



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
INSTITUTO DE POSTGRADO**

TEMA

EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE DIFORMIATO DE
POTASIO Y EXTRACTO DE ORÉGANO SOBRE LA CARGA DE *V.*
parahaemolyticus PRESENTE EN AGUA DE CULTIVO

AUTORA

CRIOLLO NIVICELA SARA ANAHI

TRABAJO DE TITULACIÓN
Previo a la obtención del grado académico en
MAGÍSTER EN ACUICULTURA

TUTOR

MSC. DOMÍNGUEZ BORBOR CRISTOBAL LEONARDO

Santa Elena, Ecuador

Año 2026



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
INSTITUTO DE POSTGRADO**

TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos calificadores, aprueban el presente trabajo de titulación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por el Instituto de Postgrado de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**ROXANA DEL CARMEN
ÁLVAREZ ACOSTA**

**PhD. Roxana Álvarez Acosta
COORDINADORA DEL
PROGRAMA**



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**JIMMY AGUSTIN
VILLON MORENO**

**MSc. Jimmy Villón Moreno
ESPECIALISTA**



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**CRISTOBAL LEONARDO
DOMINGUEZ BORBOR**

**MSc. Cristobal Domínguez Borbor
TUTOR**



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**JUAN DIEGO
VALENZUELA COBOS**

**PhD. Juan Valenzuela Cobos
ESPECIALISTA**



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**MARIA MARGARITA
RIVERA GONZALEZ**

**Ab. María Rivera González, Mgs.
SECRETARIA GENERAL
UPSE**



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
INSTITUTO DE POSTGRADO**

CERTIFICACIÓN:

Certifico que luego de haber dirigido científica y técnicamente el desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por el cual apruebo en todas sus partes el presente trabajo de titulación que fue realizado en su totalidad por **Sara Anahi Criollo Nivicela**, como requerimiento para la obtención del título de Magíster en Acuicultura.

Atentamente,



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**CRISTOBAL LEONARDO
DOMINGUEZ BORBOR**

MSc. Cristóbal Domínguez Borbor
TUTOR



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
INSTITUTO DE POSTGRADO**

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, SARA ANAHI CRIOLLO NIVICELA

DECLARO QUE:

El trabajo de Titulación, EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE DIFORMIATO DE POTASIO Y EXTRACTO DE ORÉGANO SOBRE LA CARGA DE *V. parahaemolyticus* PRESENTE EN AGUA DE CULTIVO previo a la obtención del título en Magíster en Acuicultura, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Santa Elena, a los 4 días del mes de agosto de año 2026



Firmado electrónicamente por:
**SARA ANAHI CRIOLLO
NIVICELA**

Ing. Acuí. Sara Anahi Criollo Nivicela
AUTORA



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
INSTITUTO DE POSTGRADO**

AUTORIZACIÓN

Yo, SARA ANAHI CRIOLLO NIVICELA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de la investigación con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este informe de investigación dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Santa Elena, a los 04 días del mes de agosto de año 2026



Firmado electrónicamente por:
**SARA ANAHI CRIOLLO
NIVICELA**

Ing. Acuí. Sara Anahi Criollo Nivicela
AUTORA



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
INSTITUTO DE POSTGRADO**

CERTIFICACIÓN DE ANTIPLAGIO

Certifico que después de revisar el documento final del trabajo de titulación denominado **EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE DIFORMIATO DE POTASIO Y EXTRACTO DE ORÉGANO SOBRE LA CARGA DE *V. parahaemolyticus* PRESENTE EN AGUA DE CULTIVO**, presentado por el estudiante, **SARA ANAHI CRIOLLO NIVICELA** fue enviado al Sistema Antiplagio COMPILATIO, presentando un porcentaje de similitud correspondiente al $< 1\%$, por lo que se aprueba el trabajo para que continúe con el proceso de titulación.

 **Informe de análisis**
Compilatio Magister+ | UPSE-ECU

Nombre del fichero : Turnitin Criollo.txt
Tamaño del archivo original : 3,8 MB
Número de palabras : 9103

Depositante : CRISTOBAL LEONARDO DOMINGUEZ BORBOR
Fecha de depósito : 19 de agosto de 2026
Tipo de carga : interface
Fecha de fin de análisis : 19 de agosto de 2026

 Resumen (sección 1/3)

Localización de los textos sospechosos en el documento :



Incluido en el porcentaje de textos sospechosos :

 Similitudes

Pasajes con similitudes a fuentes encontradas en diferentes colecciones.

<1%



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**CRISTOBAL LEONARDO
DOMINGUEZ BORBOR**

**MSc. Cristóbal Domínguez Borbor
TUTOR**

AGRADECIMIENTO

A mi madre, Pilar Nivicela, por ser mi mayor ejemplo de fortaleza, esfuerzo y superación. Verte salir adelante me enseñó que, incluso en los momentos más difíciles, siempre hay una razón para continuar.

Gracias por tu amor, por tus sacrificios y por estar a mi lado en cada etapa de mi vida. Cada día me esfuerzo por crecer y ser mejor, inspirada en la mujer valiente que eres.

Este logro lleva mucho de ti, porque todo lo que hago nace del deseo de verte orgullosa y devolverte, aunque sea un poquito, todo lo que me has dado. Te amo, mami.

Sara Anahi, Criollo Nivicela

DEDICATORIA

A mi familia, por apoyarme siempre, por estar conmigo en los momentos difíciles y por creer en mí cuando más lo necesitaba.

En especial, a mis hermanos, quienes son mi fuerza y mi razón para seguir adelante. Cada día me esfuerzo por ser mejor y darles el ejemplo que merecen.

Este logro es para ustedes, porque todo lo que hago nace del amor que siento por mi familia.

Sara Anahi, Criollo Nivicela

ÍNDICE

TEMA	I
TRIBUNAL DE GRADO	II
CERTIFICACIÓN:	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	IV
AUTORIZACIÓN.....	V
CERTIFICACIÓN DE ANTIPLAGIO	VI
AGRADECIMIENTO.....	VII
DEDICATORIA	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. OBJETIVO GENERAL	6
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
4. PLANTEAMIENTO HIPOTÉTICO.....	6
5. MARCO TEÓRICO	7
5.1. LA INDUSTRIA ACUÍCOLA Y SU IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA	7
5.2. <i>Vibrio</i> spp. patógenos en acuicultura.....	7
5.3. <i>V. parahaemolyticus</i> , bacteria causante de la AHPND.....	8
5.4. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE <i>Vibrio</i> spp.	9
5.4.1. ANTIBIÓTICOS	9
5.4.2. PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA	9
5.4.3. ACEITES ESENCIALES.....	10
5.4.4. ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	11
5.5. MEZCLA DE AO-EP	12
6. METODOLOGÍA	13
6.1. PRODUCTOS Y PROPORCIONES EVALUADAS	13
6.2. MATERIAL BIOLÓGICO: <i>V. parahaemolyticus</i>	13
6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE LAS MEZCLAS DE KDF-EO MEDIANTE MIC Y MBC	14
6.4. TOXICIDAD IN VITRO CON HEMOCITOS DE CAMARÓN	15
6.5. TOXICIDAD IN VIVO EXPOSICIÓN DIRECTA	15
6.6. EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA	16
7. RESULTADOS.....	17
7.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PRODUCTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>V. parahaemolyticus</i> AGENTE CAUSAL DE AHPND	17
7.2. ACTIVIDAD INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE LAS FORMULACIONES DE	

KDF-EO CONTRA <i>V. parahaemolyticus</i> BA94C2.....	20
7.3. TOXICIDAD IN VITRO MEDIANTE ENSAYO MMT EN HEMOCITOS DE <i>P. VANNAMEI</i>	20
7.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC50)	22
7.5. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO MEDIANTE LA SOBREVIVENCIA DE POST-LARVAS DE <i>P. VANNAMEI</i>	23
7.6. EVALUACIÓN in vivo DE LA CARGA DE <i>V. parahaemolyticus</i> EN AGUA DE CULTIVO	26
7.7. DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE <i>V. parahaemolyticus</i> EN PL DE <i>P. vannamei</i>	27
8. DISCUSIÓN	29
8.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EO FRENTE A BACTERIAS GRAMNEGATIVAS	29
8.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DIFORMIATO DE POTASIO Y EXTRACTO DE ORÉGANO.....	31
8.3. POSIBLE ACCIÓN COMPLEMENTARIA DEL KDF + EO FRENTE A <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i>	32
8.4. TOXICIDAD DE LA FORMULACIÓN DE KDF+EO	33
9. CONCLUSIÓN	35
10. RECOMENDACIONES	36
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
12. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Figura 1.....	19
Figura 2.....	23
Figura 3.....	25
Figura 4.....	26
Figura 5.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	20
---------------	----

RESUMEN

La acuicultura de camarón *Penaeus vannamei* enfrenta varios desafíos sanitarios asociados diferentes patógenos virales y bacterianos, en particular las bacterias del género *Vibrio*, como *Vibrio parahaemolyticus*, agente causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), que provoca altas mortalidades en cultivo de camarón amenazando la sostenibilidad de la industria. Por lo que resulta necesario desarrollar alternativas sostenibles al uso de antibióticos. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto combinado del diformiato de potasio y extracto de orégano (KDF-EO) para reducir la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* en agua de cultivo. Tres formulaciones fueron evaluadas a diferentes concentraciones para establecer la concentración mínima inhibitoria y bactericida, seguidamente se estableció la toxicidad *in vitro* e *in vivo*, y se determinó su efecto *in vivo* mediante cuantificación microbiológica durante 72 horas tras la inoculación de *V. parahaemolyticus* en agua de cultivo. Las formulaciones presentaron una CMI de 250 µg/mL, P2 y P3 alcanzaron una concentración bactericida de 250 µg/mL. Las concentraciones de 31,2–125 µg/mL no afectaron la viabilidad de los hemocitos ni la supervivencia de los camarones. Además, los tratamientos redujeron significativamente la carga bacteriana en agua y larvas, especialmente después de cada aplicación. En conclusión, KDF-EO presenta potencial como alternativa para el control de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de camarón.

Palabras claves: Diformiato de potasio, aceite de orégano y *V. parahaemolyticus*

ABSTRACT

The aquaculture of *Penaeus vannamei* shrimp faces several health challenges associated with various viral and bacterial pathogens, particularly bacteria of the genus *Vibrio*, such as *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), which causes high mortality rates in shrimp farms, threatening industry sustainability. Therefore, it is necessary to develop sustainable alternatives to the use of antibiotics. The objective of this study was to evaluate the combined effect of potassium diformate and oregano extract (KDF-EO) in reducing the bacterial load of *V. parahaemolyticus* in culture water. Three formulations were evaluated at different concentrations to establish the minimum inhibitory and bactericidal concentrations. Subsequently, in vitro and in vivo toxicity was established, and the in vivo effect was determined by microbiological quantification for 72 hours after inoculation of *V. parahaemolyticus* into culture water. The formulations exhibited an MIC of 250 µg/mL, with P2 and P3 achieving a bactericidal concentration of 250 µg/mL. Concentrations of 31.2–125 µg/mL did not affect hemocyte viability or shrimp survival. Furthermore, the treatments significantly reduced the bacterial load in water and larvae, particularly after each application. In conclusion, KDF-EO shows potential as an alternative for the control of *V. parahaemolyticus* in shrimp farming.

Keywords: Potassium diformate, oregano oil and *V. parahaemolyticus*

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cultivo de camarón *Penaeus vannamei* representa una de las industrias con gran impacto económico, con una producción global aproximada de 6,145 millones toneladas métricas en 2025, lo que representa un crecimiento del 2% respecto a 2024 (CNA, 2025). Según los reportes de Forbes Ecuador (2026). Ecuador, en 2025 se consolidó como el principal exportador de camarón con ventas anuales que superan los \$ 7.000 millones. Pese al gran valor económico, la industria acuícola constantemente enfrenta diversos desafíos como la presencia de diferentes agentes biológicos incluyendo parásitos, virus y bacterias (Subasinghe, et al., 2005). Particularmente entre los agentes bacterianos destacan los *Vibrio* spp. como el *Vibrio parahaemolyticus*, causante de Necrosis hepatopancreática Aguda (AHPND) (Tran et al., 2013) que ocasiona mortalidades masivas hasta el 100% en menos de 35 días de cultivo (Sen et al., 2026).

V. parahaemolyticus, corresponde a un microorganismo gram-negativo, halófila y de gran impacto en el cultivo de *Penaeus* (Raja, et al., 2017). Su proliferación está ligada al desequilibrio de los factores ambientales como salinidad, oxígeno disuelto, variaciones de pH y una alta carga de materia orgánica (Ramírez-Tirado et al., 2025). Entre los mecanismos de virulencia descritos para *V. parahaemolyticus* causante de AHPND destacan la producción de toxinas binarias PirA (ToxA) y PirB (ToxB) tras la adquisición del plásmido con los genes *pirA* y *pirB*. Una vez que las bacterias colonizan el estómago del camarón libera las toxinas, las cuales colonizan el hepatopáncreas (Xu, Zhong, Yang, & Li, 2025). la toxina PirB se fija a receptores específicos de la membrana celular, como la aminopeptidasa N, generando la formación de poros transmembrana que inducen la lisis celular. Como resultado, se produce deformación y necrosis de los túbulos del hepatopáncreas, provocando una falla metabólica y consecuentemente la muerte del camarón (Barrantes, 2023).

Para el control de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de *P. vannamei* se han empleado diversas estrategias que incluyen antibióticos (oxitetraciclina y florfenicol) (referencia), microorganismos probióticos, entre ellos especies de *Lactobacillus* spp. y *Bacillus* spp.) (Wyban, 2025), e inmunoestimulantes, como β -glucanos, y extractos de algas

(Subasinghe, y otros, 2005), ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido cítrico) (Nurzyńska-Wierdak & Walasek-Janusz, 2025) y aceites esenciales (orégano, tomillo) (Bondad-Reantaso, et al., 2023). Sin embargo, se ha demostrado que el uso de antibióticos genera consecuencias negativas como la destrucción del microbiota en el intestino y alteraciones al ecosistema acuícola. Asimismo, la acumulación de residuos de estos fármacos en el tejido del camarón provoca el rechazo de lotes completos destinados a la exportación. Por ello, surge el enfoque de terapias antibacterianas basadas en productos naturales, los cuales han demostrado ser más eficientes al eliminar al patógeno sin afectar al huésped bajo impacto al ecosistema, y pocos residuos, y sin ejercer presión selectiva (Velasquez, Castro, & Monserrate, 2025).

Los ácidos orgánicos han demostrado mejorar las tasas de crecimiento, favoreciendo el aprovechamiento de los nutrientes (Rasidi, et al., 2024), optimización de la salud intestinal (Chowdhury et al., 2021) y fortalece la resistencia a patógenos al acidificar el tracto digestivo lo cual reduce la carga bacteriana (Dai, et al., 2021). Los aceites esenciales presentan diversas propiedades antiinflamatorias (Valdiviezo-Ugarte et al., 2019), reguladores de la respuesta inmunitaria (Freitas, et al., 2019), además de presentar propiedades antioxidantes y antibacterianas (Dinardo et al., 2020). Así mismo, diversos estudios han evaluado la aplicación conjunta de ácidos orgánicos y aceites esenciales, reportando resultados favorables asociados con el uso combinado de estos compuestos.

Estudios *in vitro* han evidenciado que la aplicación conjunta de ácidos orgánicos y extractos de plantas, potencian su actividad en comparación a su aplicación individual frente a *Vibrio* spp. Reyes (2020). Reyes evaluó ácidos orgánicos, incluyendo, ácido acético, cítrico, láctico y propiónico (0.5-2%) en combinación con el ajo, canela y tomillo (0.25-1%) frente a la bacteria *V. parahaemolyticus* (AHPND+), registrando que el ácido láctico con el tomillo redujo significativamente ($p \leq 0.5$) las poblaciones de *Vibrio* un 99% a dosis sub-CMI. Wang et al. (2024) evaluaron el efecto del ácido láctico, junto con los ácidos fumáricos y cítrico aplicados entre 0,25 y 1,25% v/v y extracto de romero, orégano, tomillo, evaluados entre 0.5-2 mg/mL, contra *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, evidenciando que el ácido láctico con extracto de orégano redujo significativamente ($p \leq 0.05$) la carga bacteriana más del 90% a concentraciones sub-CMI. Además, la combinación de AO-EP (ácido fórmico y

ácido láctico y aceite esencial de orégano) también han sido evaluadas en la larvicultura del cultivo de camarón, Sulman (2025) evaluó la eficacia del AO-EP en estadios larvales tempranos, específicamente desde Zoea hasta post-larva IV de *P. vannamei*, aplicándolo directamente en agua de cultivo, demostrando reducir la carga de *Vibrio* spp., lo que mejoró la sobrevivencia un 15 % de los camarones respecto al grupo control.

El uso de los AO-EP han contribuido a disminuir y controlar la carga bacteriana de patógenos en acuicultura (Dawood, Koshio, & Esteban, 2017), demostrando ser una excelente opción terapéutica (Hu, et al., 2025). El presente estudio evalúa la combinación de extracto de orégano y diformiato de potasio para reducir la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en el agua de cultivo de *P. vannamei*, ofreciendo al productor una alternativa amigable con el ambiente y segura frente a desafíos sanitarios, particularmente por *V. parahaemolyticus*.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* spp se las encuentra de forma natural distribuidas en ambientes acuáticos y estuarinos, además de habitar en la microbiota de los organismos acuáticos (Thompson, Lida, & Swings, 2004). En el cultivo de camarón, especies como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi* son consideradas patógenos oportunistas. Cuentan con la capacidad de multiplicarse de manera exponencial bajo condiciones de variaciones climáticas, como temperaturas ($>30^{\circ}$), salinidad (10–35 ppt), elevada carga de materia orgánica, es decir, variaciones en los parámetros físicos y químicos de agua (Brumfield, et al., 2023).

Particularmente, *V. parahaemolyticus* en los últimos años ha cobrado relevancia debido a las cepas portadoras del plásmido pVA1, el cual codifica el sistema de secreción tipo VI (T6SS) y las toxinas PirA y PirB, elementos de virulencia que ocasionan efectos devastadores en el cultivo de camarón desde 2009 hasta la actualidad (Li et al., 2019). La presencia de AHPND continúa considerándose como una de las enfermedades con mayor impacto económico en el sector camaronero, provocando pérdidas económicas superiores a

\$ 43 mil millones y una reducción de la producción hasta del 60% (Tang & Bondad-Reantaso, 2019). La presencia de los *Vibrios* spp. en el agua de cultivo representa desequilibrios en el ecosistema y una alerta para la bioseguridad, dado a su potencial de persistencia en el sedimento incluso sin huésped (Xu et al., 2025).

Históricamente, los tratamientos que se han utilizado para controlar y erradicar la presencia de *Vibrio* spp. incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, entre los que se encuentran la oxitetraciclina, el florfenicol y la enrofloxacin. Así mismo, se ha hecho uso de bacteriófagos, prebióticos, microorganismos probióticos y distintos ácidos orgánicos (Defoirdt, Sorfeloos, & Bossier, 2011). No obstante, la aplicación descontrolada de antibióticos ha propiciado resistencia bacteriana a diferentes productos, residuos en el músculo del camarón y limitaciones en cuanto a la exportación a mercados internacionales (Hamid, et al., 2025). Los probióticos han demostrado una eficacia limitada, debido a que su efectividad depende de las variaciones ambientales, los bacteriófagos enfrentan desafíos regulatorios y problemas de estabilidad en sistemas abiertos (Hossain, et al., 2024).

La diversidad de tratamientos aplicados para el control de los *Vibrios* spp. incluyendo *V. parahaemolyticus* refleja el gran desafío ante la problemática lo que impulsa la exploración de nuevas estrategias enfocados en productos naturales, y de hecho, si esto se pueden combinar podrían maximizar su efecto. La literatura carece de información sobre la aplicación de la combinación de KDF y EO de manera experimental y escenarios reales de cultivo de camarón, lo que genera una brecha teórica-práctica que limita su aplicación para protocolos de manejo sanitario. El presente trabajo se centra justamente en este vacío, al evaluar el efecto del producto sobre la carga de *V. parahaemolyticus* en agua de cultivo, con el fin de proponer una alternativa práctica que fortalezca la sostenibilidad acuícola.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es posible que el uso de aceite de orégano y diformiato de potasio puedan reducir la presencia de *V. parahaemolyticus* en agua de cultivo de *P. vannamei*?

2. JUSTIFICACIÓN

V. parahaemolyticus es el principal agente etiológico asociado con la enfermedad AHPND, específicamente aquellas cepas portan los genes PirA y PirB, generalmente localizados en el plásmido de virulencia pV1. Estos genes codifican las toxinas PirA y PirB, las cuales están asociadas con el daño de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (Zheng, et al. 2019) provocando su desprendimiento y necrosis tisular (Jiang, An, Fan, Zhao, & Wang, 2025), fallo metabólico y altas mortalidades en pocas horas de infección (Raja, et al., 2017). Los productos naturales que incluyen AO y EP en combinación pueden afectar las poblaciones de *Vibrio* spp. en los cultivos de camarón incluso a concentraciones Sub-MIC.

Según los datos obtenidos por la CNA (2023) se expone que la presencia de este patógeno genera pérdidas anuales que superan los 1.000 millones de dólares en la acuicultura global. La combinación de estos aditivos representa bajos costos y fácil aplicación, lo que se traduce en optimización de costos de producción al aumentar el porcentaje de sobrevivencia y minimizar el uso de productos prohibidos en la Unión Europea y Estados Unidos, como los antibióticos (He, et al., 2017).

Bajo el enfoque social, la presente investigación promueve la adopción de prácticas acuícolas sostenibles al ofrecer una alternativa segura que minimizan la dependencia de antibióticos convencionales, consecuentemente minimizando la presencia de residuos antimicrobianos y genes de resistencia en el producto destinado al consumo humano (Banu et al., 2025). Esta actividad a su vez protege de manera directa la salud pública al evitar alertas por propagación de bacterias, reduciendo la presencia de toxicidad y alergias, lo que beneficia directamente a las comunidades costeras del Ecuador las cuales dependen económicamente de la actividad acuícola. Al potenciar la seguridad de productos pesqueros, se facilita el acceso a proteínas de alta calidad generando confianza de los consumidores locales e internacionales impulsando el desarrollo rural sostenible, alineado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (FAO, 2022).

Con base a los resultados de la presente investigación se generará aportes prácticos, protocolos estandarizados y validados para la correcta aplicación de KDF y EO en el agua de cultivo de *P. vannamei*, en dónde se expondrá el procedimiento para su preparación, momento ideal para su aplicación, frecuencia de aplicación y se evaluará de manera cuantitativa la tasa de reducción de la carga bacteriana (UFC/mL) de *V. parahaemolyticus* de manera *in vitro* e *in vivo* para validar la eficacia de la combinación de los productos

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto combinado del diformiato de potasio y extracto de orégano (*Oreganum vulgare*) mediante la aplicación en agua de cultivo de camarón a fin de reducir la carga de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar *in vitro* la actividad antibacteriana a partir de la combinación KDF-EO frente a *V. parahaemolyticus* BA94C2, causante de AHPND.
- b) Evaluar la toxicidad de las concentraciones de KDF-EO mediante ensayos *in vitro* en hemocitos e *in vivo* en estadios larvales de *P. vannamei*.
- c) Determinar la capacidad reductora de KDF-EO frente a la carga de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de larvas de *P. vannamei* mediante la microbiología tradicional.

4. PLANTEAMIENTO HIPOTÉTICO

H0: No existe diferencia significativa en la reducción de la carga de *V. parahaemolyticus* al aplicar diformiato de potasio y extracto de orégano en agua de cultivo de camarón.

H1: Existe diferencia significativa en la reducción de la carga de *V. parahaemolyticus* al aplicar diformiato de potasio y extracto de orégano en agua de cultivo de camarón.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. LA INDUSTRIA ACUÍCOLA Y SU IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA

El cultivo de *P. vannamei*, se ha consolidado como una industria productiva de mayor impacto a nivel mundial y como un pilar fundamental en países de Latinoamérica como Ecuador, Perú y México. (Wyban, 2025). Ecuador, particularmente se posicionó como el principal exportador de camarón a nivel mundial (Luna, 2026). Sin embargo, pese a su crecimiento exponencial, su cultivo a presentado diferentes desafíos sanitarios, entre los que se incluyen afectaciones de origen viral, micótico y bacteriano, siendo estas últimas la principal limitante para la producción acuícola (Subasinghe, et al., 2005).

Si bien es cierto, en la actualidad se busca aumentar las densidades de siembras para cosechar más libras por hectarea, sin embargo, existen factores como, altas densidades de siembra, acumulación de materia orgánica y variaciones ambientales las cuales crean ambientes propicios para la proliferación de estos patógenos, entre ellos, los *Vibrio* spp, caracterizados por su capacidad de aumentar las tasas de mortalidad causando pérdidas económicas significativas (Ramírez-Tirado, et al., 2025).

5.2. *Vibrio* spp. patógenos en acuicultura

Los *Vibrio* spp. son bacterias gram-negativas, facultativamente anaeróbicas, positivas a oxidasas y móviles debido a que cuentan con un único flagelo polar. Estas bacterias se encuentran en ecosistemas marinos y estuarinos, tanto en estado libre como asociadas con organismos acuáticos como, moluscos, crustáceos y peces. Perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, abarca más de 90 especies documentadas, varias de las cuales se las han reportado como patógenas (Pruzzo, et al., 2005).

Entre las de mayor interés son: *V. cholerae*, etiológico del cólera; *V. parahaemolyticus*, causante de la necrosis hepatopancreática aguda en camarones y por consumo humanos ocasiona gastroenteritis; y, *Vibrio vulnificus*, asociado a infecciones graves en heridas y septicemias de alta letalidad (Lovell, 2017). Su fisiología versátil le permite desarrollarse en amplios rangos de temperatura (10 – 40 °C) y salinidad (0 – 40 ppt), lo que, junto al calentamiento global y el aumento de la demanda de mariscos, han propiciado el desarrollo de la incidencia de enfermedades causadas por vibrios en humanos (Baker-Austin et al., 2013).

5.3. *V. parahaemolyticus*, bacteria causante de la AHPND

V. parahaemolyticus, corresponde a una bacteria gramnegativa, halófila y facultativamente anaeróbica, perteneciente a ambientes estuarinos y marinos, si bien es cierto, cuenta con cepas no patógenas, pero en 2009 surgieron variantes con el plásmido pVA1, con genes de toxina de PirA y PirB, ocasionando AHPND afectando la producción acuícola con pérdidas económicas a nivel global con más de 44.000 millones de dólares en diez años. Una vez que este patógeno ingresa al estómago del camarón (Kumar, Roy, Behera, Bossier, & Das, 2021).

AHPND fue reportada en Asia por primera vez en 2009, pero se desconocía su agente causal (Flegel, 2021), no fue hasta el 2013 que se descubrió que la cepa causante de esta enfermedad en el cultivo de camarones es el agente bacteriano *V. parahaemolyticus* relacionado con la producción de toxinas pVA1 (PirA y PirB) (Wang, et al., 2020). Actualmente se han reportado otras especies de *Vibrio* sp. con cepas portadoras del plásmido, entre ellas *Vibrio punensis*, *V. owensii* y *V. campbellii*, las cuales también están asociadas a brotes de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) (Wang, et al., 2022).

La infección empieza cuando el *P. vannamei* ingiere cepas de *V. parahaemolyticus* portadoras del plásmido pVA1, una vez dentro del camarón las bacterias se adhieren y coloniza el lumen del estómago (cámara cardíaca), donde factores desencadenantes internos, como la presencia de quitina y oligómeros provenientes del exoesqueleto consumido, junto al pH ácido del ácido gástrico, ocasionan el desencadenamiento de los genes del plásmido pVA1, liberando las toxinas pirA y pirB en el lumen estomacal (Lee, et al., 2022).

El estómago del camarón se conecta directamente al hepatopáncreas mediante de los túbulos hepatopancreáticos, permitiendo que las toxinas sean arrastradas por el flujo digestivo natural hacia estos túbulos. En este sentido, la toxina PirB interactúa glicoproteínas adhiriéndose en la superficie de las células epiteliales del hepatopáncreas, facilitando su endocitosis (Kumar, et al., 2019). Las toxinas se internalizan en el citoplasma celular, mientras que las bacterias permanecen en el estómago (Zheng et al. 2019). Las toxinas provocan poros transmembrana, causando desequilibrio iónico celular, lisis celular masiva, desprendimiento del epitelio tubular y necrosis aguda (Soto-Rodriguez, et al., 2022). En la evaluación macroscópica, el hepatopáncreas presenta una tonalidad pálida; microscópicamente se observa atrofia y necrosis tubular, lo que lleva a inanición, inmunosupresión y muerte del camarón (Kumar, et al., 2019).

5.4. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE *Vibrio* spp.

5.4.1. ANTIBIÓTICOS

Los enfoques tradicionales contra *Vibrio* spp. en el cultivo de camarones han recurrido mayoritariamente al uso de antibióticos como, oxitetraciclina y florfenicol, los cuales inhiben el crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de proteínas o ADN, ofrece una solución inmediata ante infecciones agudas (Gámez-Bayardo, et al., 2021). Pese a su efectividad inicial, el uso de antibióticos para combatir patógenos induce resistencia antibacteriana, contamina el medio, provoca la acumulación de estas sustancias en el músculo y en muchos países como Japón, China y Unión Europea están vetados, debido a regulaciones de seguridad alimentaria y sostenibilidad (Cabello, 2006).

5.4.2. PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

En los sistemas de producción acuícola, los probióticos emergen como una alternativa fundamental en el control de los *Vibrio* spp., compitiendo por nutrientes y sitios de adhesión, impidiendo la colonización de patógenos y reequilibrando el microbiota

intestinal para fortalecer la respuesta inmune (Mohammed, et al., 2026). Cepas específicas de *Bacillus*, como el *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus cereus* han demostrado su actividad antagónica frente a *Vibrio* spp. contribuyendo a la disminución de su crecimiento y al control de bacterias oportunistas mediante mecanismos como la competencia y producción de compuestos antibacterianos (Pérez-Chabela et al., 2020).

Sánchez (2018), evaluó a cepas probióticas de *Bacillus cereus* frente a *V. parahaemolyticus*, agente causal de AHPND. Las cepas fueron aplicadas en el alimento comercial durante 7 días previo desafío contra el patógeno, incorporando 10^8 UFC/Kg de alimento con una dosificación de 2 veces por día, para garantizar la colonización del tracto intestinal, como resultado, se evidenció que la tasa de mortalidad se redujo en un 70% frente al control infectado sin tratamiento, reflejando la capacidad de *B. cereus* de contrarrestar eficazmente la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*. Adicional, se evaluó la aplicación semanal de *Bacillus* sp. a dosis de 2-15 g/Ha en agua y sedimentos a lo largo de todo el ciclo de cultivo. Se observó una reducción de la población total de *Vibrio* spp. de 5×10^2 UFC/ml a concentraciones no mínimas no detectables en agua y hepatopáncreas.

5.4.3. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales surgen como una alternativa comprometedora contra *Vibrio* spp. en cultivos acuícolas debido a sus compuestos bioactivos, terpenos, fenoles y alcoholes, los cuales evidencian una excelente acción antimicrobiana (Defoirdt, Sorfeloos, & Bossier, 2011). Su mecanismo de acción está netamente basado en su naturaleza lipofílica, la cual facilita la interacción con la bicapa lipídica bacteriana, incrementando su fluidez, formando poros y elevando la permeabilidad, lo que libera iones de potasio, ATP, proteínas, componentes intracelulares (Nazzaro et al, 2013). Esta alteración ocasiona colapso en la membrana, bloquea procesos metabólicos esenciales, altera funciones esenciales, como la comunicación bacteriana mediante Quorum Sensing y el desplazamiento en enjambre, formación de biopelículas, limitando la virulencia sin eliminar la bacteria (Asfour, 2018).

Gracia-Valenzuela (2012) evaluaron dos fracciones del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*), una con alto timol (FT) y otra con carvacrol (FC), haciendo la comparación con enrofloxacin en aislamientos de *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, y *V.*

mimicus provenientes de *P. vannamei*. Se usó ensayos *in vitro* de CMI y difusión en agar, después se realizó la evaluación *in vivo* con *V. alginolyticus*. El IMC para FT y FC fue entre 50 y 100 µg/mL y 10-50 µg/mL del antibiótico, con halos de inhibición de 50-56 mm para FC contra *V. alginolyticus*, evidenciando alta sensibilidad. *In vivo*, FC logró aumentar la supervivencia de los camarones evaluados un 70%, superando a FT (50%) y el antibiótico, demostrando reducción efectiva de la carga bacteriana sin toxicidad aparente.

5.4.4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos, como el ácido fórmico, láctico y cítrico se los han empleado ampliamente en el cultivo de camarón en el control de *Vibrio* sp., actúan contra bacterias patógeno principalmente en su forma lipofílica no disociada (López-Caballero, Calvo, & Martínez-Álvarez, 2025), la cual penetra que penetra la membrana celular hacia el citoplasma, disociándose allí para liberar H⁺ que bajan el pH interno de ~7 a niveles letales, bloqueando enzimas como ATPasas, colapsando el metabolismo energético, provoca desaturación proteica fuga de iones esenciales (K⁺, Na⁺) (Vera, Arteaga y Reyna, 2023). La acidificación del medio también daña la pared celular al afectar su estructura de peptidoglicanos y provocar un desequilibrio osmótico. A su vez, frena la virulencia del quórum sensing (QS), impide la formación de biopelículas limitando la motilidad bacteriana, es decir, actúa de una forma bactericida combinado con un efecto bacteriostático (Dibner & Buttin, 2002).

Mine & Boopathy (2011) analizaron la actividad de los ácidos acético, fórmico, cítrico y láctico frente a cultivos de *V. parahaemolyticus* aislados de ejemplares infectados de *P. vannamei*. Se realizó pruebas *in vitro* usando concentraciones de 0.5% a 2% (v/v). Posteriormente, se realizó ensayos con larvas de camarón infectadas experimentalmente con *V. parahaemolyticus* en dosis controladas letales de 10⁶ CFU/mL. Se observó inhibición significativa del crecimiento bacteriano, con mayor efecto del ácido láctico y fórmico, con reducciones de 4-6 log CFU/mL, una mejora de la supervivencia en un 80-90% en comparación al tratamiento control y una menor carga bacteriana en el intestino de las larvas de camarón, reflejando su efecto en la reducción de la colonización y proliferación de *V. parahaemolyticus* en ambos tratamientos evaluados.

5.5. MEZCLA DE AO-EP

En el sector acuícola, la combinación entre AP-EP es clave ya que potencia sus efectos antimicrobianos y estimulantes más allá de su aplicación individual ejerciendo acción bactericida y fungicida contra patógenos como bacterias y hongo a dosis reducidas en comparación con su uso aislado (Gómez, et al., 2019). Su combinación, acidifica el medio para mejorar la absorción de nutrientes y quelar minerales, reduce el estrés y la incidencia de enfermedades debido al control de patógenos como *Vibrio* spp., consecuentemente se observará mejoras tasas productivas y de salud (Caruso, et al., 2026).

En el estudio de Rossi et al. (2021) evaluaron mediante pruebas de difusión en disco (Kirby-Bauer) y determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) en caldo de cultivo la mezcla de AO como, ácido fórmico, acético y/o propiónico y extracto de ajo frente a cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. Se utilizaron dosis habituales entre 0.1% y 1% de cada ingrediente por separado, así como mezclas de ácido orgánico y extracto de planta dentro de los mismos intervalos de concentración. Como resultado, se evidenció un descenso de entre 2 y 3 unidades log en la concentración bacteriana (UFC/mL), con halos de inhibición 10–20 mm. No obstante, la combinación mostró efectos sinérgicos, al bajar la CMI/CMB y expandir los halos de inhibición (de 25 a 30 mm), logrando una reducción superior de la carga bacteriana (hasta 3–4 log UFC/mL) en comparación con su aplicación individual.

6. METODOLOGÍA

6.1. PRODUCTOS Y PROPORCIONES EVALUADAS

En el presente estudio, se adquirió aceite esencial de orégano (EO) de manera comercial, obtenido mediante el método de arrastre de vapor, con concentraciones del 80 % de carvacrol y 20 % de timol.

Se preparó una solución madre de 500 mL a una concentración de 10×, mediante la incorporación de ácido fórmico (25 % v/v), formiato de potasio (40 % m/v) y extracto de orégano (50 µg/mL) en agua destilada. Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias a partir de la solución madre para obtener las concentraciones de trabajo correspondientes a los productos evaluados, como se detalla a continuación:

- **P1 (KDF+EO-10):** ácido fórmico (AF) 2.5 % v/v, formiato de potasio (FK) 4% m/v y aceite esencial de orégano (EO) 10 µg/mL.
- **P2 (KDF+EO-20):** ácido fórmico (AF) 2.5 % v/v, formiato de potasio (FK) 4% m/v y aceite esencial de orégano (EO) 20 µg/mL.
- **P3 (KDF+EO-30):** ácido fórmico 2.5 % v/v, formiato de potasio 4% m/v y extracto de orégano 30 µg/mL.

6.2. MATERIAL BIOLÓGICO: *V. parahaemolyticus*

En el presente estudio se utilizó una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* BA94C2. La cepa fue proporcionada por el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), Ecuador., y solo se usa para este fin investigativo eliminado todo subcultivo al término de la investigación.

Para el cultivo de la cepa de *V. parahaemolyticus* se siguió la metodología de Domínguez-Borbor et al. (2020). La cepa fue sembrada mediante estría en agar Luria-Bertani, suplementada con 2% de NaCl (LBa + NaCl) y fueron incubadas en condiciones aeróbicas durante 18 h a 28 °C. Seguidamente, las colonias aisladas se inocularon en caldo Luria-Bertani con 2% NaCl (p/v) (LBb + 2% NaCl) incubándose 8 h a 28 °C con agitación (200 rpm). Las suspensiones bacterianas se estandarizaron a 2×10^8 UFC/ml en LBb + 2% NaCl ajustando la densidad óptica (OD) a 600 nm (0.4–0.6, según cepa), de las cuales se obtuvieron diluciones en serie con solución salina estéril (SS + 2% NaCl) para posteriores experimentos.

6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE LAS MEZCLAS DE KDF-EO MEDIANTE MIC Y MBC

Se establecieron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (MBC), para seleccionar las concentraciones que serían aplicadas en el agua de cultivo de larvas de *P. vannamei*, con el propósito de reducir la carga bacteriana sin comprometer la salud animal. Para el MIC se utilizó placas de 96 micropocillos usando la técnica descrita por Domínguez-Borbor (2020), en cada pocillo se añadió 160 µl de LBb + NaCl al 2% + 20 µl de KDF-EO a diferentes concentraciones evaluadas (31.w, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 µg ml⁻¹) + 20 µl de inóculo bacteriano (2×10^8 UFC/ml) y como control positivo se usará un antibiótico (oxitetraciclina 10 µl/mL) y control negativo (KDF-EO sin inóculo), usando 3 réplicas para cada tratamiento.

Las microplacas inoculadas con la cepa fueron incubaron a 28°C durante 24 h. La MIC se identificó como la dosis más baja que afectó la concentración de las bacterias medida por OD_{600nm} en espectrofotómetro Varioskan Lux 0315. Para determinar la MBC, se sembró en agar TSA suplementada con NaCl al 2% los cultivos correspondientes a los pocillos seleccionados para el MIC, implementando tres diluciones superiores e inferiores siendo incubadas a 28 °C durante 24 horas. Posteriormente, la MBC se consideró como la

menor concentración de KDF-EO en la que no se evidenció crecimiento bacteriano y se expresó en mg L⁻¹ para cada cepa evaluada.

6.4. TOXICIDAD IN VITRO CON HEMOCITOS DE CAMARÓN

Se determinó la toxicidad del KDF-EO, mediante la exposición directa de los hemocitos del camarón, siguiendo la metodología de Domínguez-Borbor et al. (2018), la cual consiste en la evaluación del efecto citotóxico de aditivos y productos terapéuticos que se usarán en ensayos con camarón en un tiempo máximo de 6 horas. Para ello, se recolectó hemolinfa de camarones sanos para preparar una suspensión primaria de células. Las células fueron activadas usando una solución modificada de HBSS con Ca²⁺ y Mg²⁺, la cual preserva el metabolismo hemocítico durante la prueba. Posteriormente, se incorporó las dosis del KDF-EO en las placas, siendo incubadas durante 6 horas a temperatura ambiente. Finalmente se aplicó el reactivo tetrazolio (MTT) y se midió espectrofotométricamente la formazán de las células viables, determinando la viabilidad metabólica como citotoxicidad, evitando exponer a organismos vivos al compuesto. Los resultados se expresaron como porcentajes de viabilidad de celular, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular OD (OD células expuestas/OD células control) } 100\% = \times.$$

6.5. TOXICIDAD IN VIVO EXPOSICIÓN DIRECTA

Para la exposición directa *in vivo* en *P. vannamei* se evaluó siguiendo la metodología descrita por Domínguez-Borbor, et al., (2020), inicialmente se trabajó con post larvas de *penaeus vannamei* expuestos a concentraciones graduales usando 3 productos: KDF+EO-10, KDF+EO-20, KDF+EO-30 a concentraciones de durante 24 horas para evaluar su efecto sobre la sobrevivencia en función con el tiempo de aplicación. Después de comprobar la eficiencia de las dosis evaluadas se realizó un desafío frente a *V. parahaemolyticus*, inoculando la bacteria en los grupos experimentales simulando una infección bacteriana y comparar la sobrevivencia con tratamiento control infectado sin tratamiento. Este estudio permitió identificar entre el posible efecto tóxico de KDF+EO por sí mismo o si su

aplicación ayudó a la disminución de la mortalidad asociada a la infección bacteriana.

6.6. EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA

Para el tratamiento *in vivo* se trabajó con post-larvas de *P. vannamei* (pL3) durante un periodo de 72 horas. Se evaluaron tres concentraciones por productocada uno con 3 réplicas, además de un tratamiento control. Los organismos se mantuvieron en vasos de 2 L usando 100 post-larvas/litro.

La carga de *V. parahaemolyticus*, se determinó siguiendo la metodología descrita por Miranda-Baeza et al. (2015), con modificaciones de acuerdo con el diseño experimental. Se cuantificó la carga bacteriana tanto en el agua de cultivo como en las larvas de *P. vannamei* antes de la aplicación de los tratamientos (Antes), al momento de la primera aplicación (T0) a las 24 horas posteriores (T1), a las 48 horas (T2), cuando se realizó una segunda aplicación de los productos, y a las 72 horas (T3), correspondientes al efecto final del tratamiento. Para cada tratamiento se recolectó 0.1 g de muestra biológica y muestras de agua de cultivo para el análisis microbiológico. Las muestras fueron sometidas a diluciones seriadas 1/10 con solución salina estéril 2 % Na Cl. Posteriormente, cada dilución se inoculó mediante extensión en superficie sobre placas de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) suplementado con 1,5 % de NaCl; las placas se incubaron a 28-30 °C durante 24-48 horas. Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de colonias, expresando los resultados como UFC/g para las muestras biológicas y UFC/mL para el agua de cultivo. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la reducción de la carga bacteriana se expresó en escala logarítmica.

7. RESULTADOS

7.1. ***EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PRODUCTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *V. parahaemolyticus* AGENTE CAUSAL DE AHPND***

En la Figura 1 se observa el comportamiento de la cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* durante de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de P1(KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30). En los tres productos se observó un crecimiento progresivo de los valores registrados durante las primeras horas de evaluación, seguido de una tendencia hacia la estabilización a partir de aproximadamente las 14 horas. La respuesta de crecimiento varió en función de la concentración evaluada.

Para P1 (KDF+EO-10), las concentraciones de 2000 y 1000, 250 y 125 µg/mL presentaron un incremento progresivo de los valores hasta alcanzar aproximadamente 0,8 – 0,9 alrededor de las 14 horas, seguido de una tendencia hacia la estabilización durante el resto del ensayo. En la concentración de 500 µg/mL se observó un crecimiento retardado respecto a las demás concentraciones, con un valor aproximado de 0,28 a las 12 horas y de 0,70 a las 14 horas. Posteriormente la curva mostró una tendencia hacia la estabilización. En contraste, las concentraciones de 62,5 y 31,5 µg/mL permanecieron en 0 durante todo el periodo de evaluación, comportamiento comparable al observado en el control y el control con antibiótico.

Para P2 (KDF+EO-20), las concentraciones de 2000 y 1000, 250 y 125 µg/mL mostraron un patrón de crecimiento progresivo, alcanzando valores cercanos de 0,9 alrededor de las 14 horas y posteriormente una tendencia a la estabilización. La concentración de 500 µg/mL presentó un crecimiento más lento, alcanzando aproximadamente 0,50 a las 12 horas y 0,70 – 0,75 entre las 14 y 16 horas, para posteriormente mantenerse en valores cercanos a 0,75 – 0,80. Por su parte, las concentraciones de 62,5 y 31,5 µg/mL permanecieron en 0 durante el periodo de evaluación, al igual que los controles.

P3 (KDF+EO-30) presentó una dinámica de crecimiento similar a P1 y P2. En las concentraciones de 125, 250, 1000 y 2000 $\mu\text{g/mL}$, se evidenció un incremento progresivo en la densidad óptica, llegando a 0,9 aproximadamente a las 14 horas. Después, se observó que los valores se mantuvieron relativamente estables, con pequeñas variaciones. A 500 $\mu\text{g/mL}$ el crecimiento fue lento, alcanzando valores aproximados de 0,45 (12 horas) y 0,70 (14 horas), incrementando aproximadamente hasta 0,75 – 0,80. Por su parte, las concentraciones de 31,2 y 62,5 $\mu\text{g/mL}$, al igual que el control no registraron crecimiento durante todo el ensayo.

En conjunto, los tres productos presentaron un comportamiento dependiente de las concentraciones. Las concentraciones de 2000, 1000, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ mostraron un crecimiento bacteriano marcado, mientras que 500 $\mu\text{g/mL}$ produjo un retraso en la dinámica de crecimiento y alcanzó valores inferiores durante las primeras horas de evaluación. Por su parte, a 31,2 y 62,5 $\mu\text{g/mL}$ no hubo cambios en la densidad óptica durante las 24 horas del ensayo, manteniendo un comportamiento parejo al de los controles.

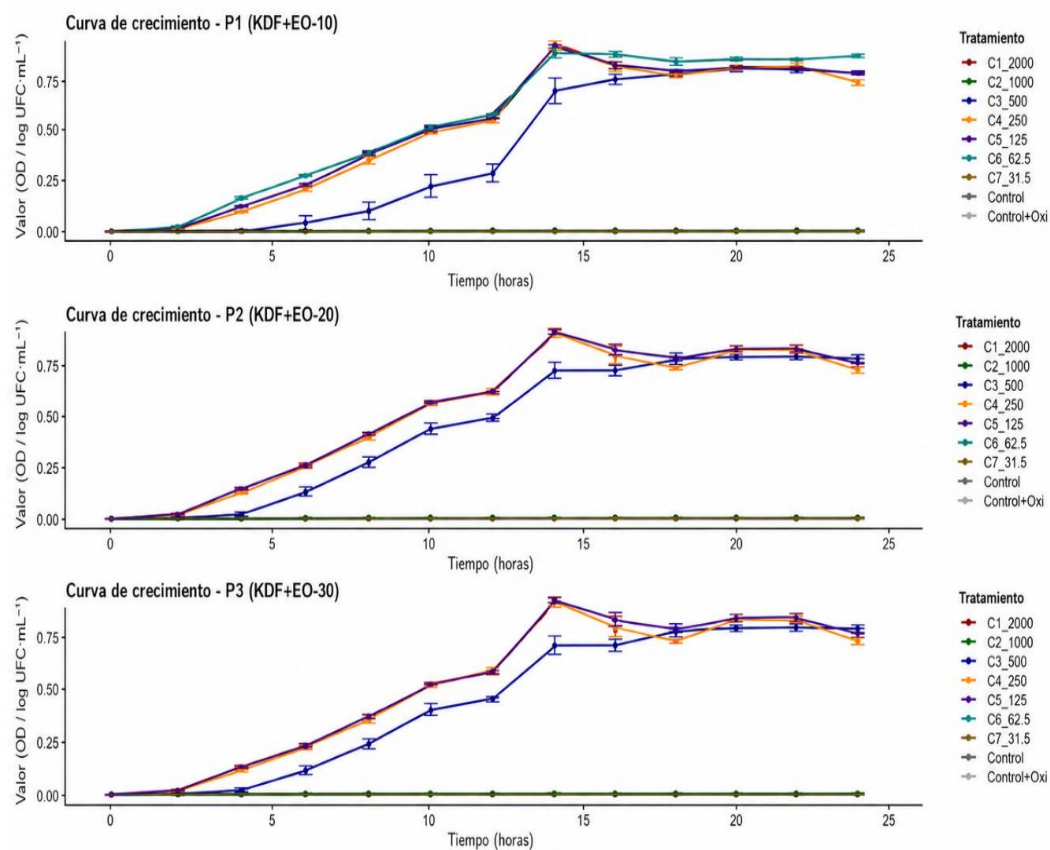


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* expuesto a diferentes concentraciones de los productos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) por 24 horas. A) Cinética de crecimiento de *V. parahaemolyticus* expuesto a diferentes concentraciones del producto P1 (KDF+EO-10). B) Cinética de crecimiento de *V. parahaemolyticus* expuesto a diferentes concentraciones del producto P2 (KDF+EO-20). C) Cinética de crecimiento de *V. parahaemolyticus* expuesxto a diferentes concentraciones del producto P3 (KDF+EO-30).

7.2. ACTIVIDAD INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE LAS FORMULACIONES DE KDF-EO CONTRA *V. parahaemolyticus* BA94C2

Las formulaciones P1(KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) presentaron una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 250 µg/mL frente a *Vibrio parahaemolyticus* (cepa BA94C2), mientras que los valores de concentración mínima bactericida (MBC) fueron de 300 µg/mL para P1(KDF+EO-10) y 250 µg/mL para P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) (Tabla 1). Los resultados evidenciaron que los tres productos presentaron actividad inhibitoria frente a la cepa evaluada; sin embargo, P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) mostraron un efecto bactericida a la misma concentración en la que inhibieron el crecimiento bacteriano. En contraste, P1(KDF+EO-10) requirió una concentración ligeramente superior para alcanzar el efecto bactericida.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) para las formulaciones P1(KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30). frente a la cepa BA94C2 de *Vibrio parahaemolyticus*.

<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (cepa BA94C2)		
Productos	MIC = µg/mL	MBC µg/mL
P1 (KDF+EO-10)	250	300
P2 (KDF+EO-20)	250	250
P3 (KDF+EO-30)	250	250

7.3. TOXICIDAD IN VITRO MEDIANTE ENSAYO MMT EN HEMOCITOS DE *P. VANNAMEI*

La Figura 3 muestra la viabilidad celular de los (hemocitos) y los larvas de *P. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de los productos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30). En los tres productos se observaron valores de viabilidad cercanos o superiores al 95 % a las concentraciones más bajas (31,2; 62,5 y 125 µg/mL), sin diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control. A 250 µg/mL se observó

una disminución más evidente de la viabilidad celular en P1 (KDF+EO-10) y P3 (KDF+EO-30), sin embargo, ninguno de los productos presentó diferencias significativas respecto al control (Fig. 3).

A partir de 500 µg/mL se observó una disminución de viabilidad celular en los tres productos. En P1 (KDF+EO-10), las concentraciones de 500, 1000 y 2000 µg/mL presentaron valores aproximados de 78, 77 y 69% respectivamente, evidenciándose una disminución significativa de la viabilidad de los hemocitos respecto al control ($p < 0.05$) (Fig. 3). En P2 (KDF+EO-20), las concentraciones de 500, 1000 y 2000 µg/mL presentaron valores aproximados de 86, 81 y 80% respectivamente, observándose una disminución significativa de la viabilidad celular respecto al control ($p < 0.05$). Para P3 (KDF+EO-30), las concentraciones de 500, 1000 y 2000 µg/mL registraron valores aproximados de 85, 84 y 81%, respectivamente, evidenciándose igualmente una disminución significativa de la viabilidad de hemocitos respecto al control ($p < 0.05$). En conjunto, los resultados muestran una reducción de la viabilidad celular a partir de 500 µg/mL, con una mayor disminución a 2000 µg/mL, particularmente para P1 (KDF+EO-10) y P3 (KDF+EO-30).

En conjunto, los resultados evidencian una reducción de la viabilidad celular a partir de 500 µg/mL en los tres productos, mientras que las concentraciones de 31,5 a 250 µg/mL mantuvieron valores de viabilidad similares al control. Los porcentajes de viabilidad más bajos fueron a 2000 µg/mL, particularmente para P1 (KDF+EO-10) y P3 (KDF+EO-30)

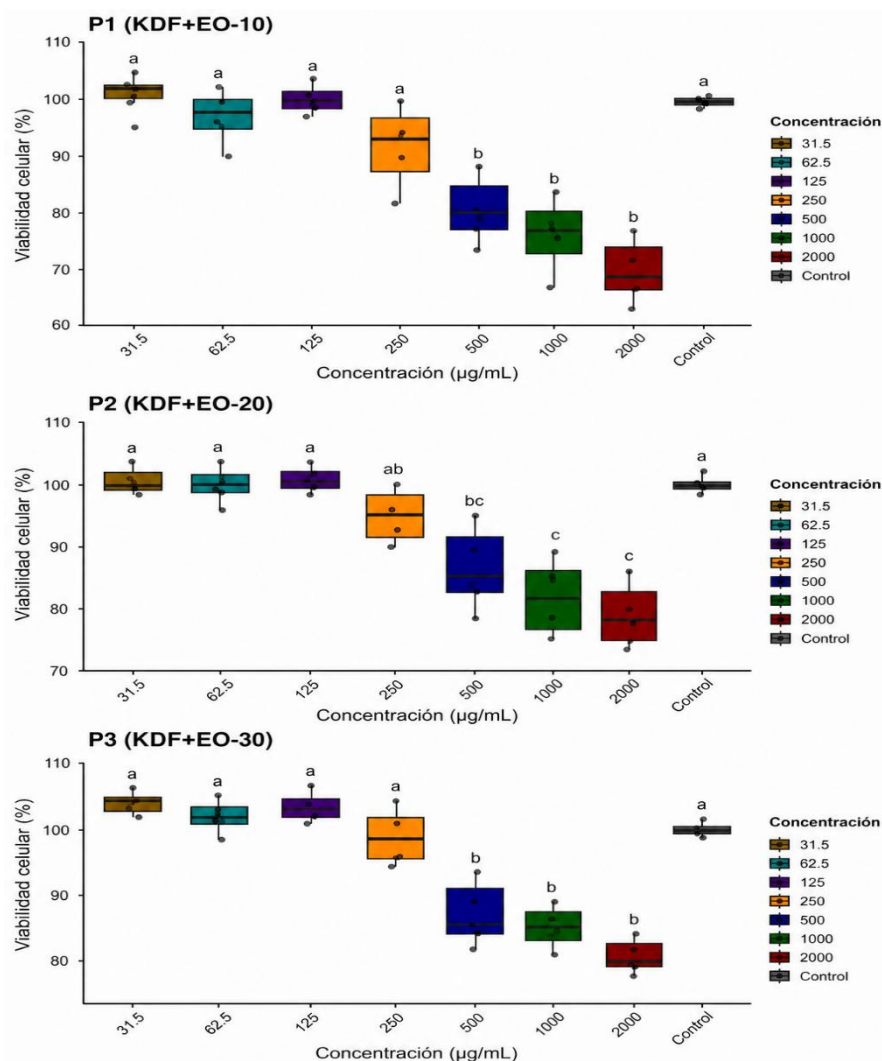


Figura 3. Viabilidad celular de los organismos expuestos a diferentes concentraciones de los productos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30). A) Viabilidad celular después de la exposición al producto P1 (KDF+EO-10). B) Viabilidad celular después de la exposición al producto P2 (KDF+EO-20). C) Viabilidad celular después de la exposición al producto P3 (KDF+EO-30).

7.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC50)

Los productos P1(KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) presentaron diferentes valores de LC50 frente a las larvas evaluados (Figura 2). En el menor valor de

LC50 fue registrado para P3 (KDF+EO-30), con 1600,48 $\mu\text{g/mL}$, seguido de P2 (KDF+EO-20) con 1762,08 $\mu\text{g/mL}$ y P1(KDF+EO-10) con 2153,43 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados indican que P3 (KDF+EO-30) alcanzó el 50 % de mortalidad a una menor concentración, seguido de P2 (KDF+EO-20) y P1(KDF+EO-10), lo que sugiere una mayor respuesta tóxica para P3 (KDF+EO-30) bajo las condiciones experimentales evaluadas.

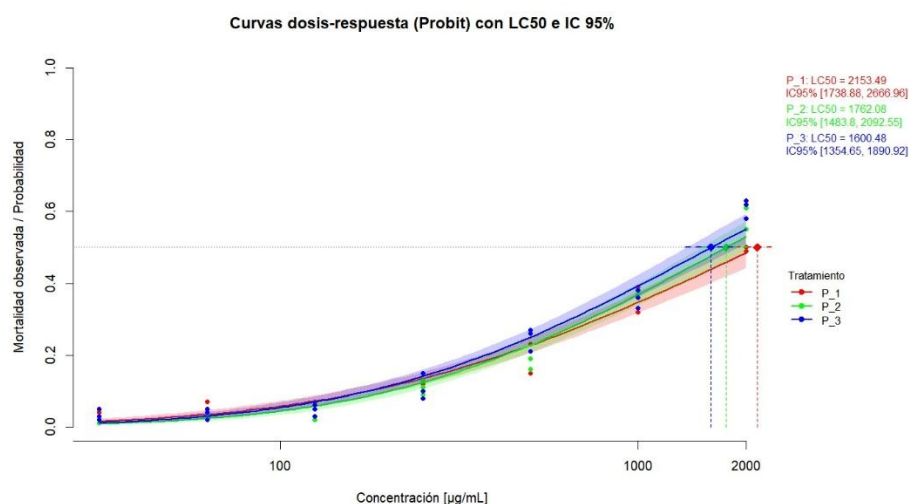


Figura 2. Curvas dosis-respuesta mediante análisis Probit para la estimación de la concentración letal media (LC50) de los productos P1(KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) en pL de *P. vannamei*. Las líneas discontinuas indican la concentración correspondiente al 50 % de mortalidad y las bandas sombreadas representan los intervalos de confianza del 95 %.

7.5. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VIVO MEDIANTE LA SOBREVIVENCIA DE POST-LARVAS DE *P. VANNAMEI*

La Figura 4 muestra la supervivencia relativa al control de los organismos expuestos a diferentes concentraciones de los productos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30). En los tres productos se observó una disminución de la supervivencia conforme aumentó la concentración evaluada. Las concentraciones más bajas (31,2; 62,5 y 125 $\mu\text{g/mL}$) mantuvieron valores cercanos al 100 % de supervivencia, similares al control. Desde 250 $\mu\text{g/mL}$ se observó una disminución de la supervivencia, con valores aproximados

al 90 % a la concentración de 250 µg/mL, 75–85 % para 500 µg/mL y 65 % para 1000 µg/mL. La menor supervivencia se registró con concentraciones de 2000 µg/mL en los tres productos, alcanzando el 50% para P1, 43% para P2 y 39 % para P3g.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de 31,2, 62,5 y 125 µg/mL y el control en ninguna de las formulaciones. A partir de 250 µg/mL, la supervivencia normalizada fue significativamente menor que la registrada en el control, con una reducción más pronunciada a 1000 y 2000 µg/mL. Esta última concentración presentó los valores más bajos de supervivencia en P1, P2 y P3, mostrando una disminución dependiente de la concentración.

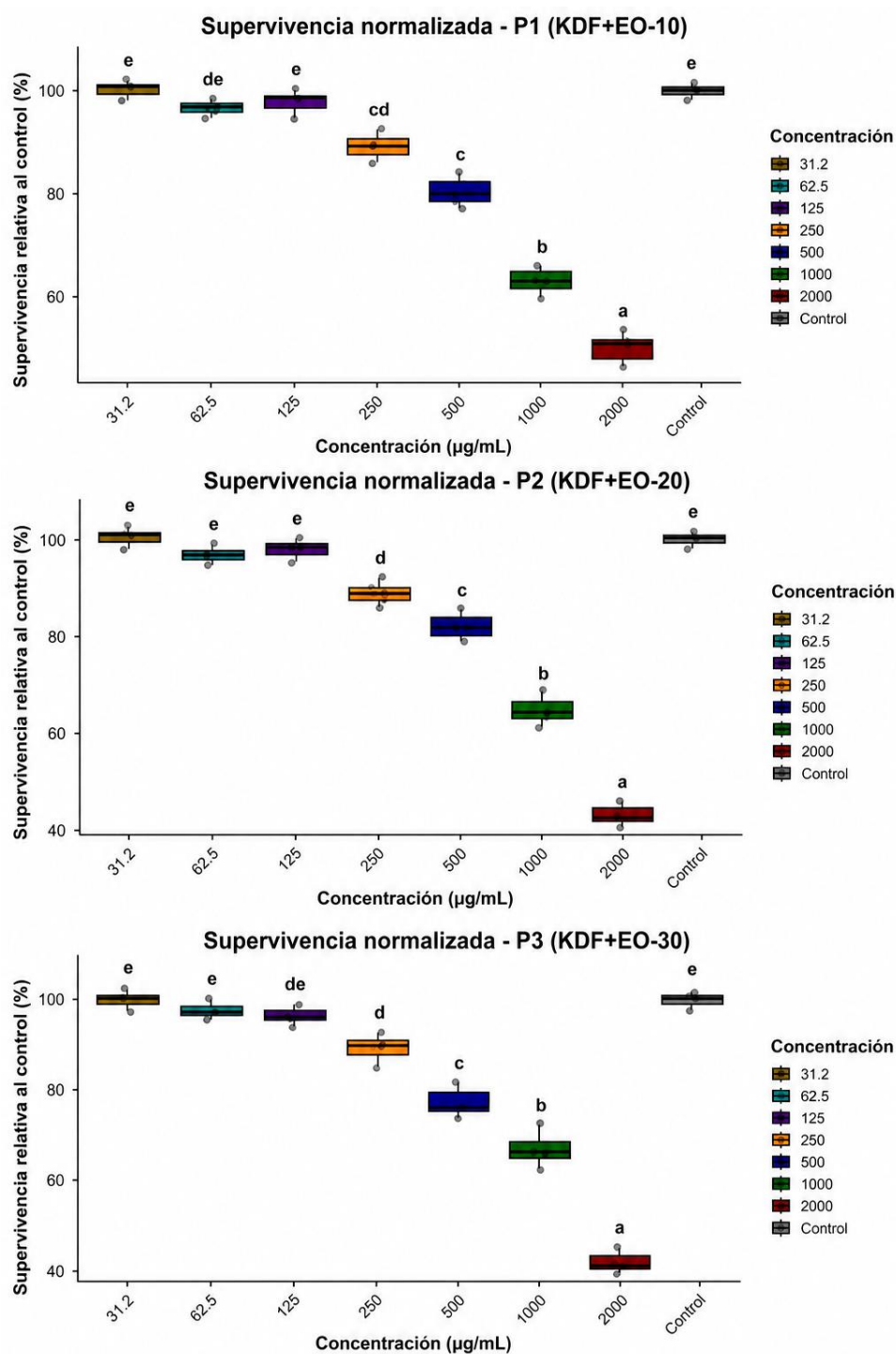


Figura 4. Supervivencia relativa al control de los organismos expuestos a diferentes concentraciones de los productos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30). A) Supervivencia relativa al control después de la exposición al producto P1 (KDF+EO-10). B) Supervivencia relativa al control después de la exposición al producto P2 (KDF+EO-20). C) Supervivencia relativa al control después de la exposición al producto P3 (KDF+EO-30).

7.6. EVALUACIÓN *in vivo* DE LA CARGA DE *V. parahaemolyticus* EN AGUA DE CULTIVO

La carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* varió durante las 72 horas de evaluación (Figura 5). Antes de la aplicación del producto y en T0, los tratamientos registraron recuentos de 10^5 - 10^6 UFC/mL, sin diferencias significativas respecto al control. A las 24 horas de la primera aplicación (T1), todos los tratamientos presentaron una disminución significativa de la carga bacteriana respecto al control, con valores entre $1,2 \times 10^5$ y $5,5 \times 10^5$ UFC/mL mientras que en el control el recuento aumentó hasta aproximadamente $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. En T2, antes de la segunda aplicación, la carga bacteriana incrementó en algunos tratamientos y los recuentos de bacterias no presentaron diferencias significativas respecto al control. A las 72 horas (T3), todos los tratamientos mostraron nuevamente recuentos significativamente menores que el control, cargas bacterianas aproximadas de 2×10^4 UFC/mL y 4×10^5 UFC/mL. Al terminar la evaluación, P2_C1 presentó el menor recuento bacteriano, con cargas de aproximadas de 2×10^4 UFC/mL. En conjunto, las reducciones significativas observadas en T1 y T3 muestran que la disminución de *V. parahaemolyticus* ocurrió después de cada aplicación del producto.

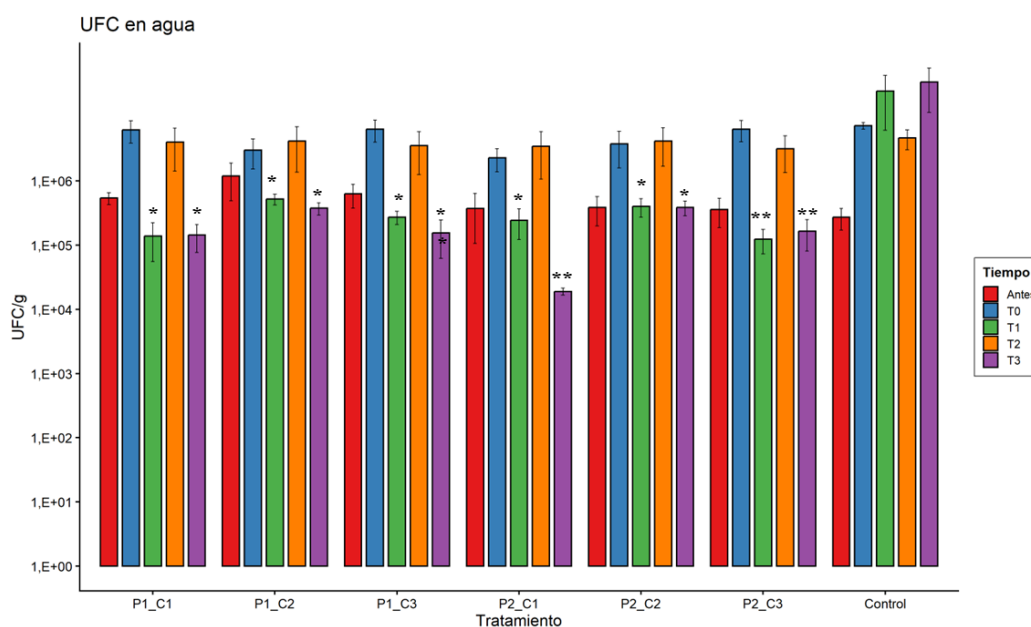


Figura 5. Variación de la carga de *V. parahaemolyticus* en el agua durante 72 horas de exposición de los tratamientos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) a diferentes

concentraciones. Se presentan los valores de UFC/mL registrados antes de la aplicación, a las 0, 24, 48 y 72 horas. T0 corresponde al momento de la primera aplicación del producto, T1 a las 24 horas posteriores a la primera aplicación, T2 a las 48 horas y momento de la segunda aplicación, y T3 a las 72 horas, correspondiente al efecto posterior a la segunda aplicación. El control corresponde al tratamiento sin aplicación del producto.

7.7. DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE *V. parahaemolyticus* EN PL DE *P. vannamei*

En las muestras de larvas, los recuentos de la carga de *V. parahaemolyticus* obtenidos de las muestras de PL presentaron variaciones durante el periodo de evaluación (Figura 6). En T0 antes de aplicar el producto no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control. A las 24 h, los tratamientos tuvieron recuentos de cargas bacterianas entre 3×10^3 UFC/mL y $2,5 \times 10^5$ UFC/g, significativamente inferiores al obtenido en el control ($1,5 \times 10^7$ UFC/g.). En T2, antes de la segunda aplicación del producto, los recuentos bacterianos aumentaron respecto a T1 en varios de los tratamientos, sin embargo, continuaron siendo significativamente menores que el tratamiento control. En T3 las cargas bacterianas de todos los tratamientos volvieron a ser inferiores que el control, cuyo recuento incrementó hasta 2×10^7 UFC/g. Al finalizar el ensayo, P2_C3 presentó la menor carga bacteria ($2,5 \times 10^3$ UFC/g). La respuesta observada en PL siguió la tendencia registrada en el agua, con menores cargas en T1 y T3, correspondientes a los muestreos después de cada aplicación.

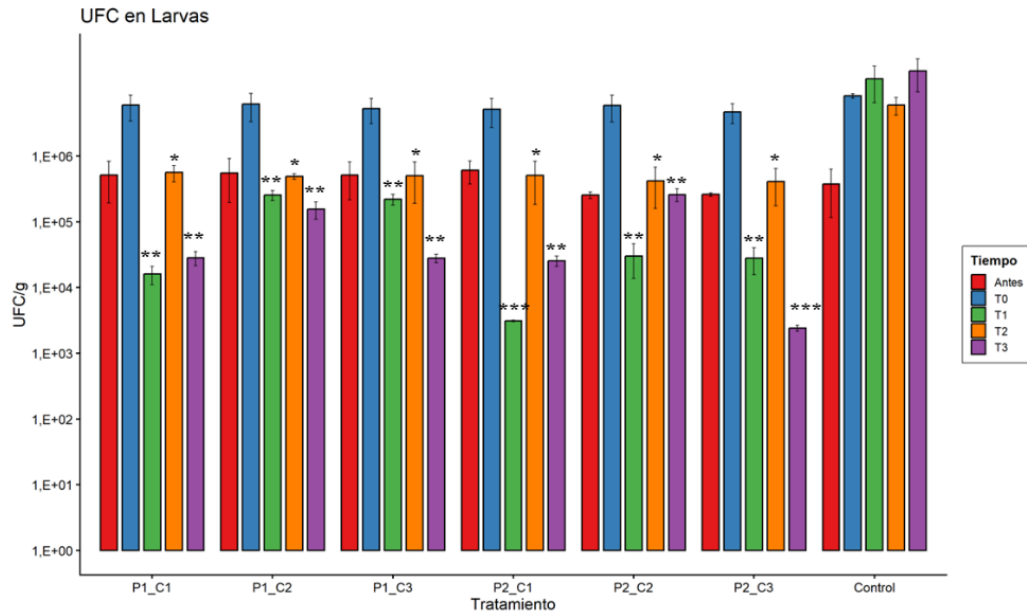


Figura 6. Variación de la carga de *V. parahaemolyticus* en larvas de *P. vannamei* durante 72 horas de evaluación de los tratamientos P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) a diferentes concentraciones. Se presentan los valores de UFC/g registrados antes de la aplicación, a las 0, 24, 48 y 72 horas. T0 corresponde al momento de la primera aplicación del producto, T1 a las 24 horas posteriores a la primera aplicación, T2 a las 48 horas y momento de la segunda aplicación, y T3 a las 72 horas, correspondiente al efecto posterior a la segunda aplicación. El control corresponde al tratamiento sin aplicación del producto.

8. DISCUSIÓN

8.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EO FRENTE A BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

El aceite esencial de orégano ha demostrado actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias gramnegativas, incluidas especies del género *Vibrio*, efecto relacionado principalmente con la presencia de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol (Dawood et al., 2022). En este trabajo, las formulaciones de P1 (KDF+EO-10), P2 (KDF+EO-20) y P3 (KDF+EO-30) inhibieron el crecimiento de *V. parahaemolyticus* (BA94C2) a una concentración de 250 µg/mL, La MBC fue de 300 µg/mL para P1 y de 250 µg/mL para P2 y P3. En conjunto, estos resultados muestran que las formulaciones evaluadas presentaron actividad inhibitoria y bactericida frente a la cepa estudiada. Debido a que todas contenían EO, este componente podría haber contribuido a la respuesta antibacteriana observada, aunque su efecto no puede separarse experimentalmente del ejercido por el KDF.

Estos hallazgos pueden compararse con los de Domínguez-Borbor et al. (2025), quienes evaluaron exclusivamente aceite esencial de orégano frente a la misma cepa BA94C2 y determinaron un MIC de 500 µg/mL y una MBC de 600 µg/mL. En el presente estudio, las formulaciones de KDF+EO alcanzaron la inhibición y el efecto bactericida a concentraciones nominales menores. Aunque esta diferencia respalda la posible contribución del EO, no puede atribuirse únicamente a este componente, debido a la presencia simultánea de KDF y a las diferencias en la composición de las formulaciones.

De manera similar, Luo et al. (2022) determinaron valores de MIC y MBC entre 0,06 y 0,15 µg/mL para el aceite esencial de orégano frente a cuatro cepas de *Vibrio vulnificus*. No obstante, la comparación directa con los resultados de esta investigación está limitada por las diferencias de unidades de concentración, la composición de las formulaciones y las especies de *Vibrio* evaluadas. Los autores relacionaron esta actividad con una disminución

del ATP intracelular, el incremento del estrés oxidativo y la alteración de la permeabilidad de la membrana bacteriana. Estos mecanismos podrían contribuir a explicar los resultados obtenidos; sin embargo, su participación en la respuesta de *V. parahaemolyticus* BA94C2 no fue evaluada directamente en esta investigación.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Luo et al. (2022), quienes evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de orégano frente a diferentes cepas de *Vibrio vulnificus* y observaron una inhibición del crecimiento bacteriano al incrementar la concentración del extracto. De manera similar, Lambert et al. (2001) demostraron que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas se relaciona principalmente con la acción de compuestos como timol y carvacrol, demostrando que su acción bactericida se atribuye principalmente a los monoterpenos fenólicos timol y carvacrol. Estos compuestos incrementan la permeabilidad de la membrana citoplasmática y alteran la homeostasis celular, provocando la pérdida del equilibrio osmótico y comprometiendo la viabilidad bacteriana (referencias).

De manera complementaria, la actividad antimicrobiana del EO ha sido ampliamente documentada frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, lo que fortalece la interpretación de los resultados obtenidos en la presente investigación. Lambert et al. (2001), analizaron el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de orégano, timol y carvacrol sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, demostrando que su acción bactericida se atribuye principalmente a la acción conjunta de los monoterpenos fenólicos timol y carvacrol. Estos compuestos incrementan la permeabilidad de la membrana citoplasmática y alteran la homeostasis celular, provocando la pérdida del equilibrio osmótico y comprometiendo la viabilidad bacteriana. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Luo et al. (2022), quienes describieron que la inhibición del crecimiento de especies de género *Vibrio* no depende de un único mecanismo, sino de una respuesta multifactorial que involucra el deterioro de la integridad de la membrana, la alteración del metabolismo energético y la inducción al estrés oxidativo. En conjunto, estas evidencias respaldan la disminución de la carga de *V. parahaemolyticus* evidenciada en el presente estudio, sugiriendo que la acción del extracto de orégano responde a mecanismos

celulares conservados entre diferentes bacterias.

Los resultados obtenidos en la presente investigación podrían atribuirse no solo a la actividad bactericida del EO, ampliamente descritas por Lambert, et al. (2001) y Luo, et al. (2022), sino también a su capacidad para disminuir el factor de virulencia de *V. parahaemolyticus*. En este sentido, Rodríguez et al. (2024), demostraron que el EO inhibe la síntesis de exopolisacáridos y reduce la formación de biopelículas y la motilidad bacteriana, procesos esenciales para la adhesión, colonización y persistencia del organismo en el hospedador. Asimismo, a través de un análisis transcriptómica, los autores evidenciaron una disminución en la expresión de genes asociados con la integridad de la membrana celular, la motilidad, y el transporte de moléculas, el metabolismo energético, y los sistema de secreción indicando que el extracto ejerce un efecto antimicrobiano multifactorial. En este contexto, estas alteraciones no solo comprometen la viabilidad de la bacteria, sino que también reducen su capacidad de establecer procesos infecciosos, lo que constituye una explicación plausible para la disminución de la carga de *V. parahaemolyticus* observada en el presente estudio.

8.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DIFORMIATO DE POTASIO Y EXTRACTO DE ORÉGANO

La reducción de la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* observada en la presente investigación evidencia el potencial del diformiato de potasio (KDF), como una estrategia para el control de este patógeno en sistemas de acuícolas. Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones disponibles han evaluado el KDF como un aditivo funcional incorporado en el alimento. En este contexto, Chen et al., (2024) reportaron que este compuesto ejerce su efecto antimicrobiano mediante la liberación gradual de ácido fórmico en el tracto digestivo, lo que disminuye el pH intestinal e interfiere con procesos metabólicos esenciales para el crecimiento de bacterias patógenas, además de contribuir al equilibrio del microbiota intestinal. En contraste, en la evaluación *in vivo*, se realizó la aplicación directa en el agua de cultivo de KDF en combinación con EO, obteniéndose una reducción significativa de la carga de *V. parahaemolyticus*. Los resultados evidenciados sugireren que el KDF conserva

su actividad antimicrobiana cuando es aplicada en el medio acuático.

Esta explicación es consistente con estudios experimentales que han evaluado el efecto del ácido fórmico (AF) frente a bacterias del género *Vibrio*. Mine & Boopathy, (2011) demostraron que el AF ejerció mayor efecto inhibitoria frente a *V. harveyi* en comparación con otros ácidos orgánicos, atribuyendo su eficacia a que la difusión de la forma no disociada del ácido puede atravesar la membrana citoplasmática bacteriana. Una vez en el interior de la célula, el ácido se ioniza y libera protones (H^+) disminuyendo el pH intracelular. Para contrarrestar este desequilibrio, la bacteria destina una gran cantidad de ATP destinados a la expulsión de protones que se han acumulado, ocasionando una reducción de la energía destinada para funciones metabólicas como, transporte de solutos, división celular y biosíntesis. En la misma línea, Adams & Boopathy, (2013), reportaron que el AF representa una efectiva estrategia para el control de bacterias del género *Vibrio* debido a que disminuye su proliferación en sistemas acuícolas. En conjunto, estas evidencias sustentan un mecanismo fisiológico plausible mediante el cual, el KDF contribuye a la disminución de la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus*.

Hasta la fecha, no se han encontrado estudios que describan el mecanismo de acción de la combinación entre el KDF y el EO. No obstante, los mecanismos reportados para cada compuesto de manera individual permiten proponer una hipótesis mecanística que explique el efecto antibacteriano evidenciado en la presente investigación.

8.3. POSIBLE ACCIÓN COMPLEMENTARIA DEL KDF + EO FRENTE A *V. PARAHAEMOLYTICUS*

Hasta el momento no se han encontrado estudios que describan el mecanismo de acción de la combinación entre el KDF y el EO. No obstante, los mecanismos descritos para cada compuesto de manera individual permiten plantear una posible acción complementaria sobre el efecto antibacteriano evidenciado en la presente investigación.

En este contexto, es probable que la combinación de diformiato de potasio y aceite esencial de orégano ejerza una acción complementaria sobre diferentes blancos celulares bacterianos. Mientras que los compuestos bioactivos del EO, principalmente el timol y carvacrol, alteran la integridad y funcionalidad de la membrana citoplasmática, incrementando su permeabilidad (Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002), esta alteración probablemente disminuye la capacidad de la membrana para actuar como barrera selectiva, lo que potencialmente favorecería la difusión del AF en su forma no disociada, liberada a partir del KDF, hacia el interior de la célula (Ricke, 2003). Una vez en el interior celular, dónde el pH es cercano a la neutralidad, el AF se disocia y libera protones (H^+), provocando la acidificación del citoplasma (Lambert & Stratford, 1999). Como respuesta a este desequilibrio, la bacteria debe destinar gran parte de su reserva energética en la activación de bombas de protones dependientes de ATP para expulsar el exceso de H^+ y recuperar la homeostasis del pH intracelular (Krulwich, Sachs, & Padan, 2011). Este proceso incrementa considerablemente la demanda energética de la célula y reduce la disponibilidad de ATP para funciones metabólicas esenciales, como la biosíntesis de macromoléculas, el transporte activo de solutos, la división celular y replicación del ADN (Guan & Liu, 2019). En consecuencia, el metabolismo de las bacterias se ve afectado, limitando la capacidad de crecimiento y proliferación bacteriana.

8.4. TOXICIDAD DE LA FORMULACIÓN DE KDF+EO

La evaluación de la toxicidad mostró una respuesta dependiente de la concentración. Entre 31,2 y 125 $\mu\text{g/mL}$, la viabilidad de los hemocitos se mantuvo cercana o superior al 95% y la supervivencia de la postlarvas fue similar al control. A 250 $\mu\text{g/mL}$ comenzó a disminuir significativamente la supervivencia, mientras que la reducción de la viabilidad celular fue más evidente desde 500 $\mu\text{g/mL}$. Mediante el análisis de concentración-respuesta, la LC_{50} fue 2153,43 $\mu\text{g/mL}$ para P1, 1762,08 $\mu\text{g/mL}$ para P2 y 1600,48 $\mu\text{g/mL}$ para P3, lo que indica una mayor toxicidad aguda *in vivo* para P3.

Estos resultados coinciden parcialmente con Dominguez-Borbor et al. (2018), quienes no observaron efectos significativos sobre la viabilidad de hemocitos de *P.*

vannamei expuestos al EO a concentraciones entre 0,1; 1 y 10 µg/mL. En su evaluación *in vivo*, la exposición de postlarvas a 10 µg/mL produjo únicamente una reducción aproximada del 10% en la supervivencia. En la presente investigación, la supervivencia disminuyó significativamente desde 250 µg/mL, antes de observarse una reducción generalizada de la viabilidad celular, lo que sugiere una mayor sensibilidad de las postlarvas respecto a los hemocitos aislados. Esta diferencia podría relacionarse con el ensayo MTT evalúa la actividad metabólica celular, mientras que en el organismo completo intervienen respuestas fisiológicas adicionales.

El LC50 fue aproximadamente entre 6,4 y 8,4 veces superior al MIC de 250 µg/mL. Sin embargo, esta diferencia no representa un intervalo del todo seguro ya que, la supervivencia disminuyó significativamente. Sotomayor et al. (2019), también observaron respuestas diferentes entre las formulaciones de ácidos orgánicos contra *Vibrio*. Algunos conservaron la viabilidad de los hemocitos en concentraciones bajas, pero la redujeron al aumentar la dosis. En concordancia, los resultados del presente estudio indican que una mayor actividad antibacteriana no implica necesariamente una mayor seguridad, por lo que la concentración de aplicación debe seleccionarse considerando simultáneamente la reducción bacteriana y los efectos subletales sobre las postlarvas.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que las formulaciones elaboradas con diformiato de potasio y extracto de orégano tuvieron efecto inhibitorio y bactericida contra a *V. parahaemolyticus* BA94C2. En los tres productos formulados, la CMI fue de 250 µg/mL, por otro lado, la CMB para P1 fue de 300 µg/mL, para P2 y P3 fue de 250 µg/mL. En los ensayos de citotoxicidad en hemocitos y de exposición *in vivo*, las concentraciones ≥ 500 µg/mL produjeron una mayor afectación celular y una menor supervivencia, mientras que las dosis inferiores ocasionaron menos efectos sobre los organismos. Durante el ensayo *in vivo*, los tratamientos presentaron cargas de *V. parahaemolyticus* significativamente menores que el control en el agua y en PL a las 24 y 72 horas post aplicación. No obstante, el incremento bacteriano observado antes de la segunda aplicación sugiere que el efecto no se mantuvo durante todo el intervalo de evaluación, por lo que la frecuencia de dosificación es un factor relevante en su efectividad. En conjunto, las formulaciones de KDF+EO demuestran un potencial con una mediada para reducir la carga bacteriana de *P. vannamei* aunque aún deben realizarse evaluaciones sobre la interacción de sus componentes, su funcionamiento a mayor escala, la seguridad durante periodos prolongados y su influencia en el rendimiento productivo y la calidad de agua.

10.RECOMENDACIONES

- a) Realizar ensayos preliminares en unidades de cultivo de mayor escala, con el fin de verificar la eficiencia de KDF+EO para reducir la carga de *V. parahaemolyticus*.
- b) Evaluar distintos intervalos de aplicación de KDF+EO en el agua de cultivo, para poder establecer un protocolo de aplicación efectivo.
- c) Profundizar en la evaluación de la respuesta de larvas frente a las formulaciones, incorporando parámetros adicionales de salud y desempeño, entre ellas la ganancia de peso e indicadores productivos, para determinar posibles efectos asociados al uso del producto.
- d) Realizar diferentes estudios relacionados con la calidad de agua, considerando parámetros como temperatura, salinidad, pH, materia orgánica, con el propósito de determinar el efecto del producto.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D., & Boopathy, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, 68, 1017–1021. doi:<https://doi.org/10.2478/s11756-013-0251-x>
- Asfour, H. (2018). Anti-quorum sensing natural compounds. *Journal Of Microscopy And Ultrastructure*, 6(1), 1. doi:https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_10_18
- Baker-Austin, C., Trinanes, J., Taylor, N., Hartnell, R., Siitonen, A., & Martinez-Urtaza, M. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Clim Change*, 3(1), 73–77. doi:<https://doi.org/10.1038/nclimate1628>
- Banu, M., Yadav, N., Saha, H., & Patel, A. (2025). Culinary spices as functional feed additives in aquaculture: Growth, immunity, and health perspectives. *Comparative Immunology Reports*, 9, 200256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cirep.2025.200256>
- Barrantes, E. (2023). Effects of the pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus* on farmed shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Pensamiento Actual*, 23, 1409-0112. doi:10.15517/PA.V23I40.55171
- Bondad-Reantaso, M., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., & Brun, E. (2023). Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Review in Aquaculture*, 1257-1829. doi:10.1111/raq.12786
- Brumfield, K., Chen, A., Gangwar, M., Usmani, M., Hasan, N., Justla, A., . . . Colwell, R. (2023). Environmental Factors Influencing Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*, 89(6). doi:<https://doi.org/10.1128/aem.00307-23>
- Cabello, F. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Caruso, F., Toschi, A., García-Beltrán, J., Cuesta, A., Bonnici, C., & Piva, A. (2026). Microencapsulated Botanicals and Organic Acids Improve Immune Status and Growth in Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture nutrition*. doi:<https://doi.org/10.1155/anu/4213038>
- Chen, J., He, S., Zhang, Z., Li, J., Zhang, X., & Li, J. (2024). Application of Organic Acid Salts as Feed Additives in Some Aquatic Organisms: Potassium Diformalate. *Fishes*, 9(3), 85. doi:<https://doi.org/10.3390/fishes9030085>

- Chowdhury, M., Song, H., Liu, Y., Bunod, J., & Dong, X. (2021). Effects of Microencapsulated Organic Acid and Their Salts on Growth Performance, Immunity, and Disease Resistance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Sustainability*, 13(14). doi:<https://doi.org/10.3390/su13147791>
- CNA. (2023). Informe anual de producción camaronera en Ecuador. Obtenido de <https://www.cnaecuador.com>
- CNA. (2025). *Informe del sector camaronero ecuatoriano 2025*. Cámara Nacional de Acuicultura. Obtenido de <https://www.cnaecuador.com>
- Criollo-Nivicela, S., Peña, M., Mocha, B., & Sorroza, L. (2024). Suplementación de extracto de orégano (*Origanum vulgare*) y ácido fórmico para controlar la vibriosis en acuicultura. *Aquatechnica*, 6(3), 168-177. doi:<https://doi.org/10.33936/at.v6i3.6755>
- Dai, D., Qui, K., Zhang, H., Wu, S., Han, Y., Wu, Y., . . . Wang, J. (2021). Organic Acids as Alternatives for Antibiotic Growth Promoters Alter the Intestinal Structure and Microbiota and Improve the Growth Performance in Broilers. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.618144
- Dawood, M., Basuini, M., Yilmaz, S., Abdel-Latif, H., Alagawany, M., & Razab, M. (2022). Exploring the Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. *Animals*, 12(7), 823. doi:<https://doi.org/10.3390/ani12070823>
- Dawood, M., Koshio, S., & Esteban, M. (2017). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974. doi:<https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- Defoirdt, T., Sorfeloos, P., & Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>
- Dibner, J., & Buttin, P. (2002). Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *The Journal Of Applied Poultry Research*, 11(4), 453-463. doi:<https://doi.org/10.1093/japr/11.4.453>
- Dinardo, F., Deflorio, M., Casalino, E., Crescenzo, G., & Centoducati, G. (2020). Effect of feed supplementation with *Origanum vulgare* L. essential oil on sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A preliminary framework on metabolic status and growth performances. *Aquaculture Reports*, 18(100511). doi:<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100511>
- Domínguez-Borbor, C. (2020). *Aceites esenciales como inhibidores de la virulencia de Vibrio spp. patógenos de camarón P. vannamei [Magister En Ciencias de la Acuicultura Marina, espol]*. Obtenido de

<https://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/2020/Publicaciones/tesis/2020%20Cristobal%20Dominguez.pdf>

Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., & Rodríguez, J. (2018). A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, 5, 90-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010>

Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>

Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. (s.f.).

FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022: Hacia una transformación azul. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*.

FAO. (2023). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/cc0461es/cc0461es.pdf>

Flegel, T. (2021). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Invertebrate Pathology*, 166-173. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>

Freitas, C., Baldissera, M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B., Martos-Sitcha, J., & Mancera, J. (2019). Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review. *Frontiers in Physiology*, 10(785). doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>

Gámez-Bayardo, S., Espinosa-Plascencia, A., Jiménez-Edeza, M., Pérez-Álvarez, A., García-Galaz, A., & Bermúdez-Almada, M. (2021). Estudio de caso: Evaluación y efecto del alimento con oxitetraciclina preparado industrialmente y con un procedimiento establecido en granja sobre el desarrollo del camarón *Penaeus vannamei* y su acumulación en músculo y hepatopáncreas. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 24(1). doi:<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.305>

Gómez, C., Carbay, Y., Sorroza, L., & Rivera, L. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibriosis en sistema productivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Multidisciplinar REMCA*, 2(3), 91-98. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9240666>

- Gracia-Valenzuela, M., Orozco-Medina, C., & Molina-Maldonado, C. (2012). Antibacterial effect of essential oregano oil (*Lippia berlandieri*) on pathogenic bacteria of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica*, 22(3), 202-209. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v22n3/v22n3a2.pdf>
- Guan, N., & Liu, L. (2019). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 114(1), 51-65. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>
- Hamid, E., Kavács, B., Kuunya, R., Awad, E., Hussied, A., & Pál, K. (2025). Antibiotic Resistance in Aquaculture: Challenges, Trends Analysis, and Alternative Approaches. *Antibiotics*, 14(6), 598. doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics14060598>
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 70(164-173). doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- Hossain, M., Tanni, L., Rahman, A., Farjana, N., Sharmeen, R., & Tonni, N. (2024). Bacteriophage and non-pathogenic *Vibrio* to control diseases in shrimp aquaculture. *Comparative Immunology Reports*, 6(1). doi:<https://doi.org/10.1016/j.cirep.2023.200126>
- Hu, X., Ma, W., Zhang, D., Tian, Z., Yang, Y., Huang, Y., & Hong, Y. (2025). Application of Natural Antioxidants as Feed Additives in Aquaculture: A Review. *Bioly*, 14(1), 87. doi:<https://doi.org/10.3390/biology14010087>
- Jiang, L., An, N., Fan, R., Zhao, D., & Wang, M. (2025). Screening of proteins interacting with PirA and PirB from *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 166(1). doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110606>
- Krulwich, T., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 330-343. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro2549>
- Kumar, K., Roy, S., Behera, B., Bossier, P., & Das, B. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins*, 13(1), 524. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Kumar, V., Bels, L., Couck, L., Baruah, K., Bossier, P., & Broeck, W. (2019). PirABVP Toxin Binds to Epithelial Cells of the Digestive Tract and Produce Pathognomonic

- AHPND Lesions in Germ-Free Brine Shrimp. *Toxins*, 11(12), 717.
doi:<https://doi.org/10.3390/toxins11120717>
- Lakshmi, B., Viswanath, B., & Gopal, D. (2013). Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal Of Pathogens*, 1-3.
doi:<https://doi.org/10.1155/2013/424123>
- Lambert, R., & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal Of Applied Microbiology*, 86(1), 157-164.
doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00646.x>
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G. (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.
doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lee, C., Leon, H., Kim, B., Choi, S., Kim, S., & Jang, G. (2022). Infectivity and Transmissibility of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Associated *Vibrio parahaemolyticus* in Frozen Shrimp Archived at -80 °C. *Fishes*, 7(3), 125.
doi:<https://doi.org/10.3390/fishes7030125>
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., & Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 43-51.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.003>
- López-Caballero, M., Calvo, M., & Martínez-Álvarez, O. (2025). Chapter 4 - Application of organic acids in shrimp quality enhancement. *Postharvest Technologies and Quality Control of Shrimp*, 93-134. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16124-7.00004-0>
- Lovell, C. (2017). Ecological fitness and virulence features of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(9), 1781-1794. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8096-9>
- Luna, G. (2026). Del 2009 al 2025 la industria camaronera de Ecuador creció 10 veces. [Artículo de noticia]. *Forbes Ecuador*. Obtenido de <https://www.forbes.com.ec/negocios/del-2009-2025-industria-camaronera-ecuador-crecio-10-veces-n87080>
- Luo, K., Zhao, P., He, Y., Kang, S., Shen, C., & Wang, S. (s.f.). Antibacterial Effect of Oregano Essential Oil against *Vibrio vulnificus* and Its Mechanism. *Foods*, 11(3), 403. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11030403>
- Mine, S., & Boopathy, R. (2011). Effect of Organic Acids on Shrimp Pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, 6(3), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1007/s00284-011-9932-2>

- Miranda-Baeza, A., Orozco-Medina, C., Rivas-Vega, M., & Luna-González, A. (2015). Evaluation of the heterotrophic bacteria and vibrio load in an integrated shrimp-mollusc-macroalgae culture system. *Hidrobiológica*, 25(2), 311-314. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v25n2/0188-8897-hbio-25-02-00311.pdf>
- Mohammed, E., Fehér, M., Bársony, P., Teye-gaga, C., Czeglédi, L., & Freytag, C. (2026). Growth Performance, Gut Integrity and Intestinal Microbiome Responses of Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) to Probiotic and Prebiotic Supplementation. *Animals*, 16(3), 433. doi:<https://doi.org/10.3390/ani16030433>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R., & Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. doi:<https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nurzyńska-Wierdak, R., & Walasek-Janusz, M. (2025). Chemical Composition, Biological Activity, and Potential Uses of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Oregano Essential Oil. *Pharmaceuticals*, 18(2), 267. doi:<https://doi.org/10.3390/ph18020267>
- Pérez-Chabela, M., Alvarez-Cisneros, Y., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. (2020). The probiotics and their metabolites in aquaculture. *Hidrobiológica*, 30(1), 95-105. doi:<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/perez>
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R., & Donelli, G. (2005). Pathogenic Vibrio Species in the Marine and Estuarine Environment. En S. C. Belkin, *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. . doi:https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7_9
- Raja, R., Sridhar, R., Balachandran, C., Palanisammi, A., Ramesh, S., & Nagarajan, K. (2017). *V. parahaemolyticus* es una bacteria gram-negativa, halófila y de gran impacto en el cultivo de *Penaeus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 368-381. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.020>
- Ramírez-Tirado, H., Peraza-Gómez, V., Velázquez-Abunader, I., Estrada-Perez, N., & Ruiz-Velazco, J. (2025). Factors affecting the density of *Vibrio parahaemolyticus* in the hepatopancreas of shrimp *Penaeus vannamei* in production units in Northwest Mexico. *Abanico Veterinario*, 2448-6132. doi:<http://dx.doi.org/10.21929/abavet2025.1>
- Rasidi, R., Pamungkas, W., Handajani, H., Puspaningsih, D., Taqwa, F., & Hartami, P. (2024). Sustaining aquaculture: Organic acid as feed additives in aquaculture. En N. N. Gabriel, K. P. Abasubong, V. N. Erasmus, & M. T. Angwafo (Eds.). En

- Sustainable feed ingredients and additives for aquaculture farming* (págs. 481-500). Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-97-4279-0_21
- Reyes, Z. (2020). *[Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)]*. Repositorio Institucional CIBNOR. Obtenido de <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3065>
- Ricke, S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4), 632-639. doi:<https://doi.org/10.1093/ps/82.4.632>
- Rodríguez, J., Domínguez-Borbor, C., Gallardo-Matus, J., Sánchez-Rodríguez, A., Salinas, J., & Sonnenholzner, S. (2024). Oregano essential oil has the potential to reduce the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*. *Research Square*. doi:<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5276769/v1>
- Rossi, B., Esteban, M., García-Beltrán, J., Giovagnoni, G., Cuesta, A., & Piva, A. (2021). Antimicrobial Power of Organic Acids and Nature-Identical Compounds against Two *Vibrio* spp.: An In Vitro Study. *Microorganisms*, 9(5), 966. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9050966>
- Sen, B., Rahman, M., Ahmed, I., & Hossain, M. (2026). Vaccines as a strategic approach to combat *Vibrio parahaemolyticus* and control of early mortality syndrome in shrimp aquaculture: A comprehensive review. *PudMed*, 0044-8486. doi:10.1016/j.vaccine.2025.128049
- Sotomayor, M., Reyes, J., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, 14(1), e0210478. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Soto-Rodríguez, S., Lozano-Olvera, R., Monrfort, G., Zenteno, E., Sánchez-Salgado, J., Vibanco-Pérez, N., & Rendón, K. (2022). New Insights into the Mechanism of Action of PirAB from *Vibrio Parahaemolyticus*. *Toxins*, 14(1), 243. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins14040243>
- Subasinghe, R., Bondad-Reantaso, M., Arthur, R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., . . . Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3-4), 249-272. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>
- Sulman, A. (2025). *Efecto de ácidos orgánicos, aceites esenciales y su sinergia en el crecimiento y supervivencia de Penaeus Vannamei [Tesis de grado]*. Universidad de la Península de Santa Elena.

- Tang, K., & Bondad-Reantaso, M. (2019). Impacts of acute hepatopancreatic necrosis disease on commercial shrimp aquaculture. *Revue Scientifique Et Technique de L OIE*, 38(2), 477-490. doi:<https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2999>
- Thompson, F., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3). doi:<https://doi.org/10.1128/mmbr.68.3.403-431.2004>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. (2025). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*, 105(45-55). doi:10.3354/dao02621
- Tran, L.; Nunan, L.; Redman, R.; Mohny, L.; Pantoja, C.; Fitzsimmons, K.; Lightner, D. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*, 105(45-55). doi:10.3354/dao02621
- Ultee, A., Bennik, M., & 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). doi:<https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1561-1568.2002>
- Valdiviezo-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2019). Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. *Nutrients*, 8(11), 560. doi:<http://dx.doi.org/10.3390/nu11112786>
- Velasquez, L., Castro, J., & Monserrate, M. (2025). Probióticos y ácidos orgánicos como biocontroladores para optimizar el desarrollo embrionario y la eclosión de *Penaeus vannamei*. *AquaTechnica*, 2, 7. doi:<https://doi.org/10.5281/zenodo.15701850>
- Vera-Álava, J., Arteaga-Solórzano, J., & Reyna-Gallegos, S. (2023). Organic acids, microbiota, gut health and productive response in broilers chickens. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 15(2), 1019. doi:<https://doi.org/10.24188/recia.v15.n2.2023.1019>
- Wang, D., Wang, L., Bi, D., Song, J., Wang, G., & Gao, Y. (2022). Conjugative Transfer of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease-Causing pVA1-Type Plasmid Is Mediated by a Novel Self-Encoded Type IV Secretion System. *Microbiology Spectrum*, 10(5). doi:<https://doi.org/10.1128/spectrum.01702-22>
- Wang, H., Lin, S., Mohapatra, A., Kumar, R., & Wang, H. (2020). A Review of the Functional Annotations of Important Genes in the AHPND-Causing pVA1

Plasmid. *Microorganisms*, 8(7), 996.
doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms8070996>

Wang, X., Deng, T., Zhou, X., Chu, L., Zeng, X., Zhang, S., & Guan, W. (2024). A Mixture of Formic Acid, Benzoic Acid, and Essential Oils Enhanced Growth Performance via Modulating Nutrient Uptake, Mitochondrion Metabolism, and Immunomodulation in Weaned Piglets. *Antioxidants*, 13(2), 246.
doi:<https://doi.org/10.3390/antiox13020246>

Wyban, J. (2025). Current trends, challenges, and genetic innovations in the SPF shrimp broodstock industry. *Critical Insights in Aquaculture*, 1(63), 112185.
doi:<https://doi.org/10.1080/29932181.2025.2508544>

Xu, Z., Zhong, S., Yang, F., & Li, F. (2025). Effects of environmental factors on growth and VTc toxin biosynthesis in *Vibrio parahaemolyticus* associated with a shrimp disease. *Aquaculture Reports*.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.103127>

Zheng, Z., Li, R., Aweya, J., Yao, D., Wang, F., & Li, S. (s.f.). The PirB toxin protein from *Vibrio parahaemolyticus* induces apoptosis in hemocytes of *Penaeus vannamei*. *Virulence*, 12(1), 481–492.
doi:<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.187217>

12. ANEXOS

Anexo 1. Cronograma de actividades

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																												
ACTIVIDADES	ABRIL				MAYO					JUNIO					JULIO					AGOSTO					SEPTIEMBRE			
	2026				2026					2026					2026					2026					2026			
	Semanas				Semanas					Semanas					Semanas					Semanas					Semanas			
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
Revisión bibliográfica y redacción de introducción	X	X	X																									
Justifica la problemática: Determina el objetivo/propósito del ensayo			X																									
Define la idea a defender			X																									
Define la metodología			X	X																								
Determina la actividad microbicida in vitro del producto (MIC y MBC)					X	X	X	X																				
Evaluación de la toxicidad in vitro e vivo de las concentraciones microbicidas del producto								X	X	X	X																	
Evaluar el efecto in vivo de las concentraciones microbicida. "Efecto protector y curativo"											X	X	X	X	X	X	X											
Análisis e interpretación de los resultados							X			X							X	X	X									
Reducción del artículo científico																			X	X	X	X	X	X	X			
Entrega de la tesis final																										X	X	
Total, horas = 70	2		2	2	3		4		3	4	4	2	3	4	2	2		4	4	4	4	3	2	3	2	3	2	2

Anexo 2: Matriz de consistencia

TEMA:

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVO GENERAL	OBJETIVOS ESPECIFICOS	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Es posible que el uso de aceites esenciales y extractos de plantas puedan reducir la presencia de <i>V. parahaemolyticus</i> en agua de cultivo de <i>P. vannamei</i> ?	Evaluar el efecto sinérgico entre diformiato de potasio y extracto de orégano (<i>Oreganum vulgare</i>) mediante la aplicación en agua de cultivo de camarón a fin de reducir la carga de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de AHPND.	- Evaluación in vitro de la sinergia KDF-EO contra 2 cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> causante de AHPND. - Determinar la toxicidad in vitro e in vivo de las concentraciones KDF-EO en hemocitos y estadios larvales de <i>P. vannamei</i>. - Determinar la capacidad reductora de KDF-EO frente a la carga de <i>V. parahaemolyticus</i> en el cultivo de larvas de <i>P. vannamei</i> mediante la bacteriología tradicional y PCR cuantitativa.	VI: KDF +EO VD: sobrevivencia de las post larvas y Reducción de la carga bacteriana	Tipo de investigación Población Muestra y tipo de muestreo Diseño de investigación Métodos Técnicas e instrumentos

RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA: P_1

(Supervivencia normalizada respecto al control: media del control = 100%)

ANOVA:

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	7	7147	1021.0	135.1	5.02e-13 ***
Residuals	16	121	7.6		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Grupos homogéneos (Tukey HSD):

	Producto	Concentracion	Letra
31.2	P_1	31.2	e
62.5	P_1	62.5	de
125	P_1	125	e
250	P_1	250	cd
500	P_1	500	c
1000	P_1	1000	b
2000	P_1	2000	a
Control	P_1	Control	e

RESUMEN DE MEDIAS Y GRUPOS:

	Producto	Concentracion	Promedio	SD	Letra	y_pos
1	P_1	31.2	99.65870	1.182287	e	101.94679
2	P_1	62.5	96.92833	1.564019	de	99.59815
3	P_1	125	97.95222	2.364574	e	101.42259
4	P_1	250	89.76109	2.576735	cd	93.44363
5	P_1	500	82.25256	4.262797	c	87.62116
6	P_1	1000	65.87031	3.595786	b	70.57190
7	P_1	2000	49.82935	3.291348	a	54.22650
8	P_1	Control	100.00000	1.564019	e	102.66982

RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA: P_2

(Supervivencia normalizada respecto al control: media del control = 100%)

ANOVA:

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	7	8992	1284.6	277.4	1.73e-15 ***
Residuals	16	74	4.6		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Grupos homogéneos (Tukey HSD):

Producto	Concentracion	Letra
----------	---------------	-------

31.21	P_2	31.2	e
62.51	P_2	62.5	e
1251	P_2	125	e
2501	P_2	250	d
5001	P_2	500	c
10001	P_2	1000	b
20001	P_2	2000	a
Control1	P_2	Control	e

RESUMEN DE MEDIAS Y GRUPOS:

	Producto	Concentracion	Promedio	SD	Letra	y_pos
1	P_2	31.2	100.34130	1.023891	e	102.59386
2	P_2	62.5	97.95222	1.182287	e	100.36317
3	P_2	125	98.63481	2.131399	e	101.99488
4	P_2	250	91.12628	2.047782	d	94.40273
5	P_2	500	83.27645	2.576735	c	87.08185
6	P_2	1000	65.52901	2.708960	b	69.46664
7	P_2	2000	43.00341	3.071672	a	47.30375
8	P_2	Control	100.00000	1.564019	e	102.79269

RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA: P_3

(Supervivencia normalizada respecto al control: media del control = 100%)

ANOVA:

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	7	9742	1392	230.9	7.41e-15 ***
Residuals	16	96	6		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Grupos homogéneos (Tukey HSD):

	Producto	Concentracion	Letra
31.22	P_3	31.2	e
62.52	P_3	62.5	e
1252	P_3	125	de
2502	P_3	250	d
5002	P_3	500	c
10002	P_3	1000	b
20002	P_3	2000	a
Control2	P_3	Control	e

RESUMEN DE MEDIAS Y GRUPOS:

	Producto	Concentracion	Promedio	SD	Letra	y_pos
1	P_3	31.2	98.97611	1.564019	e	101.80975
2	P_3	62.5	98.63481	1.564019	e	101.46846

3	P_3	125	97.61092	1.564019	de	100.44457
4	P_3	250	91.12628	3.691691	d	96.08760
5	P_3	500	77.13311	3.291348	c	81.69408
6	P_3	1000	65.87031	2.576735	b	69.71667
7	P_3	2000	39.93174	2.708960	a	43.91033
8	P_3	Control	100.00000	1.564019	e	102.83364

ANOVA Y TUKEY HSD - ENSAYO MTT

Datos normalizados: Viabilidad (%) relativa al control

Control (media absorbancia) = 1.991

Réplicas usadas para el control: 3

 Producto: P1

> ANOVA:

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	7	4387	626.8	19.4	3.01e-08 ***
Residuals	23	743	32.3		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> Tukey HSD:

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Viabilidad ~ Concentracion, data = df_prod)

\$Concentracion

	diff	lwr	upr	p adj
62.5-31.5	1.04069028	-12.322787	14.404168	0.9999946
125-31.5	-1.49512922	-14.858607	11.868349	0.9999368
250-31.5	-4.16150576	-17.524984	9.201972	0.9636753
500-31.5	-20.76484668	-34.128324	-7.401369	0.0006949
1000-31.5	-24.84475428	-38.208232	-11.481277	0.0000627
2000-31.5	-29.50212574	-42.865603	-16.138648	0.0000045
Control-31.5	-1.55957084	-15.993777	12.874635	0.9999500
125-62.5	-2.53581950	-15.899297	10.827658	0.9979858
250-62.5	-5.20219604	-18.565674	8.161282	0.8918719
500-62.5	-21.80553696	-35.169015	-8.442059	0.0003742
1000-62.5	-25.88544456	-39.248922	-12.521967	0.0000344
2000-62.5	-30.54281601	-43.906294	-17.179338	0.0000025
Control-62.5	-2.60026111	-17.034467	11.833945	0.9985498
250-125	-2.66637654	-16.029854	10.697101	0.9972430
500-125	-19.26971746	-32.633195	-5.906240	0.0016927

1000-125	-23.34962507	-36.713103	-9.986147	0.0001502
2000-125	-28.00699652	-41.370474	-14.643519	0.0000103
Control-125	-0.06444162	-14.498647	14.369764	1.0000000
500-250	-16.60334092	-29.966819	-3.239863	0.0081563
1000-250	-20.68324853	-34.046726	-7.319771	0.0007295
2000-250	-25.34061998	-38.704098	-11.977142	0.0000470
Control-250	2.60193492	-11.832271	17.036141	0.9985439
1000-500	-4.07990761	-17.443385	9.283570	0.9672842
2000-500	-8.73727906	-22.100757	4.626199	0.4017375
Control-500	19.20527584	4.771070	33.639482	0.0040921
2000-1000	-4.65737145	-18.020849	8.706106	0.9356590
Control-1000	23.28518345	8.850978	37.719389	0.0004335
Control-2000	27.94255490	13.508349	42.376761	0.0000347

 Producto: P2

> ANOVA:

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	7	2100.6	300.09	12.84	1.29e-06 ***
Residuals	23	537.4	23.36		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> Tukey HSD:

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Viabilidad ~ Concentracion, data = df_prod)

\$Concentracion

	diff	lwr	upr	p adj
62.5-31.5	-1.3608061	-12.724240	10.0026283	0.9999001
125-31.5	0.7155530	-10.647881	12.0789874	0.9999988
250-31.5	-6.2893345	-17.652769	5.0740999	0.6013846
500-31.5	-13.2565613	-24.619996	-1.8931269	0.0146240
1000-31.5	-20.5577129	-31.921147	-9.1942785	0.0000926
2000-31.5	-18.4662895	-29.829724	-7.1028551	0.0003946
Control-31.5	-0.3280664	-12.601978	11.9458455	1.0000000
125-62.5	2.0763591	-9.287075	13.4397935	0.9984131
250-62.5	-4.9285284	-16.291963	6.4349060	0.8286109
500-62.5	-11.8957552	-23.259190	-0.5323208	0.0357211
1000-62.5	-19.1969068	-30.560341	-7.8334724	0.0002371
2000-62.5	-17.1054834	-28.468918	-5.7420490	0.0010226
Control-62.5	1.0327397	-11.241172	13.3066516	0.9999909
250-125	-7.0048875	-18.368322	4.3585469	0.4732125

```

500-125    -13.9721144 -25.335549 -2.6086800 0.0090129
1000-125   -21.2732659 -32.636700 -9.9098316 0.0000567
2000-125   -19.1818425 -30.545277 -7.8184081 0.0002396
Control-125 -1.0436194 -13.317531 11.2302925 0.9999902
500-250    -6.9672268 -18.330661  4.3962075 0.4797740
1000-250   -14.2683784 -25.631813 -2.9049440 0.0073606
2000-250   -12.1769550 -23.540389 -0.8135206 0.0298085
Control-250  5.9612681 -6.312644 18.2351800 0.7372528
1000-500   -7.3011516 -18.664586  4.0622828 0.4228148
2000-500   -5.2097282 -16.573163  6.1537062 0.7871065
Control-500 12.9284949  0.654583 25.2024069 0.0340735
2000-1000  2.0914234 -9.272011 13.4548578 0.9983387
Control-1000 20.2296465  7.955735 32.5035584 0.0003285
Control-2000 18.1382231  5.864311 30.4121350 0.0012730

```

```

-----
Producto: P3
-----

```

> ANOVA:

```

      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Concentracion  7  2576   368.0   18.81 4.02e-08 ***
Residuals    23   450    19.6
---

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> Tukey HSD:

```

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

```

Fit: aov(formula = Viabilidad ~ Concentracion, data = df_prod)

```

$Concentracion
      diff      lwr      upr    p adj
62.5-31.5  -4.820568 -15.219252  5.5781168 0.7780532
125-31.5   -1.092160 -11.490844  9.3065247 0.9999587
250-31.5   -9.013457 -19.412142  1.3852271 0.1229815
500-31.5   -20.374431 -30.773115 -9.9757463 0.0000290
1000-31.5  -22.395554 -32.794239 -11.9968698 0.0000067
2000-31.5  -21.993840 -32.392525 -11.5951558 0.0000089
Control-31.5 -3.215386 -14.447249  8.0164774 0.9768937
125-62.5    3.728408  -6.670277 14.1270924 0.9261803
250-62.5   -4.192890 -14.591574  6.2057949 0.8737261
500-62.5   -15.553863 -25.952548 -5.1551786 0.0011034
1000-62.5  -17.574987 -27.973671 -7.1763021 0.0002357
2000-62.5  -17.173273 -27.571957 -6.7745881 0.0003200
Control-62.5  1.605182  -9.626681 12.8370451 0.9996763

```

250-125	-7.921298	-18.319982	2.4773870	0.2312623
500-125	-19.282271	-29.680956	-8.8835865	0.0000651
1000-125	-21.303394	-31.702079	-10.9047099	0.0000147
2000-125	-20.901681	-31.300365	-10.5029959	0.0000197
Control-125	-2.123226	-13.355089	9.1086373	0.9980335
500-250	-11.360973	-21.759658	-0.9622889	0.0255341
1000-250	-13.382097	-23.780782	-2.9834124	0.0057658
2000-250	-12.980383	-23.379068	-2.5816984	0.0077950
Control-250	5.798072	-5.433791	17.0299348	0.6774606
1000-500	-2.021123	-12.419808	8.3775611	0.9976589
2000-500	-1.619409	-12.018094	8.7792751	0.9994319
Control-500	17.159045	5.927182	28.3909083	0.0008555
2000-1000	0.401714	-9.996971	10.8003985	1.0000000
Control-1000	19.180169	7.948306	30.4120318	0.0002052
Control-2000	18.778455	7.546592	30.0103178	0.0002723