 3. El efecto beneficioso de los EOs en el cultivo de camarones *P. vannamei* durante un bioensayo de 102 días (duración del ciclo de producción). Los resultados se presentan como media \pm SD ($n = 4$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

	Tratamientos				
	EOOv		EOMa		Control
	Concentración EOs (mg/kg)		Concentración EOs (mg/kg)		
Parámetros de producción	2.5	5.0	2.5	5.0	
Densidad de siembra (camarón/m²)	12	12	12	12	12
Tasa de crecimiento específico (% day⁻¹)	8.4 \pm 0.2 a	8.5 \pm 0.4 a	8.2 \pm 0.2 a	8.5 \pm 0.3 a	8.3 \pm 0.4 a
Peso medio (g)	12.4 \pm 1.3 a	13.3 \pm 1.9 a	11.1 \pm 1.1 a	12.1 \pm 1.5 a	11.5 \pm 2.0 a
Supervivencia (%)	92.2 \pm 5.6 b	93.1 \pm 4.8 b	87.1 \pm 6.8 ab	89.2 \pm 4.4 b	72.0 \pm 8.7 a
Rendimiento(kg ha⁻¹)	953.7 \pm 88.1 bc	1041.4 \pm 89.5 bc	883.4 \pm 77.2 ab	941.4 \pm 89.5 b	715.9 \pm 96.4 a
FCA	1.06 \pm 0.13 a	1.03 \pm 0.09 a	1.14 \pm 0.28 a	1.03 \pm 0.09 a	1.27 \pm 0.37 a

7. Conclusiones y recomendaciones

En conclusión, el uso de EO como herramientas antivirulencia para controlar la vibriosis en cultivo de camarón es muy prometedor. Los EO son seguras, no conllevan ningún riesgo ambiental o para la salud humana y minimizan el riesgo de resistencia a los antibióticos en *Vibrio* spp. patógenos de camarones. Dado el riesgo de entrar en una era posterior a los antibióticos, los EO ofrecen la posibilidad de controlar los vibrios, adoptando la estrategia contra la virulencia.

8. Bibliografia

- Albuquerque Costa, R., Araújo, R.L., Souza, O.V., Vieira, R.H.S.D.F., 2015. Antibiotic-resistant vibrios in farmed shrimp. *BioMed Research International* 2015. doi:10.1155/2015/505914
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L.A., Gutierrez-Pacheco, M.M., Bernal-Mercado, A.T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G.A., Ponce, A., Moreira, M. del R., Roura, S.I., Ayala-Zavala, J.F., 2014. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology* 5, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2014.00699
- Amrutha, B., Sundar, K., Shetty, P.H., 2017. Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT - Food Science and Technology* 79, 152–159. doi:10.1016/j.lwt.2017.01.031
- Apel, D., Surette, M.G., 2008. Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1778, 1851–1858. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.005
- Bai A, J., Vittal, R.R., 2014. Quorum sensing inhibitory and anti-biofilm activity of essential oils and their *in vivo* efficacy in food systems. *Food Biotechnology* 28, 269–292. doi:10.1080/08905436.2014.932287
- Bandeira, G., Pês, T.S., Saccol, E.M.H., Sutili, F.J., Rossi, W.R., Murari, A.L., Heinzmann, B.M., Pavanato, M.A., de Vargas, A.C., de L. Silva, L., Baldisserotto, B., 2017. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Industrial Crops and Products* 97, 484–491. doi:10.1016/j.indcrop.2016.12.040
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006. doi:10.3390/molecules17043989
- Brackman, G., Defoirdt, T., Miyamoto, C., Bossier, P., Van Calenbergh, S., Nelis, H.,

- Coenye, T., 2008a. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC microbiology* 8, 149. doi:10.1186/1471-2180-8-149
- Brunton, L.A., Desbois, A.P., Garza, M., Wieland, B., Mohan, C.V., Häsler, B., Tam, C.C., Le, P.N.T., Phuong, N.T., Van, P.T., Nguyen-Viet, H., Eltholth, M.M., Pham, D.K., Duc, P.P., Linh, N.T., Rich, K.M., Mateus, A.L.P., Hoque, M.A., Ahad, A., Khan, M.N.A., Adams, A., Guitian, J., 2019. Identifying hotspots for antibiotic resistance emergence and selection, and elucidating pathways to human exposure: Application of a systems-thinking approach to aquaculture systems. *Science of the Total Environment* 687, 1344–1356. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.134
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Burt, S.A., Ojo-Fakunle, V.T.A., Woertman, J., Veldhuizen, E.J.A., 2014. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS ONE* 9, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0093414
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8, 1137–1144. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Camele, I., Elshafie, H.S., Caputo, L., De Feo, V., 2019. Anti-quorum sensing and antimicrobial effect of mediterranean plant Essential Oils against Phytopathogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 10, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2019.02619
- Campana, R., Baffone, W., 2018. Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. *Food Control* 90, 10–17. doi:10.1016/j.foodcont.2018.02.029
- Chaudhari, V., Gosai, H., Raval, S., Kothari, V., 2014. Effect of certain natural products and

- organic solvents on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, S204–S211. doi:10.1016/S1995-7645(14)60233-9
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., Hung, D.T., 2007. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology* 3, 541–548. doi:10.1038/nchembio.2007.24
- Cudkowicz, N.A., Schuldiner, S., 2019. Deletion of the major *Escherichia coli* multidrug transporter AcrB reveals transporter plasticity and redundancy in bacterial cells. *PLoS ONE* 14, 6–9. doi:10.1371/journal.pone.0218828
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 261–289. doi:10.1016/j.femsre.2003.09.004
- De Schryver, P., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., 2014. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathogens* 10, 10–11. doi:10.1371/journal.ppat.1003919
- Defoirdt, T., 2019. Amino acid–derived quorum sensing molecules controlling the virulence of vibrios (and beyond). *PLOS Pathogens* 15, e1007815. doi:10.1371/journal.ppat.1007815
- Defoirdt, T., 2018. Quorum-Sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends in Microbiology* 26, 313–328. doi:10.1016/j.tim.2017.10.005
- Defoirdt, Tom, Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: Lessons learned from in vivo work. *ISME Journal* 2, 19–26. doi:10.1038/ismej.2007.92
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology* 7, 1239–1247. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x

- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* 14, 251–258. doi:10.1016/j.mib.2011.03.004
- Defoirdt, T., Verstraete, W., Bossier, P., 2008. Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1480–1487. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03672.x
- Dickschat, J.S., 2010. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural Product Reports* 27, 343–369. doi:10.1039/b804469b
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McIandsborough, L.A., 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of. *Society* 68, 2950–2958. doi:10.1128/AEM.68.6.2950
- Domínguez-Borbor, C., Ardiles, V., Bermeo, M., Bolívar-Alvarado, C., Tomalá, C., Sonnenholzner, S., Rodríguez, J.A., 2019. The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans*, is effective to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture. *Aquaculture* 508, 127–136. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.04.077
- Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., Rodríguez, J.A., 2018. A simple *in vitro* method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX* 5, 90–95. doi:10.1016/j.mex.2018.01.010
- Dong, X., Song, J., Chen, J., Bi, D., Wang, W., Ren, Y., Wang, H., Wang, G., Tang, K.F.J., Wang, X., Huang, J., 2019. Conjugative transfer of the PVA1-type plasmid carrying the PirAB_{VP} genes results in the formation of new AHPND-causing *Vibrio*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, 1–11. doi:10.3389/fcimb.2019.00195
- Dubois, T., Tremblay, Y.D.N., Hamiot, A., Martin-Verstraete, I., Deschamps, J., Monot, M., Briandet, R., Dupuy, B., 2019. A microbiota-generated bile salt induces biofilm formation in *Clostridium difficile*. *npj Biofilms and Microbiomes* 5, 1–12. doi:10.1038/s41522-019-0087-4
- Dunlap, P. V., 1999. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1, 5–12.

- Enomoto, S., Chari, A., Clayton, A.L., Dale, C., 2017. Quorum Sensing Attenuates Virulence in *Sodalis praecaptivus*. *Cell Host and Microbe* 21, 629-636.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.04.003
- Faleiro M.L., 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 3, 1143–1156.
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 48, 149–158. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x
- Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. (2018). The state of the world fisheries and agriculture. <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>
- Food and Drug Administration (FDA) of the United States. (2016). Electronic Code of Federal Regulations (e- CFR). Part 182-substances Generally Recognized as Safe, Section 182.20-essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Title 21, Volume 3. revised as of September 1, 2016 <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>
- Ferro, T.A.F., Araújo, J.M.M., Pinto, B.L. do S., dos Santos, J.S., Souza, E.B., da Silva, B.L.R., Colares, V.L.P., Novais, T.M.G., Filho, C.M.B., Struve, C., Calixto, J.B., Monteiro-Neto, V., da Silva, L.C.N., Fernandes, E.S., 2016. Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a galleria mellonella model. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.02052
- Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 166–173. doi:10.1016/j.jip.2012.03.004
- Fünfhaus, A., Göbel, J., Ebeling, J., Knispel, H., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., 2018. Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-27193-8
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, Indrani, Nishibuchi, M., Karunasagar, Iddya,

2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 102, 151–159. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.011
- Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1–14. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.013
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., Zhang, C., 2017. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 70, 164–173. doi:10.1016/j.fsi.2017.09.007
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Three parallel Quorum-Sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi* supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>. *Journal Of Bacteriology* 186, 6902–6914. doi:10.1128/JB.186.20.6902
- Henriksson, P.J.G., Rico, A., Troell, M., Klinger, D.H., Buschmann, A.H., Saksida, S., Chadag, M. V., Zhang, W., 2018. Unpacking factors influencing antimicrobial use in global aquaculture and their implication for management: a review from a systems perspective. *Sustainability Science* 13, 1105–1120. doi:10.1007/s11625-017-0511-8
- Ian, C., Marilyn, R., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232–260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232
- Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R., 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society* 37, 523–532. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x
- Johnson, T.L., Fong, J.C., Rule, C., Rogers, A., Yildiz, F.H., Sandkvist, M., 2014. The Type II secretion system delivers matrix proteins for biofilm formation by *Vibrio cholerae*.

Journal of Bacteriology 196, 4245–4252. doi:10.1128/JB.01944-14

- Joshi, J.R., Khazanov, N., Senderowitz, H., Burdman, S., Lipsky, A., Yedidia, I., 2016. Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. *Scientific Reports* 6, 1–15. doi:10.1038/srep38126
- Karunasagar, I., Otta, S.K., Karunasagar, Indrani, 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140, 241–245. doi:10.1016/0044-8486(95)01180-3
- Kehry, M.R., Dahlquist, F.W., 1982. The methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*. Identification of the multiple methylation sites on methyl-accepting chemotaxis protein I. *Journal of Biological Chemistry* 257, 10378–10386.
- Kerekes, E.B., Vidács, A., Takó, M., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., Horváth, G., Balázs, V.L., Krisch, J., 2019. Anti-biofilm effect of selected essential oils and main components on mono- and polymicrobial bacterial cultures. *Microorganisms* 7. doi:10.3390/microorganisms7090345
- King, R., Flick, G., Smith, S., Pierson, M., Boardman, G., Coale, C., 2008. Response of bacterial biofilms in recirculating aquaculture systems to various sanitizers. *Journal of Applied Aquaculture* 20, 79–92. doi:10.1080/10454430802191766
- Kiran, G.S., Priyadarshini, S., Dobson, A.D.W., Gnanamani, E., Selvin, J., 2016. Degradation intermediates of polyhydroxy butyrate inhibits phenotypic expression of virulence factors and biofilm formation in luminescent *Vibrio* spp. PUGSK8. *npj Biofilms and Microbiomes* 2. doi:10.1038/npjbiofilms.2016.2
- Kitiyodom, S., Khemtong, S., Wongtavatchai, J., Chuanchuen, R., 2010. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). *FEMS Microbiology Ecology* 72, 219–227. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00846.x
- Kovács, J.K., Felso, P., Makszin, L., Pápai, Z., Horváth, G., Ábrahám, H., Palkovics, T., Böszörményi, A., Emody, L., Schneider, G., 2016. Antimicrobial and virulence-

- modulating effects of clove essential oil on the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 6158–6166. doi:10.1128/AEM.01221-16
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K., Sarkar, U.K., 2016. Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 24, 342–368. doi:10.1080/23308249.2016.1193841
- Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I.T., Chuang, J.C., Mavichak, R., Chang, S.H., Yeh, M. De, Chiang, Y.A., Takeyama, H., Hamaguchi, H. o., Lo, C.F., Aoki, T., Wang, H.C., 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology* 47, 1006–1014. doi:10.1016/j.fsi.2015.11.008
- Lang, J., Faure, D., 2014. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science* 5, 1–13. doi:10.3389/fpls.2014.00014
- LaSarre, B., Federle, M.J., 2013. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77, 73–111. doi:10.1128/mnbr.00046-12
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M.H., Milot, S., Stachel, S., Tzika, A.A., Tompkins, R.G., Rahme, L.G., 2007. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathogens* 3, 1229–1239. doi:10.1371/journal.ppat.0030126
- Li, P., Kinch, L., Ray, A., Dalia, A., Cong, Q., Nunan, L., Camilli, A., Grishin, N., Salomon, D., 2017. crossm Acute Hepatopancreatic Necrosis strains maintain an antibacterial Type VI secretion system with Versatile Effector. *Appl Environ Microbiol* 83, 1–17.
- Lightner, D. V., 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106, 110–130. doi:10.1016/j.jip.2010.09.012

- Liu, H., Wang, Y., Cao, J., Jiang, H., Yao, J., Gong, G., Chen, X., Xu, W., He, X., 2020. Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 515, 734578. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734578
- Liu, L., Jiang, L., Yu, Y., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y., 2017. Rapid diagnosis of *Vibrio owensii* responsible for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease with isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Molecular and Cellular Probes* 33, 4–7. doi:10.1016/j.mcp.2017.02.001
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S.A., De Nys, R., Kjelleberg, S., 2000. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2079–2084. doi:10.1128/AEM.66.5.2079-2084.2000
- Maunder, E., Welch, M., 2017. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters* 364, 1–10. doi:10.1093/femsle/fnx120
- McRose, D.L., Baars, O., Seyedsayamdost, M.R., Morel, F.M.M., 2018. Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 7581–7586. doi:10.1073/pnas.1805791115
- Mith, H., Clinquart, A., Zhiri, A., Daube, G., Delcenserie, V., 2015. The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157: H7. *FEMS Microbiology Letters* 362, 1–7. doi:10.1093/femsle/fnu021
- Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Seedevi, P., Rajan, D.K., 2019. Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp aquaculture: A review. *Aquaculture* 500, 250–263. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.10.023
- Mroz, Z., 2005. Organic Acids as Potential Alternatives to Antibiotic Growth Promoters for Pigs 16, 169–182.

- Myszka, K., Schmidt, M.T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkowicz, M., Czaczyk, K., 2016. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation* 114, 252–259. doi:10.1016/j.ibiod.2016.07.006
- Nackerdien, Z.E., Keynan, A., Bassler, B.L., Lederberg, J., Thaler, D.S., 2008. Quorum sensing influences *Vibrio harveyi* growth rates in a manner not fully accounted for by the marker effect of bioluminescence. *PLoS ONE* 3. doi:10.1371/journal.pone.0001671
- Naik, S.P., Scholin, J., Ching, S., Chi, F., Herpfer, M., 2018. Quorum Sensing Disruption in *Vibrio harveyi* Bacteria by Clay Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 40–44. doi:10.1021/acs.jafc.7b03918
- Natrah, F.M.I., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Disruption of bacterial cell-to-cell Communication by marine organisms and its Relevance to Aquaculture. *Marine Biotechnology* 13, 109–126. doi:10.1007/s10126-010-9346-3
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6, 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451
- Nealson, K.H., 1977. Autoinduction of bacterial luciferase - Occurrence, mechanism and significance. *Archives of Microbiology* 112, 73–79. doi:10.1007/BF00446657
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2009. Biological relevance of microbial glycosylated components - Extracellular polymeric substances in microbial biofilms, First edition. ed, *Microbial Glycobiology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-1237-4546-0.00037-7
- Niu, C., Afre, S., Gilbert, E.S., 2006. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology* 43, 489–494. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02001.x
- Noor, N.M., Defoirdt, T., Alipiah, N., Karim, M., Daud, H., Natrah, I., 2019. Quorum sensing is required for full virulence of *Vibrio campbellii* towards tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) larvae. *Journal of Fish Diseases* 42, 489–495. doi:10.1111/jfd.12946

- Noriega-Orozco, L., Acedo-Félix, E., Higuera-Ciapara, I., Jiménez-Flores, R., Cano, R., 2008. Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 49, 60–67.
- Okocha, R.C., Olatoye, I.O., Adedeji, O.B., 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Reviews* 39, 1–22. doi:10.1186/s40985-018-0099-2
- Omonijo, F.A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., Yang, C., 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition* 4, 126–136. doi:10.1016/j.aninu.2017.09.001
- Ozdemir, N., Ozgen, Y., Kiralan, M., Bayrak, A., Arslan, N., Ramadan, M.F., 2017. Effect of different drying methods on the essential oil yield, composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare L.* and *Origanum onites L.* *Journal of Food Measurement and Characterization* 0, 0. doi:10.1007/s11694-017-9696-x
- Pezzani, R., Vitalini, S., Iriti, M., 2017. Bioactivities of *Origanum vulgare L.*: an update. *Phytochemistry Reviews* 16, 1253–1268. doi:10.1007/s11101-017-9535-z
- Phiwsaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H.T., Sangsuriya, P., Nguyen, G.T.T., Pham, H.Q., Amparyup, P., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Sithigorngul, P., Senapin, S., 2017. A natural *Vibrio parahaemolyticus* Δ pirA_{vp} pirB_{vp}+ mutant kills shrimp but produces neither Pir_{vp} toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and Environmental Microbiology* 83. doi:10.1128/AEM.00680-17
- Phuoc, L.H., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2009. Virulence of luminescent and non-luminescent isogenic vibrios towards gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae and specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1388–1396. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04107.x
- Poli, J.P., Guinoiseau, E., De Rocca Serra, D., Sutour, S., Paoli, M., Tomi, F., Quilichini, Y., Berti, L., Lorenzi, V., 2018. Anti-quorum sensing activity of 12 essential oils on

Chromobacterium violaceum and specific action of cis-cis-p-menthenolide from corsican mentha suaveolens ssp. Insularis. *Molecules* 23. doi:10.3390/molecules23092125

Powell, L.C., Pritchard, M.F., Ferguson, E.L., Powell, K.A., Patel, S.U., Rye, P.D., Sakellakou, S.M., Buurma, N.J., Brilliant, C.D., Copping, J.M., Menzies, G.E., Lewis, P.D., Hill, K.E., Thomas, D.W., 2018. Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides. *npj Biofilms and Microbiomes* 4. doi:10.1038/s41522-018-0056-3

Qutyan, M., Henkel, M., Horzempa, J., Quinn, M., Castric, P., 2010. Glycosylation of pilin and nonpilin protein constructs by *Pseudomonas aeruginosa* 1244. *Journal of Bacteriology* 192, 5972–5981. doi:10.1128/JB.00007-10

Reading, N.C., Sperandio, V., 2006. Quorum sensing: The many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 254, 1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x

Restrepo, L., Bayot, B., Betancourt, I., Pinzón, A., 2016. Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. *Genomics Data* 9, 143–144. doi:10.1016/j.gdata.2016.08.008

Restrepo, L., Bonny, B., Arciniegas, S., Leandro, B., Irma, B., Panc, F., Re, A., 2018. Pir_{VP} genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade 1–14. doi:10.1038/s41598-018-30903-x

Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White spot syndrome virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, 405–415. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.10.042

Rohr, J.R., Barrett, C.B., Civitello, D.J., Craft, M.E., Delius, B., DeLeo, G.A., Hudson, P.J., Jouanard, N., Nguyen, K.H., Ostfeld, R.S., Remais, J. V., Riveau, G., Sokolow, S.H.,

- Tilman, D., 2019. Emerging human infectious diseases and the links to global food production. *Nature Sustainability* 2, 445–456. doi:10.1038/s41893-019-0293-3
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, 1–26. doi:10.1101/cshperspect.a012427
- Santhakumari, S., Jayakumar, R., Logalakshmi, R., Prabhu, N.M., Abdul Nazar, A.K., Karutha Pandian, S., Veera Ravi, A., 2018. *In vitro* and *in vivo* effect of 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol as an antibiofilm agent against quorum sensing mediated biofilm formation of *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology* 281, 60–71. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.024
- Santos, L., Ramos, F., 2018. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents* 52, 135–143. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010
- Sauer, M.M., Jakob, R.P., Eras, J., Baday, S., Eriş, D., Navarra, G., Bernèche, S., Ernst, B., Maier, T., Glockshuber, R., 2016. Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. *Nature Communications* 7. doi:10.1038/ncomms10738
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., Bisht, R., 2019. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian Journal of Microbiology* 59, 3–12. doi:10.1007/s12088-018-0757-6
- Sedlmayer, F., Hell, D., Müller, M., Ausländer, D., Fussenegger, M., 2018. Designer cells programming quorum-sensing interference with microbes. *Nature Communications* 9. doi:10.1038/s41467-018-04223-7
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Griffiths, D., Trong, T.Q., Vu, N.T., Jiravanichpaisal, P., Briggs, M., 2018. Asian Shrimp Production and the Economic Costs of Disease. *Asian Fisheries Science* 31, 29–58.
- Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R., 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

- formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* 62, 1264–1277. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x
- Shrout, J.D., Nerenberg, R., 2012. Monitoring bacterial twitter: Does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? *Environmental Science and Technology* 46, 1995–2005. doi:10.1021/es203933h
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., Van Griensven, L.J.L.D., 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* 15, 7532–7546. doi:10.3390/molecules15117532
- Soto-Rodriguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., Morales-Covarrubias, M.S., 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1689–1699. doi:10.1128/AEM.03610-14
- Sotomayor, M.A., Reyes, J.K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., Bayot, B., 2019. Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* hatcheries. *PLoS ONE* 14, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0210478
- Srinivasan, R., Santhakumari, S., Ravi, A.V., 2017. *In vitro* antibiofilm efficacy of Piper betle against quorum sensing mediated biofilm formation of luminescent *Vibrio harveyi*. *Microbial Pathogenesis* 110, 232–239. doi:10.1016/j.micpath.2017.07.001
- Stentiford, G.D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Williams, B.A.P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., Bass, D., 2017. New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathogens* 13, 1–6. doi:10.1371/journal.ppat.1006160
- Sun, Y., Guo, D., Hua, Z., Sun, H., Zheng, Z., Xia, X., Shi, C., 2019. Attenuation of multiple *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors by citral. *Frontiers in Microbiology* 10.

doi:10.3389/fmicb.2019.00894

- Suong, N.T., Van Hao, N., Van Sang, N., Hung, N.D., Tinh, N.T.N., Phuoc, L.H., Van Cuong, D., Luan, N.T., Phuong, D.V., Thom, T.T., Thao, P.H., Bossier, P., Sorgeloos, P., Defoirdt, T., 2017. The impact of catecholamine sensing on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture* 470, 190–195. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.12.030
- Szabó, M.Á., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., Molnár, J., 2010. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research* 24, 782–786. doi:10.1002/ptr.3010
- T. A. Bell, D.V.L., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA 114.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Itsathitphaisarn, O., 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 452, 69–87. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.028
- Totsika, M., 2016. Benefits and Challenges of Antivirulence Antimicrobials at the Dawn of the Post-Antibiotic Era. *Drug Delivery Letters* 6, 30–37. doi:10.2174/22103031066661605061200
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., Lightner, D. V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 105, 45–55. doi:10.3354/dao02621
- Vanmaele, S., Defoirdt, T., Cleenwerck, I., De Vos, P., Bossier, P., 2015. Characterization of the virulence of Harveyi clade vibrios isolated from a shrimp hatchery *in vitro* and *in vivo*, in a brine shrimp (*Artemia franciscana*) model system. *Aquaculture* 435, 28–32. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.09.015
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Patil, B.S., 2011. Citrus

- limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator luxO. *Microbiology* 157, 99–110. doi:10.1099/mic.0.041228-0
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14, 2535–2554. doi:10.3390/molecules14072535
- Wadsworth, J., Cockell, C.S., 2017. Perchlorates on Mars enhance the bacteriocidal effects of UV light. *Scientific Reports* 7, 1–8. doi:10.1038/s41598-017-04910-3
- Walker, P.J., Mohan, C. V., 2009. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture* 1, 125–154. doi:10.1111/j.1753-5131.2009.01007.x
- Wang, Z., Lin, B., Mostaghim, A., Rubin, R.A., Glaser, E.R., Mittraparp-Arthorn, P., Thompson, J.R., Vuddhakul, V., Vora, G.J., 2013. *Vibrio campbellii* hmgA-mediated pyomelanization impairs quorum sensing, virulence, and cellular fitness. *Frontiers in Microbiology* 4, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2013.00379
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 319–346. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Watts, J.E.M., Schreier, H.J., Lanska, L., Hale, M.S., 2017. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs* 15, 1–16. doi:10.3390/md15060158
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y., 2017. Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports* 7, 1–11. doi:10.1038/srep42177
- Xu, Q., Christen, B., Chiu, H., Jaroszewski, L., Heath, E., Knuth, M.W., Miller, M.D., Elsliger, M., Ashley, M., Godzik, A., Lesley, S.A., Figurski, D.H., Shapiro, L., Wilson, I.A., 2013. rectale : Implications for polar localization 83, 712–727. doi:10.1111/j.1365-

2958.2011.07954.x.Structure

- Yang, Q., Defoirdt, T., 2015. Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environmental Microbiology* 17, 960–968. doi:10.1111/1462-2920.12420
- Yang, Q., Han, Y., Zhang, X.H., 2011. Detection of quorum sensing signal molecules in the family Vibrionaceae. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1438–1448. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04998.x
- Yang, Q., Pande, G.S.J., Wang, Z., Lin, B., Rubin, R.A., Vora, G.J., Defoirdt, T., 2017. Indole signalling and (micro)algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental Microbiology* 19, 1987–2004. doi:10.1111/1462-2920.13714
- Yang, Q., Scheie, A.A., Benneche, T., Defoirdt, T., 2015. Specific quorum sensing-disrupting activity (A QSI) of thiophenones and their therapeutic potential. *Scientific reports* 5, 18033. doi:10.1038/srep18033
- Yap, P.S.X., Krishnan, T., Chan, K.G., Lim, S.H.E., 2015. Antibacterial mode of action of *Cinnamomum verum* bark essential oil, alone and in combination with piperacillin, against a multi-drug-resistant *Escherichia coli* strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1299–1306. doi:10.4014/jmb.1407.07054
- Yap, P.S.X., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H.E., 2014. Essential Oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal* 8, 6–14. doi:10.2174/1874285801408010006
- Yen, N.T.P., Nhung, N.T., Van, N.T.B., Cuong, N. Van, Tien Chau, L.T., Trinh, H.N., Tuat, C. Van, Tu, N.D., Phu Huong Lan, N., Campbell, J., Thwaites, G., Baker, S., Carrique-Mas, J., 2020. Antimicrobial residues, non-typhoidal Salmonella, *Vibrio* spp. and associated microbiological hazards in retail shrimps purchased in Ho Chi Minh city (Vietnam). *Food Control* 107, 106756. doi:10.1016/j.foodcont.2019.106756
- Yildiz, F.H., Visick, K.L., 2009. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends*

in Microbiology 17, 109–118. doi:10.1016/j.tim.2008.12.004

Zeng, S., Hou, D., Liu, J., Ji, P., Weng, S., He, J., Huang, Z., 2019. Antibiotic supplement in feed can perturb the intestinal microbial composition and function in Pacific white shrimp. Applied Microbiology and Biotechnology 103, 3111–3122. doi:10.1007/s00253-019-09671-9

Zhang, Y., Kong, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao, W., 2018. Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. LWT - Food Science and Technology 92, 133–139. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.027

Zhao, J., Chen, M., Quan, C.S., Fan, S.D., 2015. Mechanisms of quorum sensing and strategies for quorum sensing disruption in aquaculture pathogens. Journal of Fish Diseases 38, 771–786. doi:10.1111/jfd.12299

Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Qi, X., Su, H., Xie, L., 2012. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “bacterial white tail disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp. PLoS ONE 7, 19–22. doi:10.1371/journal.pone.0029961

Zielke, R.A., Simmons, R.S., Park, B.R., Nonogaki, M., Emerson, S., Sikora, A.E., 2014. The type II secretion pathway in *Vibrio cholerae* is characterized by growth phase-dependent expression of exoprotein genes and is positively regulated by σE . Infection and Immunity 82, 2788–2801. doi:10.1128/IAI.01292-13

9. Anexos

Los anexos son secciones adicionales en los que se recoge la información o material relativo al tema tratado y que por su extensión y carácter no puede ser incluido en el cuerpo mismo del trabajo. Los anexos irán separados del resto del trabajo por una página libre con solo el título escrito en la mitad de la misma. Cada anexo irá numerado, utilizando letras mayúsculas y llevará el orden correspondiente al desarrollo del trabajo.