

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

Aplicación de aceites esenciales para la desinfección en el cultivo
de *Artemia* de las industrias acuícolas de peces y crustáceos

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Erick Anthony Aveiga Perea

Miguel Vladimir Pineda Parra

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

Este último proyecto de la universidad se lo dedico especialmente a mis pilares fundamentales, mi madre y mis dos abuelas; Brenda Perea, Rosa Olmedo y Ernestina Loor, gracias por el apoyo constante e incondicional y alentarme siempre a mejorar cada día en todas las áreas de mi vida, así mismo a mi Padre Wilson Aveiga.

Erick Anthony Aveiga Perea

El presente proyecto lo dedico a mis padres, ellos que han estado apoyándome incondicionalmente durante toda esta travesía académica, a mis hermanos que confiaron en mi, y a toda mi familia que estuvo al pendiente de lograr esta meta.

Miguel Vladimir Pineda Parra

AGRADECIMIENTOS

A Dios que toda la gloria y la honra sea para él. A cada uno de mis compañeros de la universidad quienes compartieron grandes momentos conmigo, en especial a Robin Moran y Viviam Rugel que desde el pre mantuvimos una amistad transparente y de crecimiento.

Al Msc Cristóbal Domínguez, la Dra. Jenny Rodríguez y el Dr. Wilfrido por la guía en este trabajo investigativo,

A mis hermanos de otra madre, Juan Guapi, Kimberly Quiñonez, Robert Balon y Melania Vargas, por siempre estar cuando más los necesité.

Erick Anthony Aveiga Perea

Mis más sincero agradecimiento a Dios por haberme permitido gozar de salud durante mis estudios, a mi familia, a mis profesores, y un eterno agradecimiento a mis compañeros de aula, pues cada uno de ellos es parte de este logro.

Miguel Vladimir Pineda Parra

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *(nombre de los participantes)* y doy(damos) mi(nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Erick Aveiga Perea

Miguel Pineda Parra

EVALUADORES

Wilfrido Arguello *Ph.D*

PROFESOR DE LA MATERIA

Wilfrido Arguello *Ph.D*

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La *Artemia* es uno de los principales microcrustáceo usado como alimento vivo en las industrias acuícolas de peces y crustáceos. A pesar de su facilidad de cultivo y aceptable perfil nutricional, se ha evidenciado que después de la eclosión de cistos de *Artemia* existe altas concentraciones de bacterias patógenas del género *Vibrio* convirtiéndose un vector de contaminación bacteriana y una amenaza eminente para la especie de cultivo en sus estadios iniciales. El producto químico comúnmente usado para la desinfección de la *Artemia* es la formalina, siendo un compuesto tóxico y potencialmente genotóxico para el bienestar humano. Así mismo, se ha usado antibióticos para dicha desinfección aumentando la marcada resistencia bacteriana, lo que promueve enfermedades emergentes y re-emergentes en la producción acuícola, comprometiendo la salud humana con enfermedades zoonóticas. Por estas razones, surge la necesidad de explorar compuestos de fuente natural que puedan ser usados eficientemente en la desinfección de *Artemias* y sin efectos adversos para el ambiente y los consumidores. En el presente estudio se analizó los aceites esenciales (Eos) con mayor actividad antimicrobiana con la finalidad de realizar un protocolo de desinfección de cistos de *Artemia* con el uso de Eos. A través, de un análisis bibliográfico de resultados antimicrobianos de los Eos usados en producción animal y diferentes criterios de selección basados en la eficiencia de su actividad antimicrobiana, se determinó que los principales compuestos antimicrobianos para la disminución de vibrios son el timol, carvacrol y cinamaldehído, cuyos son encontrados en los Eo de orégano, tomillo y canela.

.Palabras claves: *Artemias, cistos, vibrios, aceites esenciales, productos naturales.*

ABSTRACT

The Artemia is a major microcrustacean generally used as live food in aquaculture industries of fish and crustaceans. Despite its ease of cultivation and acceptable nutritional profile, it has been shown that after the hatching of Artemia cysts there are high concentrations of pathogenic bacteria of the genus Vibrio, becoming a vector of bacterial contamination and an imminent threat to the cultured species in their areas. initial stages. The chemical commonly used for the disinfection of Artemia is formalin, being a toxic and potentially genotoxic compound for human well-being. Likewise, antibiotics have been used for said disinfection, increasing the marked bacterial resistance, which promotes emerging and re-emerging diseases in aquaculture production, compromising human health with zoonotic diseases. For these reasons, the need to explore natural compounds source can be efficiently used in the disinfection of Artemia without effects adverse for the environment and consumer. In the present study, essential oils (Eos) with the highest antimicrobial activity were analyzed to carry out a disinfection protocol for Artemia cysts. with the use of Eos. Through a bibliographic analysis of antimicrobial results of the Eos used in animal production and different selection criteria based on the efficiency of their antimicrobial activity. It was determined that the main antimicrobial compounds for the reduction of vibrios are thymol, carvacrol, and cinnamaldehyde, which are found in the Eo of oregano, thyme, and cinnamon.

Keywords: Artemias, cysts, vibrios, essential oils, natural products.

ÍNDICE

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción del problema.....	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Marco teórico.....	6
1.4.1. Importancia de la artemia en acuicultura.....	6
1.4.2. Desinfección de artemia	7
1.4.3. Vibrios en artemias	8
1.4.4. Mecanismo de acción de bacterias patógenas en la acuicultura.	9
1.4.5. Formación de biopelículas por <i>Vibrio</i>	11
1.4.6. Aceites esenciales y sus principales propiedades biológicas.....	12
1.4.7. Emulsificación de Aceites esenciales	14
1.4.8. Métodos de extracción de aceites esenciales	16
CAPÍTULO 2.....	19
2. METODOLOGÍA	19
2.1. Modulación del comportamiento de Vibrios en el cultivo de <i>Artemia</i>	20
2.2. Análisis de Aceites Esenciales para desinfección de <i>Artemia</i>	21
2.2.1. Ensayo <i>in vitro</i> de evaluación de la toxicidad de los EOs	22
2.2.2. Hemograma	22
2.2.3. Cultivo celular primario de hemocitos de camarones	22
2.2.4. Exposición de hemocitos al producto evaluado.....	23
2.3. Descripción de los métodos de evaluación para la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.	23
2.4. Comparación de los aceites esenciales con la mayor actividad antimicrobiana	35
CAPÍTULO 3.....	37
3. RESULTADO Y ANÁLISIS	37

3.1. Comportamiento bacteriano de bacterias del género <i>Vibrio</i> en Artemias.	37
3.2. Análisis y selección de EOs	37
3.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de los EOs seleccionados.....	38
3.4. Protocolo de aplicación para la desinfección de cistos de <i>Artemias</i>	39
3.5. Análisis de costos para la aplicación de aceites esenciales	40
CAPÍTULO 4.....	43
4. Conclusiones y Recomendaciones	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45

ABREVIATURAS

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
PUFAs	Poly-Unsaturated Fatty Acids
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
EOs	Essential Oils
ADN	Ácido desoxirribonucleico
QS	Quorum Sensing
AHPND	Necrosis Hepatopancreática Aguda
O/W	Oil/Water
MIC	Mínima concentración Inhibitoria
CENAIM	Centro Nacional De Acuicultura E Investigaciones Marinas
AM	Amplio espectro de bacterias
DEOs	Disponibilidad de los Aceites Esenciales

SIMBOLOGÍA

ml	Mililitro
MT	Toneladas métricas
ppm	Partes por millón
°C	Grados centígrados
mg	Miligramo
L	Litro
g	gramo
mol	moles
ppt	Partes por mil
uL	Microlitro
um	Micro
nm	Nanómetro
ug	Micro - gramo
lb	Libras

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.1 Mecanismo de resistencia antimicrobiana de bacterianas patógenas FUENTE: Cruz, et al. 2015).....	8
Gráfico 1.2 Factores de virulencia de bacterias patógenas en sistemas acuícolas. Fuente: (Defoirdt,2014)	9
Gráfico 1.3 Vibrio Chlorae, Vibrio Parahaemolyticus y Vibrio vulnificus formando biopelículas mediante diferentes moléculas de expresión. Fuente: (Arunkumar et al., 2020)	11
Gráfico 1.6 Sistemas de emulsificaciones de Eos (Bakry et al., 2016)	13
Gráfico 1.4 Mecanismo de acción de los EOs en bacterias patógenas. Fuente: (Arunkumar et al., 2020)	13
Gráfico 1.5 Otros mecanismos de acción de los Eos en bacterias patógenas.	13
Gráfico 1.6 Sistemas de emulsificaciones de Eos (Bakry et al., 2016)	16
Gráfico 1.8 Extracción por arrastre de vapor fuente: (Alejandro, 2013)	16
Gráfico 1.9 Extracción de aceites esenciales mediante fluidos supercríticos	17
Gráfico 1.10 Representación de la extracción de aceites esenciales por microondas ...	18
Gráfico 2.1 Esquema del proceso de selección de EOs para la desinfección de Artemia.	19
Gráfico 3.1 Crecimiento de vibrios en 24 h post decapsulación de cistos de Artemias.	37
Gráfico 3.2 Decapsulación de cistos de Artemias con productos químicos.	39
Gráfico 3.3 Tanque después de la decapsulación para suministrar 10 ppm de Eo de orégano.	39
Gráfico 3.4 Composición emulsificada del Eo de orégano.	40
Gráfico 3.5 Enjuague de los nauplios de Artemia con agua filtrada por UV.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Resultados bibliográficos de los aceites esenciales usados comúnmente en acuicultura	26
Tabla 2.2 Comparación de los diferentes EOs con respecto a los criterios establecidos	36
Tabla 3.1 Calificación de los EOs con respecto a los criterios establecidos.....	38
Tabla 3.2 Costos de productos químicos comúnmente usado en la decapsulación y desinfección de cistos de Artemia	41
Tabla 3.3 Precios de Eos a diferentes volúmenes con sus respectivas concentraciones.	41
Tabla 3.4 Costos de cloro y EOs para 1 Lb y 4.5 Lb de cistos de Artemias.	42

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se define como la producción de especies acuáticas en áreas confinadas con el fin de proveer alimentos a una comunidad global en constante crecimiento (FAO, 2018). Entre las principales industrias acuícolas a nivel global, se destacan el cultivo de peces, moluscos y crustáceos. Particularmente, la acuicultura de peces, crustáceos y moluscos son dependiente del uso de alimento vivo como rotíferos, copépodos, daphnia, microalgas y artemias, en etapas iniciales de desarrollo. El alimento vivo, en la mayoría de los casos, proporciona los requerimientos nutricionales básicos para el desarrollo de las especies acuáticas cultivables. Además, cuentan con otras ventajas como digestibilidad aceptable, movimiento en la columna de agua estimulando el apetito de la especie cultivada, fácil adaptación para su cultivo ,entre otras(Conceição et al., 2010; Dhont et al., 2013; Kandathil Radhakrishnan et al., 2020). El uso de *Artemias* para el cultivo de peces y crustáceos ha sido bien acogida a nivel global, debido a la disponibilidad y facilidad del cultivo. Además dentro de las ventajas de las *Artemias* como alimento vivo, destacan, el no necesitar un stock de reproductores, puesto que debido a su criptobiosis se puede acceder fácilmente a cistos comerciales(Dhont et al., 2013; Moraga et al., 2014). Las *Artemias* aportan un conveniente perfil nutricional, (50%) de proteína, (18%) de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados esenciales (PUFAs) dispensables para los peces y crustáceos en estadios iniciales.(Dhont et al., 2013; Kandathil Radhakrishnan et al., 2020)

A pesar de los excelentes beneficios, que brindan las *Artemias* como fuente de alimento vivo, para las diversas especies de peces y crustáceos cultivables, también han sido consideradas como posibles vectores de contaminación biológica, en específico contaminación bacteriana (Dhont et al., 2013; Pati & Belmonte, 2003; Tolomei et al., 2004). Está ampliamente documentado que la flora bacteriana principal de las *Artemias* pertenece al género *Vibrio* (Conceição et al., 2010; Dhont et al., 2013; Høj et al., 2009; Pati & Belmonte, 2003; Sorgeloos et al., 2001; Tolomei et al., 2004), y que durante el cultivo de *Artemias* los vibrios pueden alcanzar altas concentraciones (10^8 UFC/ml) en 24h de cultivo (Dhont et al., 2013; Grothkjær et al., 2016; Haché & Plante, 2011). Esto se debe a que durante los procesos de eclosión y cultivo de *Artemias*, se propician las

condiciones ideales para el desarrollo y la proliferación de vibrios (Abel et al., 2018; Dhont et al., 2013; Kandathil Radhakrishnan et al., 2020; Pati & Belmonte, 2003; Raman, 2017; Sorgeloos et al., 2001; Sotomayor et al., 2019; Tolomei et al., 2004)(Høj et al., 2009), desencadenando procesos infecciones cuyos roles patógenico de los vibrios han sido ampliamente documentado asociandose a diferentes enfermedades bacterianas en los cultivo de peces y crustáceos, provocando pérdidas económicas significativas en la industria acuícola (Ina-Salwany et al., 2019; Mohamad et al., 2019).

Comunmente la desinfección de los cistos de *Artemias* es mediante el uso de productos químicos que también son usados para la decapsulación (Høj et al., 2009; Pati & Belmonte, 2003). Además, el uso de antibióticos como el florfenicol han sido utilizado para la desinfección de cistos, en los países que se permite su uso en la acuicultura (Interaminense et al., 2014). Sin embargo, la práctica deliberada y recurrente del uso de antibióticos produce una marcada resistencia bacteriana (Subbiah et al., 2020), perjudicando la flora bacteriana natural y una subsecuente posibilidad de generación de enfermedades emergentes en los sistemas de producción acuícola (Saharan et al., 2020). Además, estas prácticas en la actualidad no son eficientes, debido que no reducen la biomasa de los vibrios presentes en las *Artemias*, en gran parte se debe a la resistencia bacteriana adquirida por los vibrios a los antibioticos comunes(H. A. Ahmed et al., 2018; Elmahdi et al., 2016; Leng et al., 2019; Raszl et al., 2016; Tan et al., 2020). En este contexto, es fundamental la implementación de nuevas estrategias confiables, eficientes y amigables con el ambiente que reduzcan las poblaciones de vibrios en *Artemias*.

Entre las prácticas amigables, el uso de productos naturales como los aceites esenciales (EOs por sus siglas en inglés) se ha constituido en una de las alternativas eficaces, ya que se ha evidenciado diferentes propiedades biológicas activas (A. F. Ahmed et al., 2019; Aleksic Sabo & Knezevic, 2019; De FreitasSouza et al., 2019), destacando la actividad antimicrobiana a tal punto de ser considerados como remplazo de los antibióticos (Aleksic Sabo & Knezevic, 2019). Se han registrado la actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra bacterias patógenas de sistemas acuáticos mejorando el sistema inmune de las especies cultivadas, además de mejorar la tasa de supervivencia(Domínguez-Borbor et al., 2020a). De igual modo, el uso de los EOs no tiene efectos perjudiciales a los consumidores(Bakkali et al., 2008; Calo et al., 2015; Raut

& Karuppayil, 2014; Ribeiro-Santos et al., 2017; El et al., 2020; Hernández-Contreras & Hernández, 2020). Por lo que, en este proyecto describimos a los aceites esenciales como una alternativa sustentable en la desinfección de cistos de *Artemias*.

1.1. Descripción del problema

Las principales industrias acuícolas hacen uso de *Artemia* como alimento vivo, específicamente la industria de peces y camarón debido a la facilidad y adaptabilidad del cultivo, además de poseer un aceptable perfil nutricional. No obstante, se ha identificado que durante la eclosión y la desinfección de cistos de *Artemia* existen altas tasas de concentraciones bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*. Convirtiéndose en un vector de contaminación bacteriana para el cultivo y por ende desencadenando procesos infecciosos aumentando las tasas de mortalidad además de las pérdidas económicas significativas. Cabe resaltar que durante el proceso de decapsulación de *Artemias* se hace uso de productos químicos con la finalidad de debilitar el corion y de desinfectar los cistos. Sin embargo, ciertos países han empleado antibióticos para la desinfección de quistes de *Artemia* con el fin de reducir las concentraciones bacterianas debido a que se han evidenciado altas cargas bacterianas después de 24 horas de cultivo. El uso de antibióticos contribuye a la resistencia bacteriana, y conduce a la generación de bacterias multirresistentes que pueden convertirse en un serio riesgo para la salud pública.

La proliferación de bacterias del género *Vibrio* en el desarrollo del cultivo de *Artemia* se presenta por las condiciones fisicoquímicas del medio. Además, el corion de los nauplios de *Artemia* está compuesto por glicerina, compuesto que facilita el crecimiento bacteriano del género *Vibrio*. Estos se sitúan dentro del intestino de las *Artemia* formando parte de su microflora bacteriana, convirtiendo a las artemias en vectores de agentes patógenos para las especies en cautiverio. Debido a esto, las industrias acuícolas de peces y crustáceos se ven afectada por el uso de *Artemia* como fuente de alimento vivo. Actualmente, no existe un protocolo eficiente para reducir las altas carga de vibrios en las *Artemias*. Por lo que es fundamental la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de fuente natural, amigables con el ambiente y sin efectos colaterales para los consumidores.

1.2. Justificación.

La acuicultura de peces y crustáceos son las dos industrias acuicolas de mayor relevancia a nivel global, y en su mayoría son dependiente del alimento vivo para el desarrollo adecuado de las especies de cultivo. Las *Artemias* como principal alimento vivo usado en estas industrias acuícolas en sus estadios iniciales, son fuente de contaminación debido a las altas cargas de vibrios que forman parte de su flora natural y que proliferan durante el desarrollo del cultivo pudiendo ocasionar enfermedades emergentes en las especies de peces y crustaceos. Los vibrios son difíciles de controlar en los sistemas de producción, debido a que son omnipresentes en los sistemas acuáticos, y pueden formar biopelículas, que son estructuras bien organizadas donde excretan metabolitos secundarios e intercambian genes a través de la transferencia horizontal de genes, demostrando que bajo esta estructura son mucho más resistentes que las bacterias planctónicas (Arunkumar et al., 2020). Sumado a esto, estudios han evidenciado que varias cepas de vibrios como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* mostraron una resistencia múltiple a los antibióticos como tetraciclina, ampicilina, penicilina, estreptomicina, amoxicilina, lincomicina, vancomicina y furazolidona (Elmahdi et al., 2016a; Mok et al., 2019; Sneha et al., 2016; Tan, Rukayadi, Hasan, Thung, Lee, Rollon, Hara, Kayal, et al., 2020; H. A. Ahmed et al., 2018; Perretta et al., 2019; Tan, Rukayadi, Hasan, Thung, Lee, Rollon, Hara, Kayal, et al., 2020).

El uso de productos naturales como EO ha sido considerado como una alternativa eficiente para el control de bacterias patógenas, responsables de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, la inhibición microbiana por parte de los EOs ha demostrado eficacia frente a los varios patógenos comunes en la industria alimentaria, dentro de los cuales se encuentran: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus aureus*, *Campylobacter*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, y otros (Lin et al., 2016) (De FreitasSouza et al., 2019; W. He et al., 2017; Luis et al., 2019; Omonijo et al., 2018). La actividad antimicrobiana de los EO se debe a la diversidad de compuestos tales como, fenólicos, alcaloides, aldehídos, cetonas o ésteres, que pueden lisar la pared celular, bloquear la síntesis de proteínas, la síntesis de ADN, inhibir la señalización del quórum sensing (QS) de bacterias entre otros mecanismos (Delaquis et al., 2002; Galvão et al., 2012; Raut & Karuppayil, 2014; Saad et al., 2013; Trombetta et al., 2005; Ultee et al., 1999), debido a esto, los aceites

esenciales son promisorios para la industria acuícola sin efectos colaterales y son amigables al medio acuático, así mismo, las dosis subletales utilizadas, limitan la propagación de bacterias resistentes(Elmahdi et al., 2016b; Jo et al., 2020; Ozogul et al., 2020;Aleksic Sabo & Knezevic, 2019). Sin embargo, se debe evaluar las concentraciones y dosis, las cuales no afecten al cultivo de *Artemia* y a la especie cultivada, asegurando la mitigación parcial o total de bacterias patógenas del género *Vibrio*. Por otro lado, el uso de los aceites esenciales en *Artemia* como agente desinfectante puede ser utilizado como alternativa de enriquecimiento, siempre y cuando se establezca la dosis de aplicación y el tiempo adecuado para la absorción de los aceites esenciales por parte de las *Artemias*, teniendo como resultado un alimento vivo libre de bacterias patógenas además de mejorar su perfil nutricional.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Diseñar un protocolo de desinfección para reducir la concentración de vibrios totales en el cultivo de *Artemia* mediante la aplicación de aceites esenciales, a fin de proveer un alimento vivo e inocuo para la acuicultura de peces y crustáceos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Detallar el procedimiento para observar el comportamiento bacteriano en el cultivo de *Artemia* para identificar las etapas con mayor crecimiento de vibrios.
- Analizar la literatura existente de EOs con propiedad antimicrobiana contra bacterias patógenas en especies acuáticas
- Establecer los criterios de selección de aceites esenciales con mayor actividad antimicrobiana para la disminución de Vibrios.
- Comparar bajo revisión bibliográfica de los aceites esenciales seleccionados con la finalidad de seleccionar el EO con mayor actividad antimicrobiana
- Describir los métodos de evaluación para la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales seleccionados.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Importancia de la artemia en acuicultura.

La producción de la industria acuícola para el 2016 fue de 80 MT de peces comestibles con un estimado de 231 600 millones de USD, mientras la producción de crustáceos alcanzó los 7,9 MT con un estimado de 57 100 millones de USD, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2018). Se estima que la producción de *Artemia* para uso como alimento vivo en la industria acuícola es alrededor de 1000 – 3000 toneladas anuales de cistos de *Artemias*, supliendo a la industria en un 90% de la producción. Los cistos de *Artemias* en su gran mayoría provienen del gran lago salado de Utah (Acuicultura et al., 2018; Fundación para la Innovación Agraria, 2009; Moraga et al., 2014).

La artemia es el principal alimento vivo actualmente usado como parte fundamental durante la etapa de crecimiento en la larvicultura de varias especies acuáticas. La artemia tiene la capacidad de resistir altas concentraciones de sal, sobrevive a la variación de composición iónica en el agua, extremas temperaturas, niveles altos de radiación ultravioleta, es resistente a bajas concentraciones de oxígeno (Camara, 2020), y por su característica de criptobiósis puede ser almacenada por largos periodos de tiempo hasta el momento en que se requiera, Además 24 horas de condiciones ideales son suficientes para su activación y desarrollo (Beardmore et al., 2002).

El cultivo es posible en cualquier época del año conservando los parámetros básicos de producción tales como; oxígeno (3-5 ppm), ph (7-8.5), temperatura (24-36°C) (Dhont et al., 2013) y en un medio salobre o salino. Las artemias aportan un aceptable perfil nutricional para las especies en sus estadios iniciales. Al permanecer en la columna de agua y estimula la reacción de caza en los peces, lo cual es indispensable para un óptimo crecimiento, es así que son conocidas también como “capsulas vivas de nutrición” (Kandathil Radhakrishnan et al., 2020); se le atribuye además la característica de ser organismos filtradores no selectivos, por lo que hoy en día, se han implementado varias técnicas de enriquecimiento o bioencapsulación para mejorar su valor nutricional proporcionando ácidos grasos esenciales, y otros nutrientes importantes para el desarrollo de peces y crustáceos (Beardmore et al., 2002).

Según Lavens et al (2000), la artemia es usada como alimento vivo o inerte, eso dependerá del cultivo que implemente su uso, muchas veces es usada en etapas específicas de su desarrollo, pues para ciertas especies acuáticas el tamaño de la boca limita el uso de otros alimentos, también se usan los nauplios de artemia recién eclosionados como organismos de fácil digestión. Otra de las propiedades por la cual es utilizada, es debido a la actividad enzimática que genera al ser consumida. Cabe recalcar que este organismo es recolectado masivamente y puesto a disposición de la industria acuícola, del total, el 85% de su producción aproximadamente, se destina para granjas que cultivan camarón y el resto va para cultivos de peces marinos.

1.4.2. Desinfección de artemia

La eclosión dependerá de los principales factores que se necesitan para la incubación, tales como; luz, temperatura, salinidad, oxígeno, pH, densidad de los cistos, el uso adecuado de los compuestos para su decapsulación también se ha probado que dichas condiciones, varían de acuerdo a la procedencia de los cistos (Vanhaecke & Sorgeloos, 1982). Durante la eclosión, los cistos que no eclosionaron y los restos de la incubación (restos de corión), generan riesgos patológicos puesto que el compuesto principal del corion es la glicerina lo que propicia la proliferación de vibrios (Nathan & Scobell, 2012). Según (Negret Redondo et al., 2008) la carga de *vibrio* en artemia, en el medio natural presenta valores desde 5×10^6 UFC/mL hasta $6,8 \times 10^7$ UFC/mL. En los cultivos de producción de artemias se ha reportado que los vibrios llegan a un máximo de $1,2 \times 10^7$ UFC/mL específicamente *Vibrio fluvialis*, *Vibrio cholerae*, y *Vibrio alginolyticus* (Dhont et al., 2013; Giarma et al., 2017; Høj et al., 2009).

El proceso de decapsulación comprende el uso de compuestos químicos tales como la formalina, hipoclorito de sodio (NaClO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), permanganato de potasio (KMnO_4) y Sulfato de cobre (CuSO_4), los mismos que en ocasiones son usados para la desinfección (Høj et al., 2009; Pati & Belmonte, 2003). Estos compuestos han brindado algunos beneficios como incrementar la tasa de eclosión, un ahorro de energía del nauplio durante la eclosión y una disminución de bacterias en los cistos de artemia. Así mismo, para la desinfección de los nauplios eclosionados, se han usado antibióticos como el cloranfenicol (30mg/L) (Gomez-Gil et al., 1998; Interaminense et al., 2014) permitiendo la transferencia horizontal de plásmidos de resistencia en bacterias

patógenas. En el estudio de Jo et al., (2020) la resistencia bacteriana fue evidenciada por parte de la cepa de *V. Parahaemolyticus* específicamente a los antibióticos, vancomicina (100%), ampicilina (97,4%), estreptomina (73,7%), cefotaxima (71,1%) y kanamicina (55,3%). Así mismo Elmahdi et al., (2016) aislaron cepas de *V. Parahaemolyticus* y *V. Vulnificus* de los sistemas de producción acuícola en países como China, Brazil, Estados Unidos e India concluyendo que *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* fueron resistentes a la mayoría de agentes antibióticos (Elmahdi et al., 2016; Jo et al., 2020; Sneha et al., 2016; Tan et al., 2020).

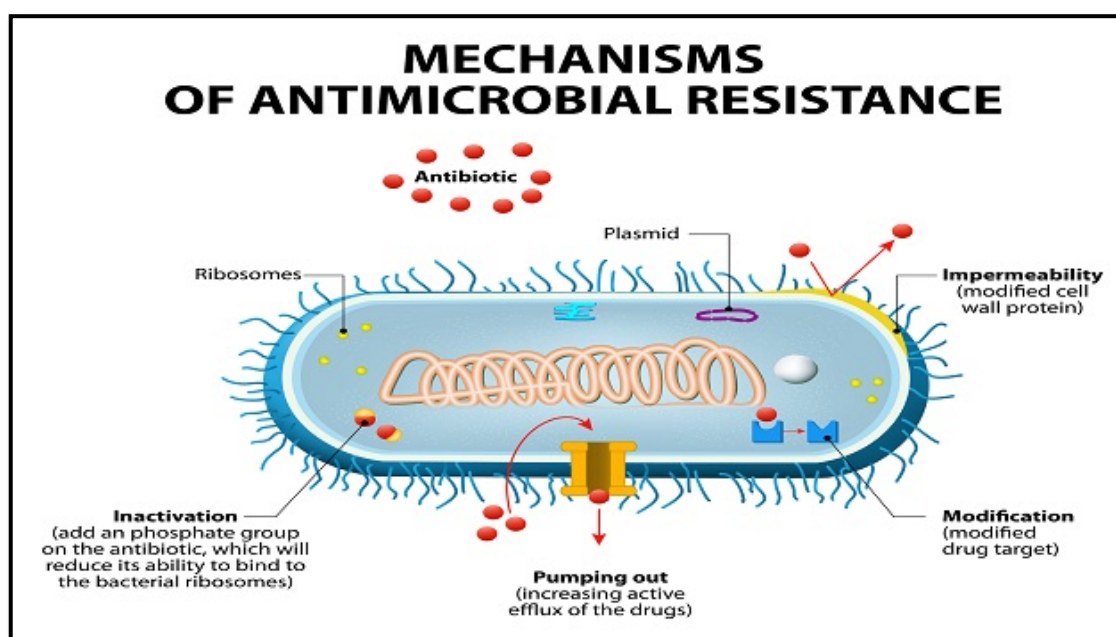


Gráfico 1.1 Mecanismo de resistencia antimicrobiana de bacterianas patógenas
FUENTE: Cruz, et al. 2015)

1.4.3. Vibrios en artemias

El uso de artemia como importante complemento alimenticio para algunas especies de crustáceos y peces, hace inherente la presencia de colonias bacterianas en su producción, puesto que se necesita un medio acuático para poner en marcha un cultivo de artemia, y es entonces cuando toma relevancia la carga bacteriana que puede manifestarse durante dicho proceso de producción. Austin et al. (1982), demostraron que la artemia trae consigo bacterias en la superficie de los cistos que resisten el proceso de almacenamiento (enlatado en un lugar seco y hermético), y durante la eclosión aumenta el número total de bacterias hasta $1,2 \times 10^7$ UFC/mL. Así mismo, se ha demostrado que dentro de cada nauplio de artemia hay aproximadamente 50 bacterias, aumentando

dentro de los cistos no eclosionados. Las bacterias Gram negativas relacionadas al cultivo de *Artemias* que son responsables de muchas de las enfermedades que se ven en los cultivos acuícolas, son las del género *Vibrio*, además existen otros géneros como *Aeromona*, *Pseudomona*, *Tenacibaculum*, *Photobacterium* (Dhont et al., 2013; Sorgeloos et al., 2001; Lightner & Redman, 1998).

1.4.4. Mecanismo de acción de bacterias patógenas en la acuicultura.

Según (Suárez, Medina, 2015) se conoce que *Vibrio* spp. es causante de varias enfermedades en los cultivos acuícolas, y a menudo se incrementan las cargas bacterianas por medio del alimento, esto involucra la fase inicial del cultivo; cuando se proporciona artemia como alimento vivo de calidad para muchas especies acuícolas en sus estadios larvarios. Por ejemplo, en el caso del camarón blanco (*P. vannamei*), las especies que comúnmente causan enfermedades en el cultivo son: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. vulnificus* y *Photobacterium* afectando todas las etapas del cultivo, pudiendo causar mortalidades hasta del 100%. Muchas de las bacterias causantes de enfermedades, son oportunistas y están presentes en el agua, tierra y aire; naturalmente también se encuentran en el organismo animal, en la flora bacteriana, ocasionando enfermedades cuando las condiciones del medio se ven alteradas y se produce estrés en el animal (Daniel et al., 2011).

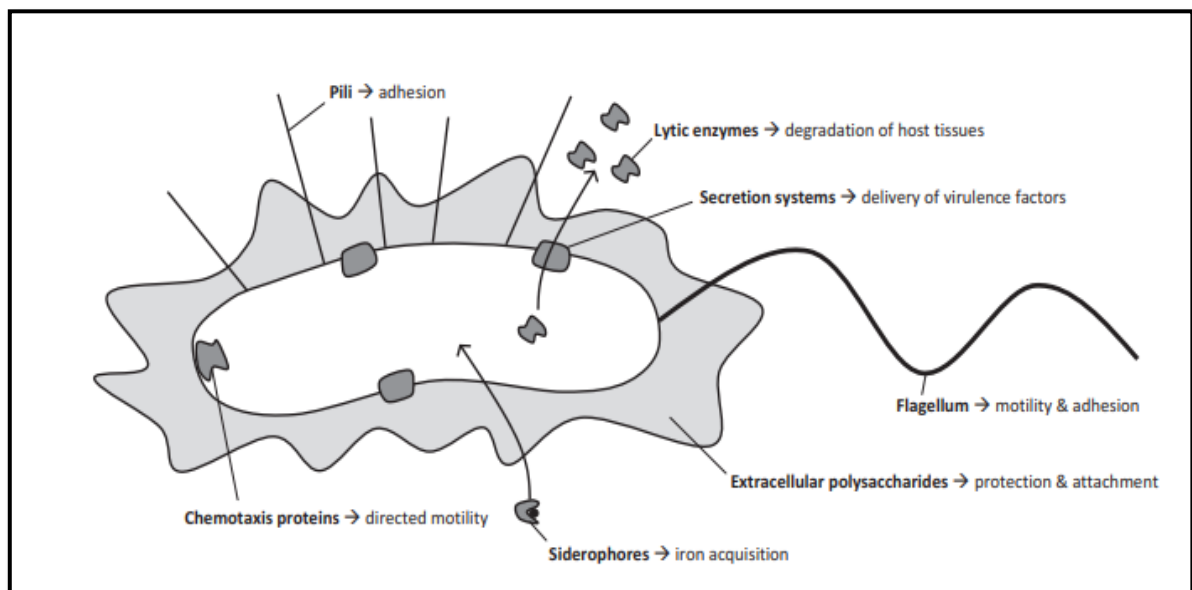


Gráfico 1.2 Factores de virulencia de bacterias patógenas en sistemas acuícolas.

Fuente: (Defoirdt, 2014)

Una enfermedad reciente provocada por varios vibrios en el cultivo de camarón es la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda o (AHPND por sus siglas en ingles). La AHPND es asociada a varios vibrios productores de las toxinas *PirA-PirB*, altamente letales para camarones peneidos (Boonchuen et al., 2018; L. Liu et al., 2018; Muthukrishnan et al., 2019; Navaneeth et al., 2020). La AHPND provoca altas tasas de mortalidad, hasta el 90% de la producción, generando altas pérdidas económicas en la industria camaronera (Navaneeth et al., 2020). En la industria acuícola de peces las principales enfermedades causadas por Vibrios, proviene mayormente por el *Vibrio harveyi* y *Vibrio anguillarum* ya que afectan a más de 50 especies de peces de cultivos presentando síntomas clínicos comunes como; letargia, nado errático, úlceras cutáneas, erosión de la aleta tornándose necrótica. Además, exoftalmia y opacidad corneal. Estos síntomas son presentados en enfermedades de peces como; Úlcera de invierno (Benediktsdóttir et al., 2000), vibriosis de agua fría (Marudhupandi et al., 2017). Enfermedad por caída de escama y necrosis muscular (Dong et al., 2017), Furunculosis de agua salada (Frans et al., 2011), Enfermedad del agua caliente (Callol et al., 2015), causando pérdidas económicas más de USD 1 mil millones de dólares en la industria de cultivo de peces (Ina-Salwany et al., 2019; Mohamad et al., 2019).

Se ha comprobado que las bacterias están presentes en el intestino, y las branquias. En un estudio realizado por (Navais Barranco, 2013), experimentalmente se infectó con bacterias a varios peces, y se identificó la presencia bacteriana en estos órganos, concluyendo que la infección se da partir de la diseminación desde los intestinos. Algunas bacterias patógenas están presentes en el organismo del animal sin ser detectadas, convirtiendo a los animales en portadores de la bacteria, y ocasionando infecciones por medio de sus heces. Según (Magnadóttir, 2006), es esencial para una bacteria patógena, tener la capacidad de evadir el sistema inmunológico del huésped, especialmente la acción de los macrófagos, si se logra esto, el agente patógeno asegura eficientemente su colonización. Así mismo la adherencia bacteriana hacia los tejidos del hospedador es vital para la bacteria, ya que progresivamente luego de colonizar, empieza la infección mediante la liberación de toxinas para invadir las células del organismo acuático (Hultgren et al., 1993).

1.4.5. Formación de biopelículas por *Vibrio*

La biopelícula es un patrón de unión de microorganismos incrustados en sustancias poliméricas extracelulares producidas por las mismas bacterias para su protección, estas se producen tanto en superficies vivas como no vivas. Las biopelículas desarrolladas son estructuras bien organizadas con una fuerte adherencia al sustrato, donde excretan metabolitos secundarios, materiales de desecho y también intercambian los genes a través de la transferencia horizontal de genes, así mismo en el modo de biopelícula, las células bacterianas son mil veces más resistentes que las células planctónicas, lo que dificulta su erradicación de las superficies del huésped(Defoirdt, 2014). La formación de biopelículas se produce en tres etapas en función de su fenotipo. aspectos tales como (i) adhesión de células microbianas en la superficie, (ii) desarrollo de microcolonias y proliferación, (iii) dispersión de la biopelícula madura. en comparación con las células planctónicas, las células de biofilm son más resistentes a altas temperaturas y bajo pH(Arunkumar et al., 2020).

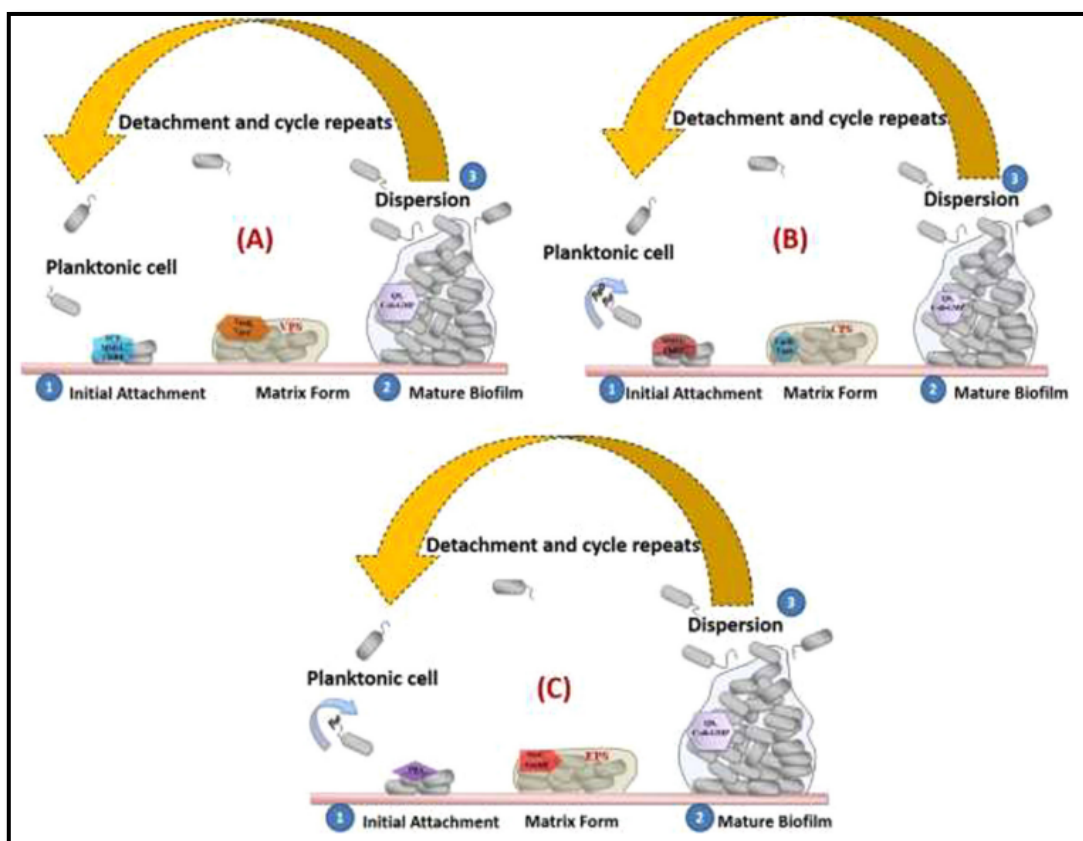


Gráfico 1.3 *Vibrio Chlorae*, *Vibrio Parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* formando biopelículas mediante diferentes moléculas de expresión. Fuente: (Arunkumar et al., 2020)

1.4.6. Aceites esenciales y sus principales propiedades biológicas.

Los aceites esenciales básicamente son un líquido un poco denso, este fluido es segregado por células especiales que se encuentran en hojas, flores, madera, raíces o semillas. Estos extractos son bien complejos en cuanto a su composición química, y pueden contener hasta más de 300 diferentes compuestos (H. A. Peredo, Luna, E. Palou, 2009), estos compuestos son volátiles con un peso molecular menor a 300 g/mol y pertenecen a varias clases químicas: alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres u óxidos, aldehídos, cetonas, aminas, amidas, fenoles, heterociclos, y principalmente los terpenos, de allí radica sus propiedades particulares antiparasitarias, y antimicrobiana.

La producción de EO se limita principalmente a los géneros Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, Asteraceae y Lamiaceae, de éstos, se conocen unos 3000 EO de los cuales 300 son comercialmente destinados principalmente al mercado de sabores, fragancias y preservantes (Bhavaniramya et al., 2019; Calo et al., 2015; Nor et al., 2018). La actividad antimicrobiana se debe principalmente a los compuestos fenólicos por lo que dicha actividad está asociada a plantas con presencia de estos componentes principales, tales como, cinamaldehído, citral, carvacrol, eugenol y timol (Alibi et al., 2020; Ebani et al., 2016; Ezzat Abd El-Hack et al., 2016; Friedman, 2017; McGaw, 2013), ya que han mostrado una actividad significativa contra bacterias patógenas gram positiva y gram negativa en la producción de especies acuáticas además de especies terrestres.

Sus numerosas propiedades medicinales se caracterizan por ser eficaces en combatir gérmenes, hongos y distintos virus; cada tipo de aceite esencial tiene su característica específica medicinal. La hidrofobicidad es una característica importante de los aceites esenciales, ya que le permite separar los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, lo cual la hace más permeable, provocando la pérdida de iones y otras moléculas celulares, y esto puede resultar en la muerte celular (Ultee et al., 2002).

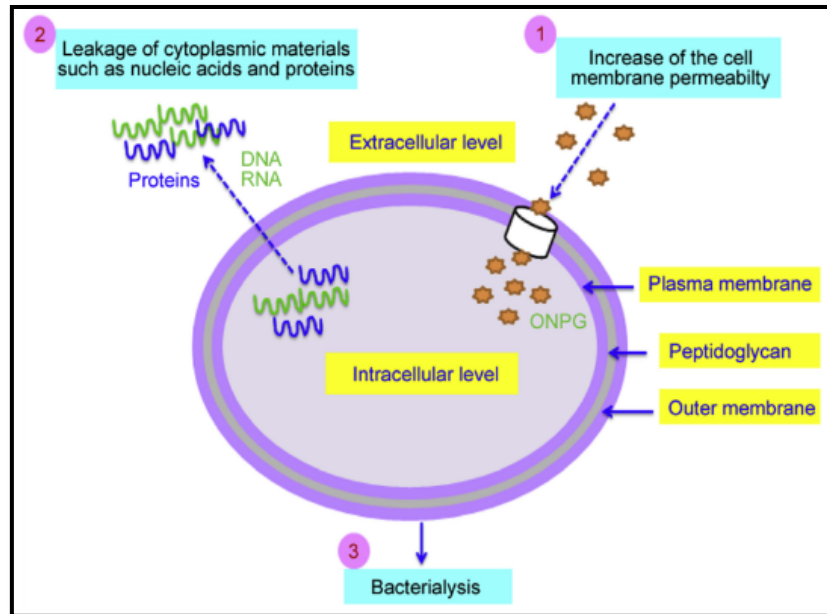


Gráfico 1.5 Mecanismo de acción de los EOs en bacterias patógenas.

Fuente: (Arunkumar et al., 2020)

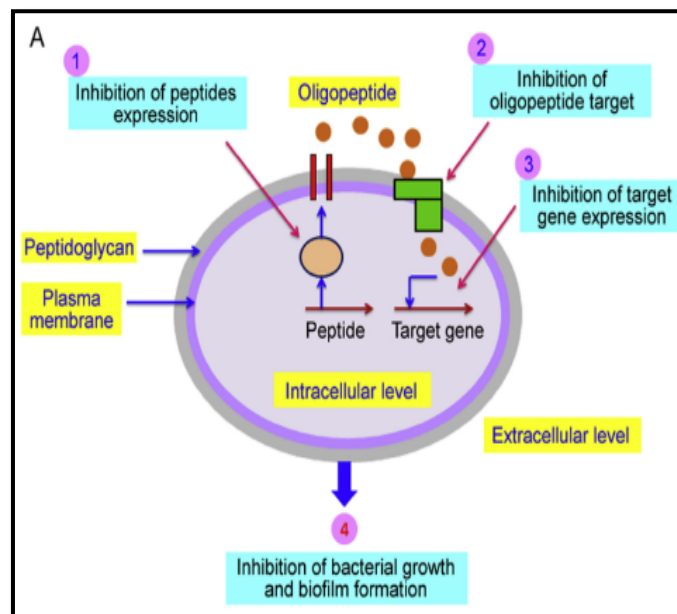


Gráfico 1.6 Otros mecanismos de acción de los Eos en bacterias patógenas.

Desde que se descubrieron los aceites esenciales y su extracción (a mediados de la edad media) se han usado en la industria alimentaria, de bebida y farmacéuticas. Precisamente en la medicina, presentan propiedades de gran importancia como un agente antimicrobiano. (Baydar et al., 2004) probaron la actividad antimicrobiana de 4 aceites esenciales (Oregano silvestre, Oregano, Tomillo negó, Ajedrea silvestre), frente

a bacterias patógenas; usando el método de hidrodestilación de Clevenger para obtener el aceite esencial y por medio del método de disco de sensibilidad pusieron a prueba su eficiencia. La composición de los aceites que se obtuvo fue de Carvacrol, p-cimeno y c-terpineno en mayor cantidad. Al ensayar la efectividad bacteriana de estos compuestos frente a bacterias patógenas, quedando claro que el compuesto fenólico carvacrol, es el que mayor incidencia tiene en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Debido a la composición específica de cada aceite esencial, se evidencian diferentes características como, propiedades anestésicas, sedantes y antiestrés, este último fue probado por (Silva et al., 2012), mediante la extracción del aceite esencial de *Ocimum gratissimum*, demostró que provoca un efecto anestésico en los peces, por la acción del Eugenol y β -bisaboleno, compuestos mayoritarios encontrados durante la extracción.

El uso de aceites esenciales es debido a su actividad antibacteriana, ya que inhibe el crecimiento de la bacteria (bacteriostática) causando efectos adversos o la muerte celular de la bacteria (bactericida) (Tariq et al., 2019). La propiedad antimicrobiana depende de los componentes químicos, y principalmente de los compuestos individuales principales, que contiene cada aceite esencial, cada compuestos tiene un mecanismo de acción antibacteriana implicando una serie de reacciones bioquímicas en el interior de las células bacterianas, y que la muerte de estas células depende de los componentes que están presentes en la composición del aceite esencial, Por otra parte la actividad antibacteriana de los aceites, depende también de la estructura celular de la bacteria, puesto que varía la membrana celular entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. (Tariq et al., 2019). Según (Özean & Erkmen, 2001) los principales aceites esenciales que tienen mayor incidencia bactericida son: Canela (*Cinnamomum verum*), Limón (*Citrus limon*), Orégano (*Origanum vulgare* L.), Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) Hierba Luisa (*Aloysia triphilla*) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.), ya que poseen los principales componentes antibacterianos.

1.4.7. Emulsificación de Aceites esenciales

La aplicación de EOs en su forma pura en medios acuáticos presenta varias limitaciones entre ellas está la manipulación, vulnerabilidad al estrés ambiental como la temperatura y el oxígeno, liberación no controlada, pobre solubilidad, efectos sensoriales

indeseables, baja bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Calo et al., 2015; Kumar et al., 2020; Rodríguez et al., 2016). El sistema de micro o nanoencapsulación es un método efectivo para superar las limitaciones mencionadas (Vinceković et al., 2017), mejorando la solubilidad y biodisponibilidad, evitando la liberación de componentes bioactivos y su interacción con otros componentes (Bakry et al., 2016; Rotello et al., 2016; Ruiz Ruiz et al., 2017). El objetivo principal de la encapsulación es el revestir los EOs con materiales que posean una pared adecuada de tal manera que proteja los componentes principales de los EOs, a la exposición al oxígeno, las altas temperaturas y la luz solar, aumentando su estabilidad, mejorando sus diferentes propiedades de bioactividad y así mismo aumentando su especificidad (Bakry et al., 2016; Delshadi et al., 2020; Rodríguez et al., 2016).

La emulsificación es uno de los métodos más comunes de encapsulación que se ha logrado mediante el proceso de homogeneización de dos líquidos inmiscibles de aceite (O) y agua (W), los diámetros de las gotas de emulsión en los sistemas alimentarios están en un rango de 0.1 a 100 μm estas emulsiones se realizan mediante un homogeneizador como: mezclador de alto cizallamiento, homogeneizador de alta presión, coloidal molino, sonicador u homogeneizador de membrana (Bakry et al., 2016). La emulsión O / W consiste en pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, las gotas de aceite están rodeadas por una delgada capa interfacial que consiste de moléculas emulsionantes, las principales ventajas de estos sistemas son la relativa facilidad de preparación y el bajo costo, pero así mismo presentan inconvenientes de la inestabilidad física cuando son expuestas a calentamiento, enfriamiento, congelación, secado, pH extremo y altas concentraciones de minerales, teniendo una liberación de control limitada (Kumar et al., 2020; Rodríguez et al., 2016). Las gotas dispersas en una fase acuosa se denominan emulsión de aceite en agua. (O / W), mientras que un sistema que consiste en gotas de agua disperso en una fase oleosa se llama emulsión de agua en aceite (W / O) y las emulsiones múltiples, como aceite en agua en aceite (O / W / O) o también se han desarrollado emulsiones de agua en aceite en agua (W / O / W) como se muestra en el gráfico 1.6.

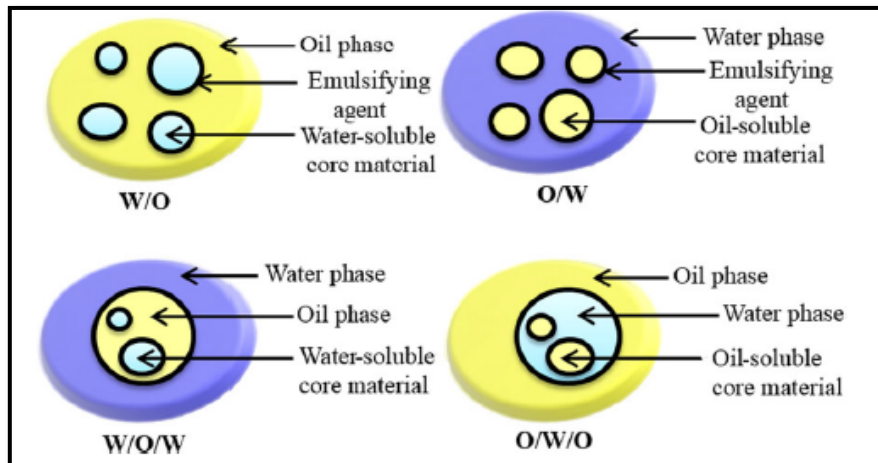


Gráfico 1.7 Sistemas de emulsificaciones de Eos (Bakry et al., 2016)

1.4.8. Métodos de extracción de aceites esenciales

Según (H. A. Peredo, Luna, E. Palou, 2009), existen algunos métodos de extracción de aceites esenciales vegetales. Entre los más comunes están:

1.4.8.1. Destilación por arrastre de vapor. - El componente principal para esta extracción es el vapor de agua, que se lleva a cabo con la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros componentes “no volátiles”, se dan 2 fases durante el proceso de extracción (orgánica y acuosa). Para poder aplicar este método, es de gran importancia que el componente volátil y los no volátiles, sean insolubles en agua, para que se pueda dar la separación del componente y el agua al finalizar el proceso. Este método de extracción es sencillo y de bajo costo, la desventaja es que requiere largos periodos de tiempo y presenta un bajo rendimiento de calidad en comparación con otros métodos.

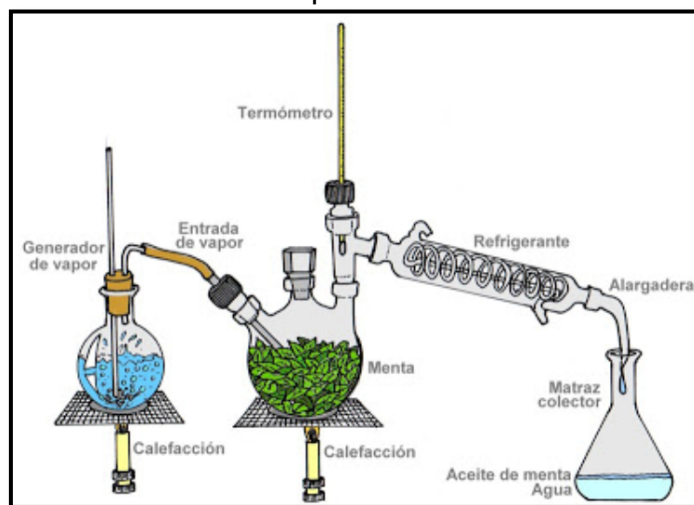


Gráfico 1.8 Extracción por arrastre de vapor fuente: (Alejandro, 2013)

1.4.8.2. Extracción con disolventes. – La muestra seca y molida se pone en interacción con disolventes orgánicos como alcohol y cloroformo, que solubilizan la esencia, pero también se solubilizan otras sustancias como grasas y cera, se obtiene “oleorresina” (extracto impuro), este método se lo realiza a escala de laboratorio, ya que industrialmente es costoso por el valor comercial de los disolventes, y riesgoso por la utilización de disolventes que pueden llegar a ocasionar explosiones. La desventaja de este método es que el aceite esencial que se obtiene contiene trazas de los disolventes usados, y también requiere periodos de tiempo relativamente largos.

1.4.8.3. Extracción por fluidos supercríticos. - Se usa un fluido llamado supercrítico como solvente, el más comúnmente usado el dióxido de carbono con una temperatura crítica relativamente baja (aproximadamente 30° C), luego se somete a presión, por medio de un aparato de extracción con CO₂. Este método involucra varios procesos como, presurización de gases, regulador de contrapresión y un calentador. Se pueden obtener extractos libres de disolventes al tratar la muestra con CO₂. Las ventajas de este método en comparación con otros métodos es que el tiempo de extracción es menor, y tiene mayor rendimiento; y la desventaja es que pueden ser extraídas ceras cuticulares y compuestos de alto peso molecular junto con el aceite esencial.

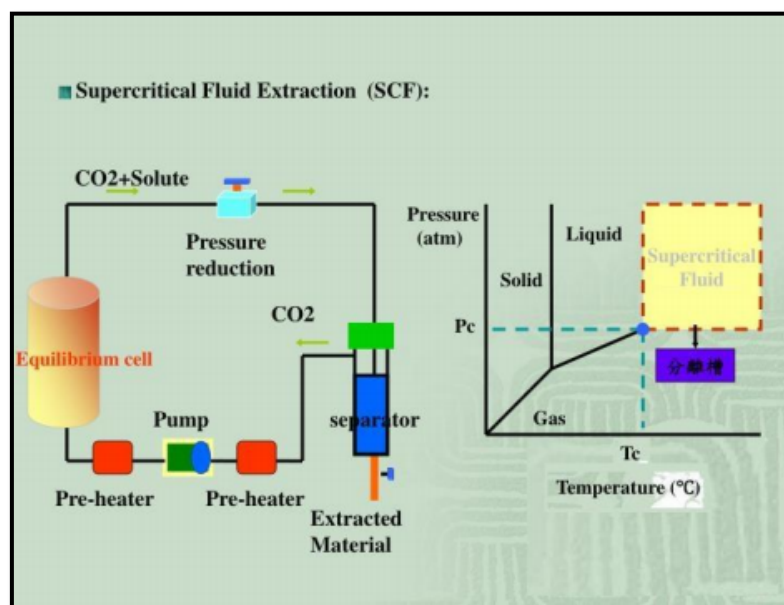


Gráfico 1.9 Extracción de aceites esenciales mediante fluidos supercríticos

1.4.8.4. Extracción por medio de microondas. – Este método es realizado en conjunto con la hidro-distilación, no se usa disolventes, consiste en provocar que la muestra se caliente uniformemente por medio de las ondas electromagnéticas, de esta manera se produce la evaporación de los componentes volátiles, que luego de ser condensados se filtran para obtener el aceite esencial. La ventaja de usar este método es la reducción del tiempo y del consumo de energía, adicionalmente también se puede aplicar pretratamientos con ultrasonido de baja frecuencia lo que incrementa la eficiencia en la extracción. Una desventaja es que, al usar ultrasonido, involucra el uso de disolventes orgánicos lo que baja el rendimiento de los compuestos activos.

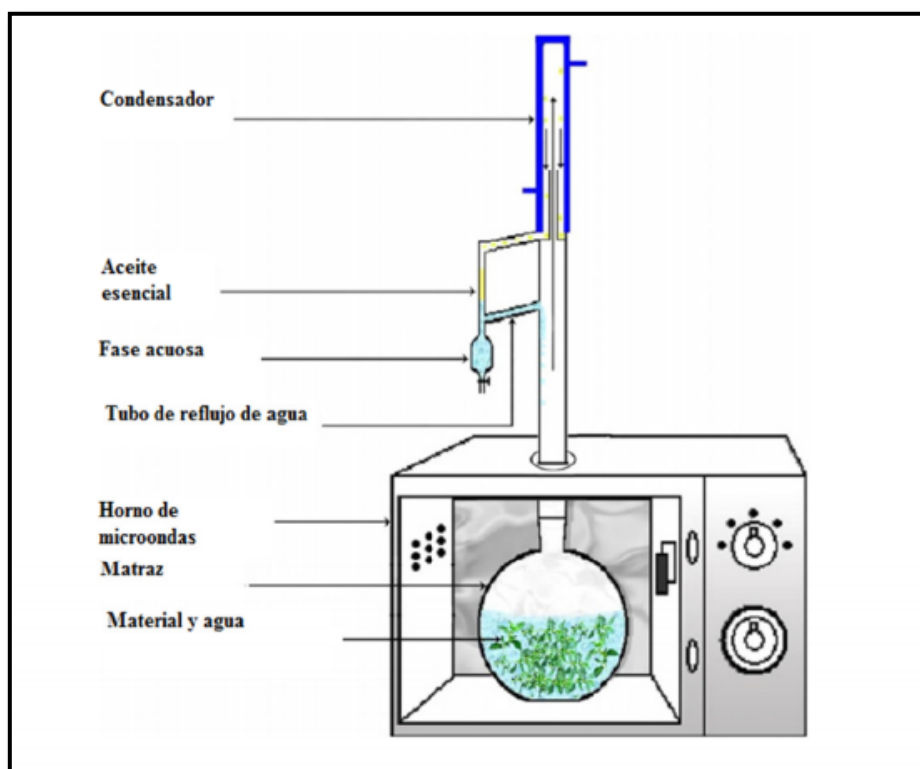


Gráfico 1.10 Representación de la extracción de aceites esenciales por microondas

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El protocolo de aplicación de EOs en la desinfección de Artemias para las industrias acuícolas de peces y crustáceos, se desarrolló mediante la aplicación de 4 pasos como se muestra en la figura 1. En el primer paso del diseño del protocolo, detallamos el procedimiento para observar el comportamiento bacteriano enfocado en el género *Vibrio* post eclosión de las *Artemias*. El segundo paso, se analizaron y se establecieron criterios para la selección del EO con mayor actividad antimicrobiana como principal propiedad biológica para la reducción de altas cargas de Vibrios. En el tercer paso, se describieron los métodos de evaluación para la actividad antimicrobiana se analizaron resultados bibliográficos de la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la inhibición de biopelículas de los EOs seleccionados y finalmente, en el cuarto paso, se diseñó el procedimiento para la aplicación de los aceites esenciales en el cultivo de *Artemias*.

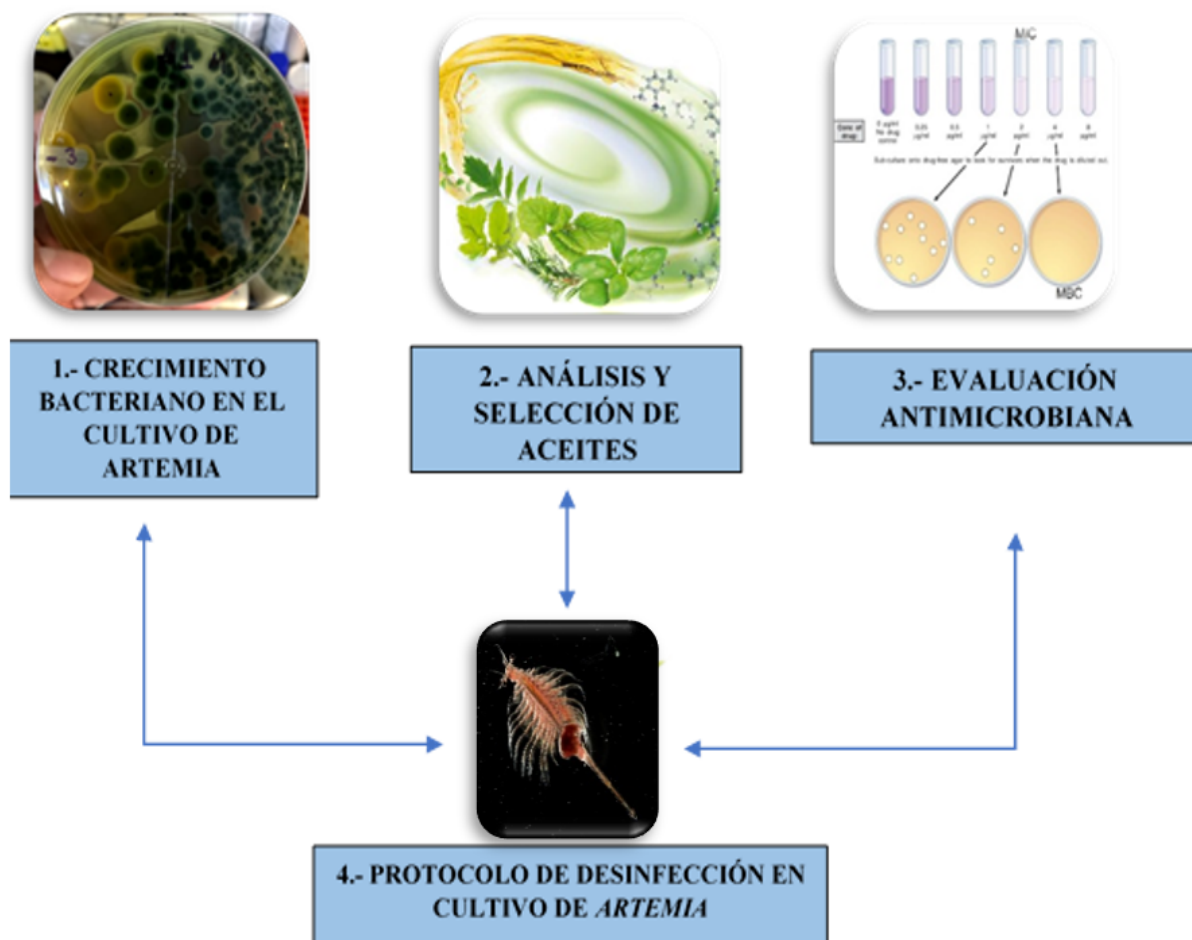


Gráfico 2.1 Esquema del proceso de selección de EOs para la desinfección de Artemia.

2.1. Modulación del comportamiento de Vibrios en el cultivo de *Artemia*

Existen diferentes investigaciones que demuestran la proliferación de los vibrios durante la eclosion de cistos de *Artemia*, sin embargo, en Ecuador no se ha realizado un estudio para comprobar este comportamiento. Por este motivo se evaluó la concentración de vibrios después de la eclosión de cistos de *Artemia* durante 24 horas en el centro nacional de acuicultura e investigaciones marinas (CENAIM). El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- La toma de muestras del cultivo de *Artemia* se realizó después de haber aplicado los productos químicos para la desinfección y decapsulación de los cistos. El cultivo se mantuvo en condiciones estables en cuanto a oxígeno (7 ppm), temperatura (35°C), iluminación constante (2000 lux) y en agua mar de 34 ppt. Las muestras fueron recolectadas en tubos de ensayos esterilizados y debidamente rotulados, en los tubos de ensayo se colocaron 10 ml del agua del tanque de cultivo en el cual se realizó la decapsulación y desinfección de los cistos. Las muestras se tomaron cada 4 horas hasta las 24 horas de cultivo, por lo cual se finalizó con 6 muestreos.
- De cada muestra se realizó una dilución seriada de 1/10, haciendo uso de una micropipeta de 1000 µl, para la cual se usó solución salina esteril (NaCl 2%).
- Las muestras de los Tiempos 0, 1 y 2 se diluyeron hasta la dilución 10^{-3} con réplicas en 10^{-2} , las muestras de los tiempos 3, 4 y 5 (T3, T4, T5) desde la dilución de 10^{-2} hasta la dilución 10^{-4} con réplica en 10^{-3} y la muestra del tiempo 6 (T6) con la dilución de 10^{-3} hasta la dilución 10^{-5} con réplica en 10^{-4} .
- Se prepararon medios de cultivo sólido de agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) con un 2% de NaCl para el crecimiento de los vibrios. Las cajas Petri se rotularon con la misma numeración de los tubos de ensayos de los cuales se procedió a realizar la siembra.
- Se inoculó 100 µl de cada muestra en las cajas petri y se realizó la siembra mediante la técnica de barrido de superficie con el asa de Drigalsky. Posteriormente se incubaron a temperatura de 28°C por 18 – 24 horas, hasta observar colonias.

- Después de 24 horas se contabilizaron las unidades de formadoras (UFC) y número total de UFC para cada muestra se determino aplicando la siguiente formula.

$$UFC = \frac{\#COLONIAS * FACTOR DE DILUCIÓN}{VOLUMEN INOCULADO}$$

2.2. Análisis de Aceites Esenciales para desinfección de *Artemia*

A través del análisis bibliográfico se identifico que los principales EOs evaluados como agentes antimicrobiano son orégano, tomillo, canela, clavo de olor, salvia, hierba de limon y romero, debido a que evidenció en ellos una mayor proporción de los componentes antibacterianos antes mencionado. Para la selección del EOs con mayor efecto antimicrobiano se realizó una comparación de acuerdo a los siguientes criterios de selección:

- Actividad microbicida mediante el halo de inhibición de la técnica de disco de difusión
- Actividad bacterioestatica basada en la concentración mínima inhibitoria (MIC)
- Actividad antimicrobiana, respecto al porcentaje de compuestos activos antimicrobianos
- Actividad antimicrobiana, dada por el amplio espectro de bacterias afectadas por el EO
- Disponibilidad nacional de los EOs con mayor actividad
- Toxicidad hacia las artemias y especies de cultivo peces y crustaceos.

El criterio de la disponibilidad se refiere a la accesibilidad del EO con los componentes antimicrobianos requeridos ya sea nacional o internacional con la finalidad de evaluar el costo beneficio del Eos para poder aplicarlo en el protocolo de desinfección sin alterar el costo final de la especie cultivada.

El amplio espectro de bacterias significa la variedad de géneros cuyo crecimiento puede ser afectado por los Eos, específicamente buscamos la mitigación de bacterias del género *Vibrio* spp garantizando la disminución de la flora bacteriana de las *Artemias*. Los Eos citados tienen la capacidad de interrumpir la proliferación de bacterias patógenas gram positivas y gram negativa, debido a esto se realizó la comparación entre los Eos

que poseen los componentes antimicrobianos. Adicionalmente, los Eos de alta toxicidad pueden utilizarse como inhibidores de la formación de biopelículas mientras que los de baja toxicidad pueden utilizarse a dosis microbicidas. Los análisis antimicrobianos se basan en la inhibición del crecimiento de la bacteria patógena. En específico, buscamos la disminución parcial o total de la formación de biopelículas de vibrios.

La citotoxicidad de los Eos se realiza con la finalidad de suministrar las dosis y concentraciones adecuadas cuyas no afecten negativamente a la fisiología de las *Artemias* y solo cumplan la función antimicrobiana, es por eso que se detalla el proceso de la evaluación de la citotoxicidad descrito por Domínguez-Borbor et al.(2018).

2.2.1. Ensayo *in vitro* de evaluación de la toxicidad de los EOs

Para este ensayo se utilizaron hemocitos de camarón *P.Vannamei*

- Se cargaron las jeringas de 1 ml con 100 ml del anticoagulante citrato de sodio al 10% (p v). además, se trabajó a temperatura ambiente (25 C).
- Retiramos la hemolinfa del seno ventral de los camarones, que se encuentra en la base del primer segmento abdominal. Para evitar la contaminación, se limpió el área con un bastoncillo de algodón empapado en etanol 70% (v / v).
- Se ajustó la dilución en anticoagulante a una proporción final de 50/50 para cada muestra, luego se mezclaron las muestras de hemolinfa, tomando 100 ul de cada una. Las muestras de hemolinfa se mantuvieron a temperatura ambiente en condiciones asépticas, hasta su uso.

2.2.2. Hemograma

- Fijamos una alícuota de la hemolinfa con formaldehído al 3.7%, en una relación V / V.
- Se realizó el conteo de hemocitos con 10 µl de la muestra de hemolinfa mediante un hematocitómetro (cámara de Neubauer).

2.2.3. Cultivo celular primario de hemocitos de camarones

- Se ajustó la concentración de hemocitos a 1×10^7 células ml^{-1} , usando citrato de sodio al 5% en solución de cloruro de sodio al 2%.
- Se depositó 50 µl de la mezcla de hemolinfa-anticoagulante en los pozos de microplacas. Se activaron los hemocitos con 50 µl/pocillo de solución salina

equilibrada de Hank modificada (HBSS), que contiene HBSS 1x, 2.6 g $^{-1}$ HEPES, NaCl 85 mM, Ca^{2+} 12 mM y Mg^{2+} 26 mM, pH 7.2 (MHBSS-3), se filtró en un filtro de 0.22 μm . para luego incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente para la adherencia de los hemocitos. Se preparó el MHBSS 30 minutos antes de ser usado.

- Eliminamos los sobrenadantes e inmediatamente se depositaron 50 μl /pocillo de MHBSS-2 que contiene HBSS 1X, Ca^{2+} 6 mM y Mg^{2+} 12 mM (pH 7.2).

2.2.4. Exposición de hemocitos al producto evaluado

- Se disolvió el EO en MHBSS-2 a diferentes concentraciones. Distribuyendo 50 μl por pocillo (mínimo tres repeticiones por factor de dilución) de cultivo primario de hemocitos. Como control positivo (células no tratadas) se depositó por triplicado 50 μl de MHBSS-2. Para ser Incubado durante 90 minutos a 25°C.
- Después de la incubación, se agregó 10 μl de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) (5 mg / ml MTT en agua miliq) a todos los pocillos incubando durante 120 minutos a 25°C en la oscuridad.
- Después de 120 minutos de incubación, los hemocitos de camarones se tiñeron con formazán y los pozos se tornaron púrpura. Se removió el sobrenadante y se agregó 150 μl de isopropanol que contiene HCl 0.04 N. Se homogenizó vigorosamente para disolver los cristales de formazán, colocando la microplaca en un cooler o un envase con hielo en el fondo.
- Se leyó a 620 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo utilizando la fórmula. Viabilidad celular OD = (células expuestas OD / células de control OD) 100%.

2.3. Descripción de los métodos de evaluación para la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

La detección de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (Eos) se realizó por el método de disco de difusión, en el que un disco de papel empapado con el aceite esencial seleccionado se coloca sobre el agar de una caja de Petri sembrada previamente con la bacteria. Para el método de difusión en disco de agar, la bacteria aislada e identificada se colocó en el caldo de cultivo LB (Lubia Bertani) con 2% de NaCl para llegar una concentración de 10^{-6} que será ajustada a la escala 0.5 por la turbiedad

de McFarland. Una vez llegada a esa concentración procedimos a sembrar 20 μl de la suspensión bacteriana en un medio sólido tripticasa soya agar (TSA) esparciendo con una asa de Drigalsky. Una vez realizada la siembra bacteriana procedimos a colocar los discos de papel de 6 mm de diámetro empapados con 50 μl de los Eos. Los medios de cultivos TSA inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 h, para posteriormente medir los diámetros de las zonas de inhibición.

Los valores de MIC se obtuvieron usando un ensayo de dilución de micropocillos, con modificación de Domínguez-Borbor et al., (2020). En la microplacas de 96 pocillos se agregó 160 μl de LBb + 2% NaCl, a cada pocillo más 20 μl del EO a concentraciones desde 50 hasta 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 20 μl de suspensión bacteriana 2×10^8 CFU mL^{-1} . Se incluyó un control positivo (que contenía inóculo sin el EO) y un control negativo (que contenía EO pero no el inóculo de bacteria) en cada microplaca, además de seis réplicas para cada concentración de EO y controles. Las microplacas se incubaron a 28 °C durante 24 h. Los valores de MIC se determinaron como la dosis más baja a la que los pocillos no mostraron turbidez leyéndose en un lector de microplacas a 620 nm.

La inhibición de biopelículas se realizó mediante la técnica descrita por (Domínguez-Borbor et al., 2020b) se realizó suspensiones bacterianas 1×10^6 UFC mL^{-1} para cada cepa de *Vibrio*, transfiriéndose 20 μl de suspensión bacteriana a cada pocillo en una microplaca de 96 pocillos que contenía 180 μL de LBb 2% NaCl a diferentes concentraciones subletales (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) de cada Eo. Un control fue realizado con suspensión bacteriana + LBb + 2% NaCl sin EO, con seis repeticiones para cada concentración. Además, se incluyó un antibiótico comercial (oxitetraciclina) a una concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las placas se incubaron a 28 °C durante 36 h. Posteriormente se eliminaron las células planctónicas, y las biopelículas generadas se lavaron dos veces usando 200 μl de PBS a un pH de 7,2. Las biopelículas se secaron a 50 ° C durante 30 min y se tiñeron con 220 μL de 0.1% cristal violeta (CV) en cada pocillo durante 15 min. Luego se enjuagaron las placas para eliminar el exceso de tinte y se secaron a temperatura ambiente (26 °C). El CV impregnado se solubilizó con 220 μl de etanol, del producto solubilizado se transfirieron 150 μL de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos, leyéndose a una densidad óptica de 590 nm (OD590).

Los datos se transformaron en (%) formación de biopelículas considerando 100% de biomasa de biopelículas a la biopelículas bacterianas no tratadas (control negativo). El nivel de inhibición de biofilm se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [(OD \text{ Control} - OD \text{ Test}) / OD \text{ Control}] \times 100$$

Tabla 2.1 Resultados bibliográficos de los aceites esenciales usados comúnmente en acuicultura

Nombre común (EOs)	Nombre en latín de la planta	Bacterias Patógenas	Componentes activos	% De componentes	MIC (mg/ml)– Halo de inhibición (mm)	Disponibilidad Nacional del EO	Referencias
Orégano	Origanum vulgare	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Carvacrol Timoll y- Terpinene p-Cymene terpinen-4-ol	80 - 90% 40 - 70% 20 – 40% 20 – 30%	2 – 13.6 ± 0.60	Amplia disponibilidad	(Stefanakis et al., 2013)
		<i>Vibrio Splendidus</i>			125 – 11± 1.00		(Ekici et al., 2011)(Prudent et al., 1995)
		<i>Vibrio spp</i>			2		(Stefanakis et al., 2013)(Jouki et al., 2014)
		<i>Vibrio spp</i>			2 – 14.3±0.2		(Esencial et al., 2007)(Bharti et al., 2012)
		<i>Vibrio Cholerae</i>			2 – 11.1± 0.1		(Charai et al., 1996)
		<i>P. jessenii</i>			4.02 – 8.00± 1.00		(Stefanakis et al., 2013)
		<i>Vibrio Anguillarum</i>					(Stefanakis et al., 2014)

					- 16.0 ± 0.8	Amplia disponibilidad	
		<i>P. aeruginosa</i>			31.25 – 14.5±1.5		(Jouki et al., 2014)
		<i>Aer. veronii</i>			0.005 – 20.00±1.00		(Stefanakis et al., 2013)
		<i>P. agglomerans</i>			15.2 ± 0.6		(Sotomayor et al., 2019)
		<i>P. antártica</i>			12.50 – 12.33 ± 1.53		(Q. He et al., 2019)
	<i>Origanum Mojarana</i>	<i>P. veronii</i>			12.50 – 9.00 ± 1.00	Amplia disponibilidad	(Derwish et al., 2010)
		<i>P. Fluorescens</i>			12.50 – 13.00 ±1.00		(Ekici et al., 2011)
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>P. aeruginosa</i>			5.00 – 13.00 ±1.00		(Esencial et al., 2007)
		<i>V. campbellii</i>			8.00 -		(Domínguez-Borbor et al., 2020a)
		<i>V. harveyi</i>			7.00 -		
		<i>V. vulnificus</i>			9.00 -		
		<i>V. parahaemolyticus</i>			8.00 -		
Orégano mexicano	<i>Lippia Berlandieri</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Carvacrol Timoll γ- Terpinene p-Cymene terpinen-4-ol	80 - 90% 40 - 70% 20 – 40% 20 – 30%	3.125 – 8.00 ± 1.00	Amplia disponibilidad	(Stefanakis et al., 2013)
		<i>Vibrio vulnificus</i>			100 -		(Bharti et al., 2012) (Ekici et al., 2011) (Hajlaoui et al., 2016)
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			100 -		
		<i>Vibrio mimicus</i>			100 -		

	<i>Origanum Compactum</i>	<i>Vibrio Cholerae</i>			-14.00		(Russo et al., 1998)
			Carvacrol Carvacrol p-Cymene	60 – 80% 30 – 70% 20 – 70%			(Ekici et al., 2011) (Pintore et al., 2002) (Hajlaoui et al., 2016) (Stefanakis et al., 2014) (Mayaud et al., 2008) (Esencial et al., 2007) (Charai et al., 1996) (Kačániová et al., 2017)
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>P. agglomerans</i>	Carvacrol	10 – 70%	6.25 – 9.67 ± 1.53	Amplia disponibilidad	(Kačániová et al., 2017)
							(McGimpsey et al., 1994)
		<i>P. lundesis</i>	Timoll	2 – 11%	12.50 – 7.67± 0.58		(Kačániová et al., 2017)
		<i>P. korensis</i>	y- Terpinene	50 – 70%	12.50 – 8.00 ± 1.00		(Jouki et al., 2014)
		<i>Vibrio Vulnificus</i>	p-Cymene	2 – 31%	12.50 – 23.00 ± 0.10		(Hajlaoui et al., 2016)
		<i>Vibrio Cholerae</i>	terpinen-4-ol		12.50 – 16.00 ± 0.10		(Jouki et al., 2014) (Ozogul et al., 2020)
	<i>Thymus Satureiodies</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	Carvacrol	10 – 56%	1.56 – 21.08 ± 0.10		(Ozogul et al., 2020)

		<i>P. aeruginosa</i>	Carvacrol p-Cymene	10 – 60%	0.001 – 16.00 ± 0.10		(Ozogul et al., 2020) (Cosentino et al., 1999) (Kačániová et al., 2017) (Bharti et al., 2012)
	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>V. campbellii</i>			1.90 –		(Domínguez-Borbor et al., 2020a)
		<i>V. harveyi</i>			2.00 –		
		<i>V. vulnificus</i>			1.80 –		
		<i>V. parahaemolyticus</i>			1.50 –		(Snoussi et al., 2008)
		<i>V. alginolyticus</i>	Carvacrol	60.27%	0.078 - 13.33 ± 0.57		
		<i>V. parahaemolyticus</i>	γ-terpinene	11.20%	0.156 - 14.66 ± 0.57		
		<i>V. vulnificus</i>	P-cymene	7.58%	0.156 - 12.66 ± 0.57		
		<i>V. fluvialis</i>	Bornyl acetate	4.93%	0.156 - 13 ± 1		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	P-cymene	18.08%	1.56 – 28.33 ± 0.58		(Miladi et al., 2013)
		<i>V. alginolyticus</i>	γ-terpinene	13.12%	3.12 - 32 ± 1		
		<i>Eschericia Coli</i>	Timol	41.33%	1.56 - 29 ± 0		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	p-Cymene-3-ol	5.24%	1.56 - 24 ± 0		
			β-caryophyllene	5.05%			
						Amplia disponibilidad	

Canela	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	<i>P. brassicacearum</i>	cinnamaldehyde		3.125 – 15.00 ± 2.00	Amplia disponibilidad	(Kačániová et al., 2017)
		<i>P. proteolítica</i>	trans-cinnamaldehyde		3.125 – 13.33 ± 1.15		
		<i>P. mandelii</i>	cinnamaldehyde		-27.3		(Mayaud et al., 2008)
	Leaf” <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Eugenol	82–85%	6.25 – 12.67 ± 1.15		(Ooi et al., 2006) (Lambert et al., 2001) (Starliper et al., 2015)
	<i>cinnamomum cassia</i>	<i>Vibrio Cholerae</i>			6.00 -		(Chang et al., 2001)
		<i>Vibrio Cholerae</i>			0.15 -		
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			-21.7 ± 1.3		
		<i>Aer. Veronii</i>			-22.3 ± 0.6		
	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	<i>P. jessenii</i>			0.075 -		
		<i>P. aeruginosa</i>			0.3 -		
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			0.25 -		
		<i>P. aeruginosa</i>			0.25 -		
	<i>Cinnamomum verum</i>	<i>V. campbellii</i>			1.00 -		(Domínguez-Borbor et al., 2020a)
		<i>V. harveyi</i>	Eugenol	82–85%	0.90 -		
		<i>V. vulnificus</i>			1.00 -		
		<i>V. parahaemolyticus</i>			1.50 -		

Clavo de olor	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Eugenol	90%	15 – 17.8	Baja disponibilidad	(Abdelkhalek et al., 2020)
		<i>S.aureus</i>			15 – 22.9		(Q. He et al., 2019)
		<i>Aer. Veronii</i>			-12.4 ± 1.2		(Huang et al., 2017)
		<i>P. jessenii</i>			-8.4 ± 2.1		
		<i>F. Columnare</i>	Eugenol	68%	- 20 ± 1.0		
		<i>Vibrio spp</i>			0.015 –		(Lee et al., 2009)
		<i>Aeromonas hydrophila</i>			0.015 –		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			0.015 –		
		<i>S. aureus</i>			0.015 –		
		<i>P. aeruginosa</i>			10.00-14.66		(Chaieb et al., 2007)
		<i>Aeromonas salmonicida</i>			10.00-9.00		(Starliper et al., 2015)
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Eugenol	50%	0.15 – 11.33 ± 0,57		(Hajlaoui et al., 2010)
		<i>V. parahaemolyticus</i>			0.156 – 13.66 ± 0,57		
		<i>V. vulnificus</i>			0.156 - 11.66 ± 0.57		
		<i>V. fluvialis</i>			0.156 - 10 ± 0		
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>P. brassicacearum</i>	Eugenol	80%	-29.3		(Kačániová et al., 2017)
		<i>Salmonella enteritidis</i>	1,4-Cineole	21% - 12%	50.0 – 12.33 ± 1.53		
			a-Pinene	15%	2560 –		

		<i>Salmonella enteritidis</i>	p-Cymene	44%	-10.00	Baja disponibilidad	(Ivanovic et al., 2012)
			linalool	21%			(Snoussi et al., 2008)
			1,8-Cineol	43.49%			
		<i>V. alginolyticus</i>	α -pinemo	13.45%	$0.31 - 7 \pm 0$		
		<i>V. parahaemolyticus</i>	camphrene	8.95%	$0.625 - 9.33 \pm 0.57$		
		<i>V. vulnificus</i>	canfeno	5.86%	$0.156 - 14 \pm 0$		
		<i>V. fluvialis</i>	borneol	60.14%	$0.156 - 12 \pm 1$		
			Acetato de borilo	4.13%			(Miladi et al., 2013)
		<i>Staphylococcus aureus</i>	α -pinemo	19.49%	$12.5 - 12 \pm 1$		
		<i>V. alginolyticus</i>	Camphene	8.65%	$25.00 - 26.33 \pm 0.58$		
		<i>Eschericia Coli</i>	1,8-cineole	24.10%	$25.00 - 17 \pm 0$		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	Alcanfor	19.87%	$50.0 - 11 \pm 1$		
			p-cinemo	3.79%			
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>P. damselae</i>	α -Thujone	33.55%	>2560 –		(Ivanovic et al., 2012)
		<i>P. luteola</i>	Camphor	20.81%	-12.7		
		<i>V. vulnificus</i>	Manool	21%	-19.00		(Yazgan, 2020)
		<i>S. aureus</i>	viridiflorol	17%	$25.0 - 12.75$		
		<i>Staphylococcus sp</i>			$6.25 - 12.00$		

Sage	Salvia officinalis L.	Streptococcus pyogenes	eucalyptol	14%	10.5 –	Baja disponibilidad	
		S. aureus	inalool	42.3%	7.00 –		(Starliper et al., 2015)
					6.00 –		(Kuřma et al., 2009; Mahboubi, 2020)
			acetato de linalilo	57.9% 12.4%	0.5 –		(Wijesundara & Rupasinghe, 2018) (Císarová et al., 2018)
		Aeromonas salmonicida	linalilo linalol	75.7%	0.5 –		
		Staphylococcus aureus	Eugenol	12.0%	96.05 –		
		Staphylococcus spp.	eucalyptol	14%			
			Pseudomonas orientalis	thujone	80%		
	Staphylococcus aureus			0.125 – 44.7		(Xiao et al., 2020)	
Lemongrass	Cymbopogon citratus	Pseudomonas aeruginosa	citral	80%	2.2 – 8.00		(Xiao et al., 2020)
				31%	65.1 – 18.00		(Patterson et al., 2019)
			Citral	67%			
		Staphylococcus aureus	Geranial	39.2%	2.00 –29.00		(Majewska et al., 2019)
		V. campbellii					

Lemongrass	Cymbopogon citratus		Geranial	48.14%	1.50 -	Baja disponibilidad	(Domínguez-Borbor et al., 2020a)
		<i>V. harveyi</i>			1.00 -		
		<i>V. vulnificus</i>			2.00 -		
		<i>V. parahaemolyticus</i>			1.40 -		
		<i>Enterococcus faecalis</i>	Myrcene	11%	1.00 – 34 ± 1.3		(Bassolé et al., 2011)
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Neral	34.6%	2.5 – 24.3 ± 0.4		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	Geranial	48.1%	2.5 – 31.7 ± 0.4		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Geraniol	1.9%	8.3 – 29.3 ± 0.9		
		<i>Eschericia Coli</i>	Z – Citral	32.93%	10.00 – 9.93 ± 0.5		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	E – Citral	37.85%	8.00 – 8.87 ± 0.5		(Nyoman Semadi Antara, Dwi Ayu Kirani Paramita, Anak Agung Duwipayana, 2016)
		<i>Vibrio Cholera</i>	3 - Carene	3.82 %	6.00 – 13.67 ± 5.7		
		<i>V. alginolyticus</i>	Citral		0.125 -		(H. Liu et al., 2020)
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Isotimol	59.42%	20.66 ± 0.28		(Partovi et al., 2019)
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Timol	15.23%	19.33 ± 0.76		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	Trans-cariofileno	10.18%	20,16 ± 0,57		
		<i>Eschericia Coli</i>	Cimeno	5.82%	20.16 ± 0.28		

2.4. Comparación de los aceites esenciales con la mayor actividad antimicrobiana

Para la selección del aceite esencial con mayor potencial efecto antimicrobiano se realizó la comparación de sus resultados bibliográficos considerando los criterios establecidos. Para esto, se dio un porcentaje de importancia con una valoración del 1 al 10, es decir, la valoración 10 como mayor puntaje se refiere a tener el mayor halo de inhibición, mayor concentración mínima inhibitoria, mayor porcentaje de compuestos microbianos, mayor efecto en amplio espectro de bacterias gram(-) específicamente del género *vibrio* y mayor disponibilidad nacional. Para la concentración mínima inhibitoria una valoración de 10 significa que se requiere de altas concentraciones para la mitigación de las bacterias patógenas por lo que para éste criterio se recomienda bajas puntuaciones.

La asignación de la valoración se realizará mediante los mayores resultados observados en el análisis bibliográfico de los Eos. Los Eos con halos de inhibición entre 17 a 20 mm se consideraron con la mayor puntuación. Inferior a esto la puntuación será menor. Los Eos con concentración mínima inhibitoria de 0.10 a 50 mg/ml se consideraron con una puntuación de 5. Superior a esto se asignó la mayor puntuación. Para el porcentaje de los principales componentes de los Eos se evaluó con la mayor puntuación si poseen los componentes principales antimicrobianos según la bibliografía. Para los compuestos que el análisis bibliográfico no los reconoce como compuestos antimicrobianos se colocó una puntuación de 5. En el criterio de amplio espectro de bacterias se consideró una puntuación de 10 a los Eos que afectan principalmente al género *Vibrio* mientras que los Eos que no han demostrado suficientes resultados positivos contra este género se consideraron con puntuaciones menores. Finalmente, para una alta disponibilidad nacional de los EOs se calificó con la mayor puntuación. Para los que se obtuvo una escasa disponibilidad se consideró una calificación de 5 y para los de nula disponibilidad una puntuación de 0.

Los porcentajes de importancia se asignarán garantizando el efecto antimicrobiano del aceite esencial seleccionado, es por eso que los criterios de porcentaje de compuestos activos antimicrobianos y amplio espectro de bacterias tienen el mayor porcentaje, ya que son los principales aspectos que aseguran el efecto buscado. Seguido a estos

criterios, la disponibilidad también tiene un mayor porcentaje de importancia con el fin de evitar gastos en importaciones del producto lo que puede elevar costos de producción en la desinfección de Artemia. Por último los criterios de halo de inhibición y concentración mínima inhibitoria tienen el menor porcentaje por lo que al tener los mayores o el mayor compuesto antimicrobiano éstos tendrán excelentes resultados.

- Halo de inhibición de la técnica de disco de difusión (H.I) (10%)
- Concentración mínima inhibitoria (MIC) (10%)
- Porcentaje de compuestos activos antimicrobianos (%C.A) (30%)
- Amplio espectro de bacterias (A.M) (30%)
- Disponibilidad del EOs (DEOs) (20%)

Tabla 2.2 Comparación de los diferentes EOs con respecto a los criterios establecidos

Criterios	% P.O.	Calificación de los Eos							Valor ponderado de los Eos						
		EO O	EOT	EO C	EOC O	EO R	EOS	EOHL	EO O	EOT	EO C	EOC O	EO R	EOS	EOHL
H.I	10	10	9	9	7	8	7	6	1	0.9	0.9	0.7	0.8	0.7	0.6
MIC	10	5	5	5	5	5	5	5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
% C.A	30	10	10	10	10	5	5	5	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5
A.E	30	10	10	8	8	6	5	5	3	3	2.4	2.4	1.8	1.5	1.5
DEOs	20	10	10	10	5	5	0	5	2	2	2	1	1	0	1
Total	100	45	44	42	35	29	22	26	9.5	9.4	8.8	7.6	5.6	4.2	5.1

Po: Ponderación. **EOO:** Aceite esencial de orégano. **EOT:** Aceite esencial de tomillo. **EOC:** Aceite esencial de canela **EOCO:** Aceite esencial de clavo de olor. **EOR:** Aceite esencial de Romero. **EOS:** Aceite esencial de savia. **EOHL:** Aceite esencial de hierba luisa.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADO Y ANÁLISIS

3.1. Comportamiento bacteriano de bacterias del género *Vibrio* en *Artemias*.

La modulación del comportamiento bacteriano se realizó satisfactoriamente en el laboratorio de bioactividad en el CENAIM-ESPOL. Una vez realizada la decapsulación con los productos químicos comúnmente usados como es cloro y el hipoclorito de sodio se procedió a mantener las condiciones de luz, salinidad, y aireación para la eclosión de los cistos de *Artemias*. Se procedió a recolectar muestras del medio de eclosión junto con los cistos cada 4 horas durante 24 h, realizando el análisis microbiológico en cada toma de muestra. Los resultados mostraron una concentración final de vibrios de 4.49×10^6 UFC dentro de las 24 horas posterior a la decapsulación de cistos de *Artemias* como se muestra en el gráfico 10.

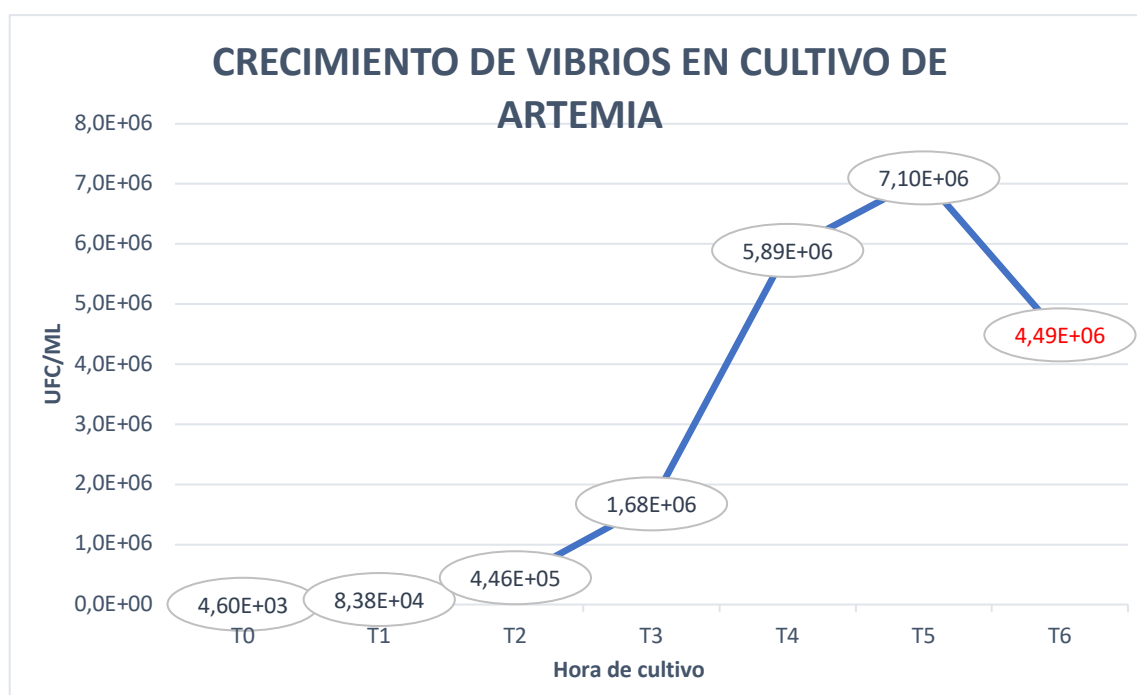


Gráfico 3.1 Crecimiento de vibrios en 24 h post decapsulación de cistos de *Artemias*.

3.2. Análisis y selección de EOs

Los Eos con una mayor actividad antimicrobiana que reporta la literatura fueron, aceite esencial de orégano (EOO), aceite esencial de tomillo (EOT), aceite esencial de canela

(EOC), aceite esencial clavo de olor (EOCO), aceite esencial de romero (EOR), aceite esencial de savia (EOS) y aceite esencial de hierba luisa (EOHL). Destacando los principales compuestos antimicrobianos, carvacrol, timol, cinamaldehído y eugenol y otros componentes secundarios, p-cymene, 1,8-cineol, geranial y citral. Donde varios autores han demostrado una marcada actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas del medio acuático. De acuerdo a nuestro análisis los Eos de orégano, tomillo y canela son los EOs más promisorios como se muestra en la tabla 3, y que podrían ser usados para la desinfección de *Artemias*, debido a que cumplen con el mayor porcentaje de componentes activos como es el cavacrol, timol y cinamaldeído, cuyos están ampliamente descritos como compuestos antimicrobianos. Además, se registró que poseen una excelente capacidad de inhibición para el género *Vibrio*, así mismo para lograr el efecto antimicrobiano se requieren de concentraciones bajas. Además, de que se tiene una alta disponibilidad nacional de éstos Eos evitando costos de importación y por ende encareciendo los costos en la desinfección de *Artemias*.

Tabla 3.1 Calificación de los EOs con respecto a los criterios establecidos.

Criterios	Ponderación	Calificación de los Eos						
		EOO	EOT	EOC	EOCO	EOR	EOS	EOHL
H.I	10	1	0.9	0.9	0.7	0.8	0.7	0.6
MIC	10	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
% C.A	30	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5
A.E	30	3	3	2.4	2.4	1.8	1.5	1.5
DEOs	20	2	2	2	1	1	0	1
Total	100%	9.5	9.4	8.8	7.6	5.6	4.2	5.1

H.I: Halo de inhibición, MIC: Concentración mínima inhibitoria, %C.A: Porcentaje de compuestos activos, A.E: Amplio espectro de bacterias gram (-), DEOs: Disponibilidad nacional de los Eos.

3.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de los EOs seleccionados.

De acuerdo a los resultados bibliográficos, la actividad antimicrobiana evaluada por el método de disco de difusión muestran que el promedio de halo de inhibición frente a bacterias gram (-) por parte del EO del orégano, tomillo y canela están entre 10 – 20 mm. Mientras que el MIC se ha registrado a concentraciones entre 0.10 -<30 mg /ml tanto para el EO de orégano, tomillo y canela. Por otra parte, la formación de biopelículas puede ser afectada por los EO de orégano, tomillo y canela, entre el 80 – 85%, en

concentraciones de 15 – 20 µg/ml. Así mismo, se han demostrado que la citotoxicidad en *Artemias* del EO del orégano esta entre 5 – 10 µg/ml después de haber sido expuesto de 24 a 48 h en larvas de camarones, mientras que para el EO de tomillo y canela se registra el 100% de mortalidad en *Artemias* luego de ser expuestas a 100 µg/ml en un rango de 24 a 48 h.

3.4. Protocolo de aplicación para la desinfección de cistos de *Artemias*

- La aplicación de los aceites esenciales será suministrado después de la decapsulación de los cistos de *Artemias* mediante los productos químicos comúnmente usado como formalina, hipoclorito de sodio (NaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), permanganato de potasio (KMnO₄) o sulfato de cobre (CuSO₄)



Gráfico 3.2 Decapsulación de cistos de *Artemias* con productos químicos.

- La primera dosis de los EOs de orégano, tomillo o canela se colocarán a una concentración de 10 ppm.



Gráfico 3.3 Tanque despues de la decapsulación para suministrar 10 ppm de Eo de orégano.

- Debido a la volatilización de los EOs por efecto de la temperatura y la fuerte aireación, asumimos, que hay una pérdida del 50% de la dosis suministrada, y con la finalidad de recompensar esa pérdida se aplicó dos dosis a concentraciones de 5 ppm cada 8 horas. Además el EO es aplicado en una forma emulsificada para mejorar la actividad biológica antimicrobiana y evitar aún más la volatilización de los compuestos.

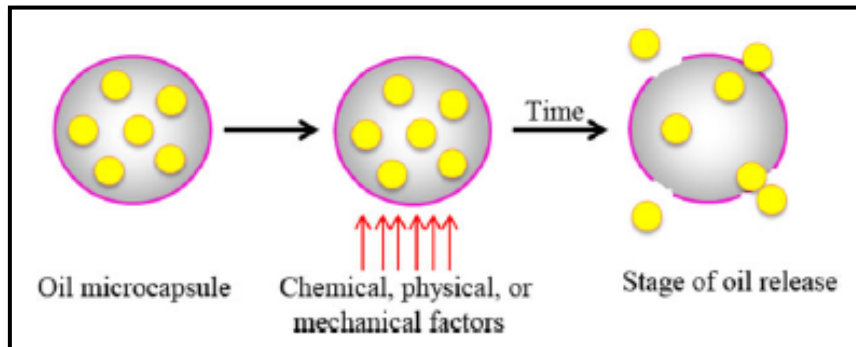


Gráfico 3.4 Composición emulsificada del Eo de orégano.

- Finalizando la cosecha de los nauplios de artemias, se realizó un baño de agua filtrada por UV, garantizando la eliminación de propiedades organolépticas de los EOs y eliminando los vibrios planctónicos.



Gráfico 3.5 Enjuague de los nauplios de Artemia con agua filtrada por UV.

3.5. Análisis de costos para la aplicación de aceites esenciales

Para obtener un estimado de costos en la desinfección, en primer lugar realizamos un análisis de gastos en la desinfección de 1 libra y 4.5 libras de cistos de *Artemias* como se muestra en la tabla 4 teniendo un costo total de \$33.00 y \$150 respectivamente.

Posteriormente se realizó una cotización de los Eo de orégano, tomillo y canela a diferentes volúmenes y concentraciones como se muestra en la tabla 5 a precios de venta y distribución. Para el análisis de costos de desinfección de *Artemias* usando EOs realizamos una decapsulación de 454 gramos de cistos para un tanque de 227 L, ya que la densidad de siembra de *Artemia* es de 2g L⁻¹. El Eo de orégano al 30% fue suministrado después de la decapsulación como la primera dosis a una concentración de 10 ppm, luego de cada 8 horas se aplicó a concentraciones de 5 ppm, resultando con una concentración total de 20 ppm en 24 h, evitando así, la proliferación de *vibrios* y formación de biopelículas.

Tabla 3.2 Costos de productos químicos comúnmente usado en la decapsulación y desinfección de cistos de Artemia

Productos químicos	Dosificación	\$/L - kg	Cistos Artemias (Lb)	Total de compuesto	Costo total
Cloro (10%)	5 ml/ g	\$1.10	1	2.2 L	\$2.42
Hidroxido de sodio	0.7 /g	\$7.00	1	318 g	\$2.23
Formaldehído	10 ml /L	\$15.00	1	2.2 L	\$33.00
Hidroxido de sodio	0.7 /g	\$7.00	4.5	1.4 kg	\$9.80
Cloro (10%)	5 ml/ g	\$1.10	4.5	10 L	\$11.00
Formaldehído	10 ml /L	\$15.00	4.5	10 L	\$150.00

Tabla 3.3 Precios de Eos a diferentes volúmenes con sus respectivas concentraciones.

Aceite esencial	Volumen (mL)	% Pureza	Valor
Orégano	300	30	\$35.00
Canela	15	100	\$38.92
Tomillo	15	100	\$51.21

El volumen total usado del Eo de orégano al 30% para la desinfección de 454 gramos de cistos de *Artemias* se obtuvo mediante la fórmula:

$$X = \frac{VI \times Co}{PEo}$$

VI= volumen total del tanque de *Artemias*

Co= Concentraciones del Eo suministrado

PEo= % de pureza del Eo (debe de estar en ppm.)

$$X = \frac{227 \text{ l} \times 20 \text{ ppm}}{300.000 \text{ ppm}} = 15 \text{ mL}$$

Para la desinfección de 454 gramos de *Artemias* se requieren 15 ml de Eo de orégano al 30% en forma emulsificado en un volumen de 227 L, ya que la desinfección es respecto al volumen de agua. Con los 300 mL de Eo de orégano se realizan 20 desinfecciones. Siguiendo las mismas indicaciones de la fórmula, para un volumen de 1000 L, se necesitarían 66 mL de Eo de orégano al 30% desinfectando 2000 gramos de cistos de *Artemias*, es decir, 4.4 Lb de *Artemias* aplicando 4 veces el Eo de orégano. De esta manera se garantiza la interrupción de biopelículas de vibrios y por ende evitando su propagación.

Los costos totales para la desinfección de los cistos va a depender de la concentración de los EOs ya que los costos estan en relación con su pureza como se muestra en la tabla 6, el EO de orégano al 30% para desinfectar 4.5 Lb de cistos de *Artemias* tiene un costo de \$7.70 teniendo un ahorro del 95% en los costos de desinfección, mientras que con el EO de canela al 100% tiene un costo de \$51.89 para la misma cantidad de cistos de *Artemias* mostrando un ahorro de 65% con respecto al costo del formaldehído que es el compuesto comúnmente usado para desinfección. Así mismo para el tomillo se tuvo un gasto de \$68.28 para la desinfección de 4.5 Lb de cistos de *Artemias* en un volumen de 1000 L con un ahorro del 55% en los costos de desinfección.

Tabla 3.4 Costos de cloro y EOs para 1 Lb y 4.5 Lb de cistos de *Artemias*.

Productos de desinfección	Dosificación	Cistos <i>Artemias</i> (Lb)	Costo total
Formaldehído	10 ml/L	1	\$33.00
Formaldehído	10 ml/L	4.5	\$150.00
Orégano (30%)	20 mg/L	1	\$1.75
Orégano (30%)	20 mg/L	4.5	\$7.70
Canela	20 mg/L	1	\$11.78
Canela	20 mg/L	4.5	\$51.89
Tomillo	20 mg/L	1	\$15.50
Tomillo	20 mg/L	4.5	\$68.28

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los vibrios son dominante en el cultivo de *Artemia*, mediante nuestro estudio demostramos que los vibrios pueden alcanzar altas concentraciones en solo 24h, convirtiendo a las *Artemias* en vectores de procesos infecciosos para estadios larvales de peces y crustáceos. Los compuestos bioactivos timol, carvacrol y cinamaldehído encontrados en los Eos de orégano, tomillo y canela demostraron ser alternativas eficientes para la desinfección de cistos de *Artemias* a una concentración de 20 ppm, disminuyendo la concentración de vibrios e inhibiendo la formación de biopelículas en un 80%. Por otro lado, la toxicidad de los aceites esenciales de orégano, tomillo y canela se encuentra en un rango de 20 - 100 ppm después de 24 a 48 horas de exposición a larvas de camarón *P. Vannamei*.

La aplicación de los Eo como desinfectantes en *Artemias* muestran un ahorro mayor a 55% con respecto al formaldehído como principal compuesto de desinfección en *Artemias*, lo que se verá reflejado en el aumento de la supervivencia de la especie cultivada, puesto que se evita que las *Artemias* como alimento vivo sean un vector de contaminación por vibrios. Por lo tanto, la eficiencia de la aplicación de los Eos como desinfectantes para los cistos de *Artemias* esta en relación al porcentaje de concentración de los compuestos y en la forma de administración, ya que mediante la emulsificación se han obtenido resultados positivos, además de que evita la rápida volatilización de los compuestos a causa de la temperatura y la fuerte aireación en los estanques de *Artemias*.

En consecuencia, consideramos que los aceites esenciales pueden ser usado como alternativa de mitigación y control de bacterias patógenas en la producción de especies acuáticas, ya que evitan la transferencia de plásmido de resistencia bacteriana evitando enfermedades emergentes y re-emergentes en los sistemas acuícolas. Además, se ha evidenciado su baja toxicidad hacia el consumo humano por su alta volatilización y especificidad de sus compuestos. Se recomienda, la investigación de los porcentajes adecuados de los compuestos activos de los Eos seleccionados a fin de bajar los costos de desinfección sin afectar la eficiencia en la disminución de vibrios en las *Artemias*. Así

mismo se debe estudiar el efecto de los Eos seleccionados en la fisiología de los estadios iniciales de la especie en cultivo ya que se ha evidenciado que los compuestos seleccionados tienen actividad inmunoestimulante, antioxidante, antiéstress y pueden mejorar la salud e incrementar el aprovechamiento del alimento consumido.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkhalek, N. K., Risha, E., El-Adl, M. A., Salama, M. F., & Dawood, M. A. O. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of clove oil against *Streptococcus iniae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect on hepatic hepcidin expression. *Fish and Shellfish Immunology*, 104, 478–488.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.064>
- Abel, A., Caballero, M., Valencia, D., & Caballero, A. M. (2018). *Optimización del cultivo y de métodos de enriquecimiento en nauplios de Artemia franciscana Kellogg , 1906 , como alimento vivo en acuicultura.*
- Acuicultura, I. D. E., La, T., & Csic, S. A. L. (2018). *Artemia (A . franciscana) como alimento vivo o congelado para acuariofilia Estudio de viabilidad de la producción de biomasa adulta de Artemia (A . franciscana) como alimento vivo o congelado para acuariofilia.* 1–57.
- Ahmed, A. F., Attia, F. A. K., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 299–305.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004>
- Ahmed, H. A., El Bayomi, R. M., Hussein, M. A., Khedr, M. H. E., Abo Remela, E. M., & El-Ashram, A. M. M. (2018). Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 274(November 2017), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.013>
- Aleksic Sabo, V., & Knezevic, P. (2019). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Industrial Crops and Products*, 132(November 2018), 413–429.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.051>
- Alibi, S., Ben Selma, W., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., Navas, J., & Ben Mansour, H. (2020). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, 68(2), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.01.001>
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., & Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: A significant threat in aquaculture.

- Process Biochemistry*, 94, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.029>
- Austin, B., & Allen, A. (1982). Microbiology of laboratory-hatched. *Elsevier Scientific*, 26.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L. C., Ilboudo, A. J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C., & Dicko, M. H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18(12), 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., & Karadoğan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15(3), 169–172. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00028-8)
- Beardmore, J. A., Clegg, J. S., & Sorgeloos, P. (2002). *A R T E M I A : B a s i c a n d A p p l i e d B i o l o g y*. 1–36.
- Benediktsdóttir, E., Verdonck, L., Spröer, C., Helgason, S., & Swings, J. (2000). Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: A proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 479–488. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-479>
- Bharti, P., Bai, S., Seasotiya, L., Malik, A., & Dalal, S. (2012). Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of ten aromatic plants against selected bacteria. *International Journal of Drug Development and Research*, 4(4), 342–351.
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- Boonchuen, P., Jaree, P., Tassanakajon, A., & Somboonwiwat, K. (2018). Hemocyanin

- of *Litopenaeus vannamei* agglutinates *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VPAHPND) and neutralizes its toxin. *Developmental and Comparative Immunology*, 84, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.03.010>
- Callol, A., Pajuelo, D., Ebbesson, L., Teles, M., MacKenzie, S., & Amaro, C. (2015). Early steps in the European eel (*Anguilla anguilla*)-*Vibrio vulnificus* interaction in the gills: Role of the RtxA13 toxin. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(2), 502–509. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.009>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Camara, M. R. (2020). After the gold rush: A review of *Artemia* cyst production in northeastern Brazil. *Aquaculture Reports*, 17(November 2019), 100359. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100359>
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. Ben, Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. In *Phytotherapy Research* (Vol. 21, Issue 6, pp. 501–506). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>
- Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00273-2)
- Charai, M., Mosaddak, M., & Faid, M. (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. Compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, 8(6), 657–664. <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9701036>
- Cíсарová, M., ürgeová, E., Hleba, L., Charousová, I., Božík, M., Klouček, P., & Maliar, T. (2018). Inhibition effects of some antimicrobial agents from *Salvia officinalis* L. on the growth of selected gram-negative and gram-positive bacterial strains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(3), 960–964. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018-19.8.3.960-964>
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613–640.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130–135. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x>
- Daniel, E., Rivarola, B., & Nacional, C. (2011). Manual básico de sanidad piscicola 1. *FAO*.
- De FreitasSouza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., & Mancera, J. M. (2019). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. *Frontiers in Physiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- Defoirdt, T. (2014). Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6(2), 100–114. <https://doi.org/10.1111/raq.12030>
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00734-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00734-6)
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A. G., Barba, F. J., & Williams, L. L. (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.004>
- Derwish, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A., & Taouil, R. (2010). phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of EOs of *O. vulgare* from Morocco. In *American-Eurasian Journal of scientific Research* (Vol. 5, Issue 2, pp. 120–129).
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.157>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J.

- (2020a). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529(June), 735639.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020b). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Dong, H. T., Taengphu, S., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Phiwsaiya, K., Sornwatana, T., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., & Senapin, S. (2017). Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. *Aquaculture*, 473, 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.005>
- Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Giovanelli, S., Rocchigiani, G., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2016). Antibacterial and antifungal activity of essential oils against some pathogenic bacteria and yeasts shed from poultry. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(4), 302–309. <https://doi.org/10.1002/ffj.3318>
- Ekici, S., Diler, Ö., Didinen, B. I., & Kubilay, A. (2011). Antibacterial activity of essential oils from medicinal plants againsts bacterial fish pathogens. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 17(SUPPL. A). <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.3224>
- El, S., Zerifi, A., Kasrati, A., Mahdi, E., Tazart, Z., El, F., Abbad, A., Oudra, B., Campos, A., & Vasconcelos, V. (2020). Industrial Crops & Products Essential oils from Moroccan plants as promising ecofriendly tools to control toxic cyanobacteria blooms. *Industrial Crops & Products*, 143(October 2019), 111922.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111922>
- Elmahdi, S., DaSilva, L. V., & Parveen, S. (2016). Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 57, 128–134. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2016.02.008>
- Esencial, A., Cinco, S., Del, E., & Vibrio, G. (2007). *Efecto antimicrobiano del orégano mexicano* (. 30(01), 261–267.
- Ezzat Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Zorriezhahra, J., & Adel, M. (2016). Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 365–382.

- <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1153002>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. <https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO>
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34(9), 643–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Friedman, M. (2017). Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10406–10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>
- Fundación para la Innovación Agraria. (2009). *Resultados y Lecciones en Producción del Crustáceo Artemia en Salinas*. https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75615_archivo_01.pdf
- Galvão, L. C. de C., Furletti, V. F., Bersan, S. M. F., da Cunha, M. G., Ruiz, A. L. T. G., Carvalho, J. E. de, Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., Figueira, G. M., Teixeira Duarte, M. C., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2012). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 751435. <https://doi.org/10.1155/2012/751435>
- Giarma, E., Amanetidou, E., Toufexi, A., & Touraki, M. (2017). Defense systems in developing *Artemia franciscana* nauplii and their modulation by probiotic bacteria offer protection against a *Vibrio anguillarum* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 66, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.008>
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M. A., Abreu-Grobois, F. A., & Roque, A. (1998). Bioencapsulation of Two Different *Vibrio* Species in Nauplii of the Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 6).
- Grotkjær, T., Bentzon-Tilia, M., D'Alvise, P., Dierckens, K., Bossier, P., & Gram, L. (2016). *Phaeobacter inhibens* as probiotic bacteria in non-axenic *Artemia* and algae cultures. *Aquaculture*, 462, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.001>
- H. A. Peredo, Luna, E. Palou, A. L. (2009). *Aceites esenciales - Metodos de extracción*

- (pp. 24–32). 2009.
- Haché, R., & Plante, S. (2011). The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain) and *Artemia* (*Artemia salina* strain Franciscana). *Aquaculture*, 311(1–4), 201–208.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.034>
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.003>
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., & Ksouri, R. (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil : A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2186–2192. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.044>
- He, Q., Gong, B., He, J., & Xiao, K. (2019). A novel superchilling storage-ice glazing (SS-IG) approach using anti-oxidative and antimicrobial essential oil (EO) for freshness-keeping of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 500, 243–249.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.022>
- 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 and Shellfish Immunology*, 70, 164–173.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- Hernández-Contreras, Á., & Hernández, M. D. (2020). Application of aromatic plants and their extracts in aquaculture. In *Feed Additives*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814700-9.00014-5>
- Høj, L., Bourne, D. G., & Hall, M. R. (2009). Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture*, 293(3–4), 278–285.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.024>
- Huang, Z., Liu, X., Jia, S., & Luo, Y. (2017). Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. *Food Control*, 82, 316–324.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.017>

- Hultgren, S. J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., Geme, J. W. S., & Normark, S. (1993). Pilus and nonpilus bacterial adhesins: Assembly and function in cell recognition. *Cell*, 73(5), 887–901. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90269-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90269-V)
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Interaminense, J. A., Ferreira Calazans, N., do Valle, B. C., Lyra Vogeley, J., Peixoto, S., Soares, R., & Lima Filho, J. V. (2014). *Vibrio* spp. control at brine shrimp, artemia, hatching and enrichment. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 65–74. <https://doi.org/10.1111/jwas.12096>
- Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I., & Ristic, M. (2012). In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*, 25(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.019>
- Jo, S. B., Shin, C. H., Shin, Y. J., Kim, P. H., Park, J. il, Kim, M., Park, B., & So, J. S. (2020). Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111246. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111246>
- Jouki, M., Yazdia, F. T., Mortazavia, S. A., Koocheki, A., & Khazaei, N. (2014). Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.001>
- Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S., Klůga, A., Tokár, M., Kluz, M., & Ivanišová, E. (2017). The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8), 1108–1116. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.005>
- Kandathil Radhakrishnan, D., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., & Thazhakot Vasunambesan, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
- Kumar, A., Singh, P., Gupta, V., & Prakash, B. (2020). Application of nanotechnology to boost the functional and preservative properties of essential oils. In *Functional and*

- Preservative Properties of Phytochemicals*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818593-3.00008-7>
- Kuźma, Ł., Kalembe, D., Różalski, M., Różalska, B., Więckowska-Szakiel, M., Krajewska, U., & Wysokińska, H. (2009). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from *Salvia sclarea* Plants Regenerated in vitro. *Molecules*, 14(4), 1438–1447. <https://doi.org/10.3390/molecules14041438>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lavens, P., & Thongrod, S. Sorgeloos, P. (2000). Larval prawn feeds and dietary importance of *Artemia*. *Freshwater Prawn Culture*, 91–111.
- Lee, S., Najiah, M., Wendy, W., & Nadirah, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China*, 3(3), 332–336. <https://doi.org/10.1007/s11703-009-0052-8>
- Leng, F., Lin, S., Wu, W., Zhang, J., Song, J., & Zhong, M. (2019). Epidemiology, pathogenetic mechanism, clinical characteristics, and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: a case report and literature review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03629-5>
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1–4), 201–220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)
- Lin, P. C., Lee, J. J., & Chang, I. J. (2016). Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.12.006>
- 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(August 2019), 734578. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734578>
- Liu, L., Xiao, J., Zhang, M., Zhu, W., Xia, X., Dai, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 156–164.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>

- Luis, A. I. S., Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., & Fraceto, L. F. (2019). Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 119–132. <https://doi.org/10.1111/raq.12229>
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Mahboubi, M. (2020). Clary sage essential oil and its biological activities. In *Advances in Traditional Medicine* (pp. 1–12). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00420-x>
- Majewska, E., Kozłowska, M., Gruczynska-Sekowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 327–341. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113152>
- Marudhupandi, T., Kumar, T. T. A., Prakash, S., Balamurugan, J., & Dhayanithi, N. B. (2017). *Vibrio parahaemolyticus* a causative bacterium for tail rot disease in ornamental fish, *Amphiprion sebae*. *Aquaculture Reports*, 8(September), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.004>
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x>
- McGaw, L. (2013). Use of Plant-Derived Extracts and Essential Oils against Multidrug-Resistant Bacteria Affecting Animal Health and Production. In *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00013-6>
- McGimpsey, J. A., Douglas, M. H., Van Klink, J. W., Beauregard, D. A., & Perry, N. B. (1994). Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal*, 9(6), 347–352. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730090613>
- Miladi, H., Slama, R. Ben, Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens.

- Natural Science*, 05(06), 729–739. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.56090>
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Alsaari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512(May). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>
- Mok, J. S., Ryu, A., Kwon, J. Y., Park, K., & Shim, K. B. (2019). Abundance, antimicrobial resistance, and virulence of pathogenic *Vibrio* strains from molluscan shellfish farms along the Korean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110559. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110559>
- Moraga, P., Ávila, R., & Vilaxa, A. (2014). *Salinidad y temperatura óptimas para reproducción ovípara y desarrollo de Artemia franciscana* *Salinity and temperature optimum for oviparous reproduction and development of Artemia franciscana*. 33, 85–92.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M. Y., Yusoff, F. M., Shariff, M., Ismail, S. I., & Natrah, I. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, 511(November 2018), 734227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734227>
- Nathan, A. J., & Scobell, A. (2012). How China sees America. *Foreign Affairs*, 91(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Navais Barranco, R. (2013). *Genes de Yersinia ruckeri relacionados con el proceso infeccioso y con el factor sensible al calor” (HSF)*.
- Navaneeth, K. A., Bhuvaneswari, T., Rajan, J. J. S., Alavandi, S. V., Vijayan, K. K., & Otta, S. K. (2020). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from shrimp farms of Southeast coast of India with special reference to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) status. *Aquaculture*, 518, 734813. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734813>
- Negret Redondo, P., Monroy Dosta, C., & Romero Jarero, J. (2008). Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (artemia, daphnia, tenebrio y tubifex) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Veterinaria Mexico*, 39(3), 255–268.
- Nor, Y. A., Johari, F., Ariffin, F. N. K., Mohd Ali, A. M., & Khairudin, N. H. (2018). Antimicrobial applications in agriculture: A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(4), 1829–1838. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.17>

- Nyoman Semadi Antara, Dwi Ayu Kirani Paramita, Anak Agung Duwipayana, I. B. W. G. (2016). Inhibitory Activity Of Lemongrass Essential Oil Against Eschericia Coli, Staphylococcus Aureus, And Vibrio Cholera. *Anali. Chim. Acta*, 945(August), 47–56.
- 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(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>
- Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S. L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial activities of Cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb Cinnamomum cassia Blume. *American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 511–522. <https://doi.org/10.1142/S0192415X06004041>
- Özean, M., & Erkmén, O. (2001). Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*, 212(6), 658–660. <https://doi.org/10.1007/s002170100310>
- Ozogul, Y., Kuley Boğa, E., Akyol, I., Durmus, M., Ucar, Y., Regenstein, J. M., & Köşker, A. R. (2020). Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. *Food Bioscience*, 36, 100635. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100635>
- Partovi, R., Talebi, F., Boluki, Z., & Sharifzadeh, A. (2019). *Evaluation of Antimicrobial Activity of Cymbopogon citratus Essential Oil Alone and in Combination with Origanum majorana and Caryophyllus aromaticus Essential Oils against Some Foodborne Bacteria*. 7(2), 60–67. <https://doi.org/10.15171/ijep.2019.14>
- Pati, A. C., & Belmonte, G. (2003). Disinfection efficacy on cyst viability of Artemia franciscana (Crustacea), Hexarthra fennica (Rotifera) and Fabrea salina (Ciliophora). *Marine Biology*, 142(5), 895–904. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1026-7>
- Patterson, J. E., McElmeel, L., & Wiederhold, N. P. (2019). In vitro activity of essential oils against gram-positive and gram-negative clinical isolates, including carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(12), 1–4. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz502>
- Perretta, A., Antúnez, K., & Zunino, P. (2019). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 4–8. <https://doi.org/10.29155/vet.55.211.1>

- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., & Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 15–19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1022>
- Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J. M., Michel, G. M., & Baccou, J. C. (1995). Analysis of the essential oil of wild oregano from martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2), 165–173. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698492>
- Raman, R. P. (2017). Applicability, Feasibility and Efficacy of Phytotherapy in Aquatic Animal Health Management. *American Journal of Plant Sciences*, 08(02), 257–287. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.82019>
- Raszl, S. M., Froelich, B. A., Vieira, C. R. W., Blackwood, A. D., & Noble, R. T. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 121, Issue 5, pp. 1201–1222). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jam.13246>
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. In *Industrial Crops and Products* (Vol. 62, pp. 250–264). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R. de, & Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 61, pp. 132–140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>
- Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>
- Rotello, V. M., Gupta, A., & Landis, R. F. (2016). Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Research*, 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7595.1>
- Ruiz Ruiz, J. C., Ortiz Vazquez, E. D. L. L., & Segura Campos, M. R. (2017). Encapsulation of vegetable oils as source of omega-3 fatty acids for enriched functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 1423–1434. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1002906>

- Russo, M., Galletti, G. C., Bocchini, P., & Carnacini, A. (1998). Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3741–3746. <https://doi.org/10.1021/jf980087w>
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269–279. <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>
- Saharan, V. V., Verma, P., & Singh, A. P. (2020). High prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* isolated from fish samples in India. *Aquaculture Research*, 51(3), 1200–1210. <https://doi.org/10.1111/are.14471>
- Silva, L. de L., Parodi, T. V., Reckziegel, P., Garcia, V. de O., Bürger, M. E., Baldisserotto, B., Malmann, C. A., Pereira, A. M. S., & Heinzmann, B. M. (2012). Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 350–353, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.012>
- Sneha, K. G., Anas, A., Jayalakshmy, K. V., Jasmin, C., Das, P. V. V., Pai, S. S., Pappu, S., Nair, M., Muraleedharan, K. R., Sudheesh, K., & Nair, S. (2016). Distribution of multiple antibiotic resistant *Vibrio* spp across Palk Bay. *Regional Studies in Marine Science*, 3, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.11.004>
- Snoussi, M., Hajlaoui, H., Noumi, E., Usai, D., Sechi, L., Zanetti, S., & Bakhrouf, A. (2008). In-vitro anti- *Vibrio* spp . activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 3071–3076. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9811-6>
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P. (2001). *Use of the brine shrimp , Artemia spp ., in marine fish larviculture*. 147–159.
- 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), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Starliper, C. E., Ketola, H. G., Noyes, A. D., Schill, W. B., Henson, F. G., Chalupnicki,

- M. A., & Dittman, D. E. (2015). An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>
- Stefanakis, M. K., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2014). Use of essential oils extracted from three *Origanum* species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture Research*, 45(11), 1861–1866. <https://doi.org/10.1111/are.12137>
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, 34(2), 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.024>
- Suárez, Medina, S. et al. (2015). DISTRIBUCION DE *Vibrio* spp. EN AGUA Y SEDIMENTO DE ESTANQUES PRODUCTORES DE CAMARON *Litopenaeus vannamei*. *Redalyc*, 14, 293–299.
- Subbiah, M., Caudell, M. A., Mair, C., Davis, M. A., Matthews, L., Quinlan, R. J., Quinlan, M. B., Lyimo, B., Buza, J., Keyyu, J., Keyyu, J., & Call, D. R. (2020). Antimicrobial resistant enteric bacteria are widely distributed amongst people, animals and the environment in Tanzania. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13995-5>
- Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T. Y., Lee, E., Rollon, W. D., Hara, H., Kayal, A. Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.002>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134(June), 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tolomei, A., Burke, C., Crear, B., & Carson, J. (2004). Bacterial decontamination of on-grown *Artemia*. *Aquaculture*, 232(1–4), 357–371. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00540-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00540-4)
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija,

- A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606–4610. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999>
- Vanhaecke, P., & Sorgeloos, P. (1982). International study on *Artemia*. XVIII. The hatching rate of *Artemia* cysts - A comparative study. *Aquacultural Engineering*, 1(4), 263–273. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(82\)90035-8](https://doi.org/10.1016/0144-8609(82)90035-8)
- Vinceković, M., Viskić, M., Jurić, S., Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Donsì, F., Barba, F. J., & Režek Jambrak, A. (2017). Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 69, pp. 1–12). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.001>
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.026>
- Xiao, S., Cui, P., Shi, W., & Zhang, Y. (2020). Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02898-4>
- Yazgan, H. (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *LWT*, 130, 109669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109669>