



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

**USO DE BACTERIÓFAGOS Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO EN EL
TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR *Vibrio spp.* EN JUVENILES DE
Penaeus vannamei.**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del Título de

BIÓLOGO

AUTOR

GIANLUCCA FORESTIERI ÁVILA

TUTORA

ACUI. SONNYA MENDOZA LOMBANA, PhD.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2026

UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA
DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR CARRERA DE
BIOLOGÍA

“USO DE BACTERIÓFAGOS Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO EN
EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR *Vibrio spp.* EN JUVENILES DE
Penaeus vannamei.”

TRABAJO

Previo a la obtención del título de BIÓLOGO

GIANLUCCA FORESTIERI ÁVILA

LA LIBERTAD – ECUADOR

2026

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular “Uso de bacteriófagos y aceite esencial de orégano en el tratamiento de infecciones por *vibrio spp.* en juveniles de *Penaeus vannamei*” elaborado por Forestieri Ávila Gianluca, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente

Acui. Mendoza Lombana Sonnya, PhD.



DOCENTE DE TUTOR

C.I. 0912802816

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista del Trabajo de Integración Curricular “Uso de bacteriófagos y aceite esencial de orégano en el tratamiento de infecciones por *Vibrio spp.* en juveniles de *Penaeus vannamei*”, elaborado por Forestieri Ávila Gianluca, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente,

Ing. Verónica Vera Vera, Ph.D.



DOCENTE DE ÁREA

C.I. 0919712257

DEDICATORIA

A lo largo de este camino de formación académica, desde que tengo memoria, he caminado de la mano de mi madre. Aún recuerdo la primera vez que me llevó a la escuela en Fusagasugá, Colombia. Desde entonces, me he esforzado incansablemente por alcanzar un buen desempeño académico, con el deseo constante de hacerla sentir orgullosa de su hijo.

Dedico también este trabajo a las personas que han sido parte fundamental de mi vida. A Enzo y Nicola, mis hermanos, quienes siempre han estado junto a mí en los buenos y en los malos momentos. A Anuchké, mi razón de vida, quien ha sido testigo de mis logros, de mis fracasos y de la profunda pasión que siento por la biología. Gracias por acompañarme, apoyarme y creer en mí a lo largo de este proceso.

A Bernadine y Jacques, quienes con su amor incondicional me han dado fuerzas para continuar incluso en aquellos momentos en los que la intensidad de este camino parecía superarme. Su compañía ha sido una fuente constante de motivación y alegría.

Finalmente, dedico de manera especial este trabajo a mis padres. José Vicente Forestieri Marín, a quien admiro por sus logros como Biólogo, y quien me ha impartido sus conocimientos a lo largo de mi carrera, y Sandra Edith Ávila, quien me cuida desde el cielo desde hace 10 años y llevo bien profundo en mi corazón. Mis padres, quienes vi luchar incansablemente para que sus hijos nunca carecieran de lo necesario y

pudieran aspirar a un futuro mejor. Su esfuerzo, sacrificio, amor y perseverancia han sido base sobre la cual he construido cada uno de mis logros. Este trabajo es, en gran medida, fruto de todo lo que hicieron por mí. A ustedes, con todo mi amor y gratitud, les dedico esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la salud y fuerzas para desarrollarme en esta área tan competitiva como la biología. A la universidad por haberme impartido los conocimientos necesarios para la ejecución de este proyecto y muchos a futuro. Se agradece a Semacua S.A. por facilitar las instalaciones para el desarrollo del bioensayo; a Jorge Espinoza y Empagram, división laboratorio, por el apoyo técnico, y logístico; a AQUA Premex ECUADOR; LEONARDO RODRIGUEZ, NATALIA GONZALES y JUAN URBINA, por contribuir con los productos evaluados; a Félix y Eduardo Díaz por la donación de los organismos experimentales; y a South Florida Farming Corp., PABLO INTRIAGO PhD., por proporcionar la cepa Vp+418 empleada en el desafío bacteriano.

Finalmente, agradezco a la Acui. Sonnya Mendoza Lombana, PhD. por introducirme a este mundo de la patología en camarones peneidos, y por demostrarme una vez más que la fe y el trabajo son la clave del éxito.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Trabajo de Integración Curricular presentado por Forestieri Ávila Gianluca
como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo de la carrera de Biología,
Facultad Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

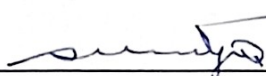
Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 12/08/2026



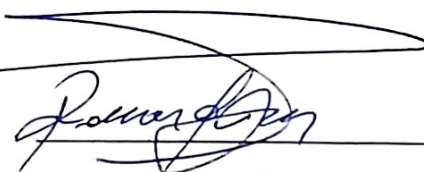
Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Verónica Vera Vera, PhD.
DOCENTE DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Acui. Sonnya Mendoza Lombana, PhD.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Duque Marín, Mgtr.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



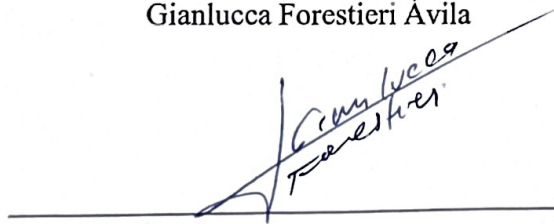
Lic. Pascual Roca Silvestre, Mgtr.
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, Gianluca Forestieri Ávila, declaro bajo mi palabra de honor que el presente trabajo de Integración Curricular es una obra original de mi autoría. Afirmando que el contenido desarrollado, así como los análisis, conclusiones y resultados expuestos, han sido elaborados exclusivamente por mí, sin haber incurrido en plagio ni haber utilizado información sin la debida citación y referencia correspondiente y el patrimonio intelectual de la misma corresponde a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Atentamente,

Gianluca Forestieri Ávila

A handwritten signature in blue ink, reading "Gianluca Forestieri", is written over a horizontal line. The signature is slanted upwards to the right.

C.I. 0953240751

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR.....	vii
DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA.....	viii
DECLARACIÓN EXPRESA.....	ix
ÍNDICE	x
ÍNDICE DE FIGURA.....	xv
ÍNDICE DE TABLA	xviii
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT	xxii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 JUSTIFICACIÓN	7
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo General:	9
3.2 Objetivos específicos:	9
4 HIPÓTESIS	10
5 MARCO TEORICO	11
5.1 Importancia de la camaronicultura ecuatoriana.....	11
5.1.1 Desarrollo histórico de la camaronicultura ecuatoriana.	11
5.1.2 Producción y exportaciones del sector camaronero	14

5.1.3	Tecnificación y sostenibilidad de la industria camaronera	15
5.1.4	Enfermedades bacterianas y desafíos sanitarios en acuicultura	16
5.2	Biología general de <i>Penaeus vannamei</i>	17
5.2.1	Taxonomía y distribución de <i>Penaeus vannamei</i>	17
5.2.2	Anatomía general de <i>Penaeus vannamei</i>	19
5.2.3	Hepatopáncreas y función fisiológica	20
5.2.4	Hemolinfa y Hemocitos	21
5.2.5	Sistema inmune en crustáceos	22
5.2.6	Influencia del estrés ambiental sobre la inmunidad.	24
5.3	Vibriosis.....	25
5.3.1	<i>Vibrio</i> spp. y las enfermedades bacterianas en camarón	25
5.3.2	AHPND: etiología e impacto en la acuicultura	26
5.3.3	Diagnóstico y manejo sanitario de la vibriosis y AHPND.	27
5.4	Tratamientos profilácticos frente a la vibriosis.....	28
5.4.1	Limitación de antibióticos y necesidad de alternativas.	28
5.4.2	Aceites esencial de orégano y sus propiedades antimicrobianas.....	30
5.4.3	Bacteriófagos	31
5.4.4	Ecología microbiana de <i>Vibrio</i> spp. y variabilidad entre lotes.....	33
5.4.5	Bases de la terapia combinada y concepto de sinergia	33
5.4.6	Factores que condicionan la administración oral.....	34
5.5	Medios de cultivo.....	35
5.5.1	TCBS	35

	5.5.2 CHROMagar Vibrio.....	36
6	METODOLOGÍA.....	37
	6.1 Tipo de Estudio.....	37
	6.2 Área de Estudio.	37
	6.3 Ubicación Geográfica.	38
	6.4 Diseño experimental.	39
	6.5 Monitoreo y mantenimiento.	40
	6.6 Métodos.	42
	6.6.1 Aplicación de los tratamientos.....	42
	6.6.2 Análisis a realizar.....	43
	6.6.2.1 Montajes en fresco	44
	6.6.2.2 Supervivencia y mortalidad.....	47
	6.6.3 Análisis In vitro.	48
	6.6.3.1 Preparación de la suspensión bacteriana.....	49
	6.6.3.2 Inoculación.....	50
	6.6.3.3 Procesamiento.....	51
	6.6.3.4 Cuantificación de Hemocitos	52
	6.6.3.5 Siembra de muestras	53
	6.6.3.6 Cuantificación de Placas Petri.	53
7	RESULTADOS	54
	7.1 Efecto de los tratamientos sobre la carga de Vibrio spp. en juveniles de Penaeus vannamei.....	54

7.1.1	Carga bacteriana preinfección.....	54
7.1.2	Carga bacteriana postinfeccion en hepatopáncreas	56
7.1.3	Carga bacteriana postinfeccion en hemolinfa	63
7.1.4	Composición bacteriana postinfeccion.....	64
7.1.5	Comparación estadística de la carga bacteriana entre tratamientos.	65
7.2	Efecto de los bacteriófagos y el aceite esencial y orégano sobre la respuesta inmunitaria y la carga bacteriana.....	66
7.2.1	Conteo total de hemocitos.	66
7.2.2	Evaluación del efecto combinado sobre el conteo de hemocitos.	68
7.2.3	Evaluación del efecto combinado sobre la carga bacteriana....	68
1.1.1	<i>Relación entre el conteo total de hemocitos y la carga bacteriana.</i>	69
7.3	Supervivencia y estado de salud de los juveniles de <i>P. vannamei</i>	71
7.3.1	Supervivencia final por tratamiento.....	71
7.3.2	Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier	72
7.3.3	Estado de salud de los juveniles.	76
7.3.4	Relación entre la supervivencia y los signos clínicos del hepatopáncreas.....	78
8	DISCUSIÓN	81
9	CONCLUSIONES	90
10	RECOMENDACIONES.....	93

11	BIBLIOGRAFÍA	94
12	ANEXOS	106

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1	18
Figura 2 Ciclo lítico (A) y lisogénico (B) de los bacteriófagos.	32
Figura 3 Mapa geográfico	38
Figura 4 Diseño completamente aleatorizado con un grupo control, 3 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento.	40
Figura 5 Cronograma del bioensayo.....	49
Figura 6 Carga bacteriana preinfección o basal por corrida.....	55
Figura 7 Carga bacteriana postinfección de vibrios totales en hepatopáncreas por tratamiento.....	57
Figura 8 Carga de <i>V. parahaemolyticus</i> postinfección promedio.....	58
Figura 9 Carga postinfección de <i>V. alginolyticus</i> en hepatopáncreas por tratamiento y por corrida.....	59
Figura 10 Reducción postinfección de vibrios totales, <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. alginolyticus</i> respecto al grupo control.....	62
Figura 11 Composición bacteriana postinfección en hepatopáncreas por tratamiento.....	65
Figura 12 Conteo total de hemocitos por tratamiento.....	67
Figura 13 Relación entre el conteo total de hemocitos y la carga de vibrios	

totales en hepatopáncreas.....	70
Figura 14 Relación entre el conteo total de hemocitos y la carga de <i>V. alginolyticus</i> en hepatopáncreas.....	70
Figura 15 Supervivencia final por tratamiento.	72
Figura 16 Curva de supervivencia Kaplan–Meier de juveniles de <i>P. vannamei</i> durante la primera corrida.	74
Figura 17 Curvas de supervivencia de Kaplan–Meier de juveniles de <i>Penaeus vannamei</i> de la segunda corrida.	76
Figura 18 Indicadores de salud por tratamiento.....	77
Figura 19 Relación entre la supervivencia final y prevalencia de desprendimiento celular en HP.	79
Figura 20 Relación entre la supervivencia final y prevalencia de deformación tubular en HP.	79
Figura 21 Relación entre la supervivencia final y prevalencia de melanización en HP.	80
Figura 22 PCR positiva para Vp+418. (Intriago et al., 2023)	106
Figura 23 Juvenil de <i>Penaeus vannamei</i> de 10g	106
Figura 24 Área de microscopio óptico.....	107
Figura 25 Izquierda: Tubulos con lípidos grado dos, melanización grado 2,	

Contenido vacío grado 1; Derecha: Lípidos grado 3, melanización grado 1, y con contenido vacío grado 1.....	107
Figura 26 Izquierda: Presencia de bacterias filamentosas grado 1, melanización grado 2, y detritos grado 3; derecha: Lamela branquial bifurcada.....	108
Figura 27 Intestinos inflamados, llenos de alimento, microalgas y detritos.	109
Figura 28 Crecimiento bacteriano en CHROMagar y TCBS.....	110
Figura 29 Pool de HP de 10 organismos para microbiología.....	110
Figura 30 Siembra de muestras por método de extensión por superficie. ...	110
Figura 31 Captura de los juveniles.	111
Figura 32 Medición de parámetros rutinaria.....	111
Figura 33 Despacho de juveniles provenientes de camaronera en Playas....	111
Figura 34 Visita de la Acui. Sonnya Mendoza, PhD.	111
Figura 35 Medición rutinaria de Amonio y Nitrito por colorimetría.....	112
Figura 36 Certificado de haber realizado el experimento en Semacua	118

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1 Descripción de signos clínicos y grados de severidad para montajes en fresco de branquias.....	45
Tabla 2 Descripción de signos clínicos y grados de severidad para montajes en fresco de hepatopáncreas.....	46
Tabla 3 Descripción de signos clínicos y grados de severidad para montajes en fresco de intestino.....	47
Tabla 4 Promedio de carga bacteriana basal o preinfección.....	55
Tabla 5 Carga post-infección de vibrios totales en hepatopáncreas por tratamiento y corrida.....	56
Tabla 6 Carga postinfección de <i>V. parahaemolyticus</i> en hepatopáncreas por tratamiento y corrida.....	58
Tabla 7 Carga postinfección de <i>V. alginolyticus</i> en hepatopáncreas por tratamiento y corrida.....	59
Tabla 8 Cuantificación del hepatopáncreas en agar TCBS.....	60
Tabla 9 Reducción porcentual de la carga bacteriana en hepatopáncreas respecto al grupo control.....	61
Tabla 10 Comparación de la carga bacteriana preinfección o basal, y la carga postinfección.....	63

Tabla 11 Carga bacteriana postinfección en hemolinfa.....	64
Tabla 12 Conteo total de hemocitos por tratamiento.....	67
Tabla 13 Correlaciones entre el conteo total de hemocitos y las cargas bacterianas.....	70
Tabla 14 Supervivencia final por tratamiento.....	72
Tabla 15 Resultados de la prueba de rangos logarítmicos (Log Rank) para cada corrida.....	74
Tabla 16 Indicadores descriptivos del estado de salud por tratamiento.....	78
Tabla 17 Correlaciones generales entre supervivencia y prevalencia de signos del hepatopáncreas.....	78
Tabla 18 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk por tratamiento.....	113
Tabla 19 Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas.....	114
Tabla 20 Resumen de las pruebas inferenciales de carga bacteriana.....	114
Tabla 21 Resultados del conteo total de hemocitos y del análisis factorial.....	115
Tabla 22 Correlaciones entre el conteo total de hemocitos y las cargas bacterianas.....	115
Tabla 23 Comparación de supervivencia e indicadores de salud entre tratamientos.....	115

Tabla 24 Comparaciones por pares mediante la prueba de Tukey para la supervivencia final.....	116
Tabla 25 Prueba de rangos logarítmicos para las curvas de Kaplan-Meier.....	116
Tabla 26 Correlaciones entre supervivencia y variables generales.....	116
Tabla 27 Correlaciones entre supervivencia y prevalencia de signos hepatopancreáticos.....	117
Tabla 28 Reducción porcentual postinfección respecto al grupo control.....	117
Tabla 29 Características relevantes de la cepa Vp+418 utilizada para la preparación de la suspensión bacteriana.....	117
Tabla 30 Datos agrupados por tanque de carga bacteriana postinfección y conteo total de hemocitos.....	118

RESUMEN

Se evaluó el efecto profiláctico de bacteriófagos, aceite esencial de orégano y su combinación frente a infecciones por *Vibrio spp.* en juveniles de *Penaeus vannamei*. Se realizaron dos corridas independientes con cuatro grupos: control (C), bacteriófagos (T1), aceite esencial de orégano (T2) y tratamiento combinado (T3), distribuidos en 24 unidades experimentales. El inóculo de *Vibrio parahaemolyticus* Vp+418 se ajustó al patrón 0.5 de McFarland y se confirmó mediante siembra en CHROMagar Vibrio. Se cuantificaron las cargas bacterianas, el conteo total de hemocitos, la supervivencia y los indicadores de salud. T3 presentó las menores cargas medias en el hepatopáncreas, con reducciones respecto al control de 71.21% para vibrios totales, 80.04% para *V. parahaemolyticus* y 70.93% para *V. alginolyticus*. Aunque las diferencias globales de carga no fueron significativas, se observaron tendencias consistentes a menor carga en los tratamientos. La supervivencia difirió entre grupos ($p < 0.001$) y fue significativamente mayor en T1, T2 y T3 que en C. El conteo de hemocitos se relacionó positivamente con la reducción de *V. parahaemolyticus* ($\rho = 0.526$; $p = 0.008$). Además, la supervivencia disminuyó con la carga de vibrios totales y el daño hepatopancreático respaldando el potencial profiláctico de los tratamientos evaluados.

Palabras clave: Carga bacteriana; conteo total de hemocitos; hepatopáncreas; profilaxis.

ABSTRACT

The prophylactic effects of bacteriophage, oregano essential oil, and their combination against *Vibrio spp.* infections were evaluated in juvenile *Penaeus vannamei*. Two independent trials were conducted with four experimental groups: an untreated control (C), bacteriophage (T1), oregano essential oil (T2), and the combined treatment (T3), distributed across 24 experimental units. The *Vibrio parahaemolyticus* Vp+418 inoculum was adjusted to a 0.5 McFarland standard and verified by plating on CHROMagar Vibrio. Bacterial loads, total hemocyte count, survival, and health indicators were assessed. T3 exhibited the lowest mean bacterial loads in the hepatopancreas, with reductions relative to the control of 71.21% for total vibrios, 80.04% for *V. parahaemolyticus*, and 70.93% for *V. alginolyticus*. Although overall differences in bacterial loads were not statistically significant, consistent trends toward lower bacterial loads were observed in the treated groups. Survival differed significantly among groups ($p < 0.001$) and was significantly higher in T1, T2, and T3 than in the control. Total hemocyte count was positively correlated with the reduction in *V. parahaemolyticus* ($\rho = 0.526$; $p = 0.008$). In addition, survival decreased as total *Vibrio* load and hepatopancreatic damage increased, supporting the prophylactic potential of the evaluated treatments.

Keywords: Bacterial load; hepatopancreas; prophylaxis; total hemocyte count.

1 INTRODUCCIÓN

La consolidación de un negocio rentable en las provincias de El Oro y Guayas, que habría de transformar la economía costera ecuatoriana durante las décadas siguientes, se originó en la conjunción de factores que, aunque parecían circunstanciales, respondían a una configuración ambiental particularmente favorable, pues la presencia abundante de postlarvas silvestres en esta área permitió que el cultivo de camarón del Pacífico, que el Ecuador había iniciado tímida y experimentalmente a finales de la década de 1960, experimentara un desarrollo positivo y de mayor escala al inicio de los años 70, momento en el que la actividad dejaría de ser una práctica marginal para convertirse en una industria propiamente dicha (Castillo & Velásquez, 2021).

La ejecución protocolos funcionales para una nutrición apropiada y la implementación de departamentos de microalgas en cada laboratorio constituyeron, en última instancia, el resultado de un proceso que habría comenzado mucho antes, cuando el camarón blanco se convirtió en producto de alto valor para el mercado internacional, de modo que, en la década de los 80 e inicios de los 90, ya se habían registrado US\$872.2 millones provenientes de sus exportaciones, cifra que impulsaría la construcción de laboratorios dedicados a la producción de larvas de *Penaeus vannamei* en 1982, aunque el desarrollo rápido de tecnologías para incrementar dicha producción

no habría sido posible sin la colaboración de países como Japón, Filipinas, varios europeos, entre otros, quienes, en tanto que actores clave del escenario internacional, trabajaron conjuntamente con profesionales en acuicultura, biología y ciencias afines (Yockteng, 2017).

La consolidación de la camaronicultura como polo de inversión global, que habría de transformar los patrones de seguridad alimentaria de las próximas décadas, se desprende de una dinámica de mercado cuya viabilidad, aunque tensionada por la volatilidad de precios y las crecientes exigencias regulatorias, exhibe una trayectoria expansiva que los datos estadísticos corroboran como sostenible en el largo plazo, de modo que, si bien la inestabilidad coyuntural persistiría como variable estructural del sector, la industria del camarón habría logrado posicionarse internacionalmente con una velocidad que, lejos de detenerse ante los obstáculos, la tornaría particularmente atractiva para agentes económicos de todo el mundo (Cuellar, 2021).

El Ecuador, como líder mundial en exportación y producción de *P. vannamei*, constituye una transformación que habría resultado inconcebible durante los años de auge del camarón ecuatoriano, pues las cifras que hoy se registran distan radicalmente de cualquier proyección imaginable en aquella época, en tanto que el año 2022 alcanzó ventas récord superando los US\$7,000 millones, mientras que en e, hasta julio, ya se

habían contabilizado más de USD 4,360 millones, una cifra que representa un 500% del ingreso anual de la década de los noventa (Saltos, 2024; CNA, 2025), lo cual evidencia que la expansión del sector no solo ha superado las expectativas históricas, sino que ha reconfigurado por completo la escala de lo posible en materia de exportaciones acuícolas.

El debilitamiento frente a un mercado internacional altamente competitivo, producto de exportaciones retrasadas y costos de producción incrementados por patologías acuáticas, constituye el panorama que subyace a una pérdida anual aproximada de USD 3,000 millones señalada por Meza (2022), cifra que habrá de seguir creciendo mientras el 20% de las mermas de la industria camaronera, según estimaciones actuales, continuara vinculándose a microorganismos bacterianos cuyo impacto, aunque frecuentemente subestimado en las agendas de política pesquera, ya se erigía como una de las dificultades estructurales más persistentes que este negocio enfrentaría en las próximas décadas.

La mortalidad total en tanques y piscinas de cultivo, que puede alcanzar el 100% según documenta Jun et al. (2017), constituye el desenlace más devastador de una enfermedad cuya etiología bacteriana habría de situarse en cepas específicas de *V. parahaemolyticus*, agente causal del síndrome de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), patología que, junto con la vibriosis sistémica de origen más amplio, sitúa

al género *Vibrio* como el principal responsable de las infecciones que afectan a estos sistemas acuícolas, tal como lo reconoce Barrantes (2023) en su revisión de los principales agentes patógenos, de modo que la comprensión integral de estos procesos requeriría atender tanto a la especificidad del patotipo AHPND como a la diversidad de manifestaciones clínicas que el conjunto de estas bacterias vibriónicas puede desplegar en contextos de alta densidad de cultivo.

La adopción de aceites esenciales y ácidos orgánicos por el sector productivo nacional como respuesta a la carga bacteriana (Arreaga, 2025) constituye una reconfiguración de las prácticas de manejo que, aunque emergió de la urgencia por contener patologías, revelaría la imposibilidad de sostener los protocolos tradicionales frente a una realidad en la que la mayoría de las cepas patogénicas de vibrios presentan resistencia a antibióticos, lo cual los habría hecho progresivamente incontrolables en los sistemas de producción acuícola (Sotomayor et al., 2019), de modo que la transición hacia estas nuevas estrategias no solo respondería a una opción técnica sino que se habría convertido en una condición esencial para la viabilidad misma del sector, en tanto que la persistencia de los vibrios resistentes continuará exigiendo innovaciones que trasciendan las soluciones meramente farmacológicas que predominaron en décadas anteriores.

La adopción de protocolos estandarizados con concentraciones definidas en el sector acuícola, que habría de consolidarse como práctica profiláctica durante la última década, responde a una evidencia previamente acumulada sobre la capacidad del aceite esencial de orégano para interferir en los mecanismos de comunicación bacteriana, de modo que la reducción del quorum sensing en múltiples especies de vibrios patogénicos, entre las cuales se encuentra *V. parahaemolyticus*, constituiría el fundamento bioquímico que explicaría el incremento en la supervivencia de los organismos cultivados, tal como lo documentarían Domínguez et al. (2020) en sus evaluaciones de eficacia, aunque esta misma efectividad, que ya se había observado en ensayos previos, seguiría dependiendo de una aplicación rigurosa que garantice tanto la reproducibilidad de los tratamientos como la comparabilidad de los resultados entre distintas instalaciones productivas.

La consolidación de la fagoterapia como alternativa antimicrobiana viable dependerá de que la industria supere las barreras que hoy limitan su aplicación sistemática, pues aunque este método no convencional, que emplea bacteriófagos capaces de infectar y provocar la lisis de bacterias específicas, representaría una respuesta a los desafíos productivos contemporáneos, su escasa utilización actual obedece precisamente a la novedad de la práctica, lo cual exige que se desarrollen protocolos in situ y que se ejecuten bioensayos continuos que validen la capacidad de los fagos como controladores y reductores de la carga bacteriana (Reina & Reina,

2018), de modo que, si bien la búsqueda de alternativas antimicrobianas ya ha situado a esta terapia en el horizonte técnico, su efectividad dependerá de un proceso de legitimación experimental que aún está en curso y que demandará años de investigación aplicada antes de que pueda integrarse rutinariamente a los protocolos sanitarios industriales.

La escasez de ensayos con bacteriófagos dirigidos a juveniles de *P. vannamei* constituye una brecha que demanda ser abordada mediante la evaluación comparativa de terapias alternativas, de modo que la validación del rendimiento fágico frente a la vibriosis en organismos infectados artificialmente con *V. parahaemolyticus* cobrará relevancia en la medida en que se contraponga con el aceite esencial de orégano, tratamiento ampliamente adoptado por los productores del sector, lo cual permitiría, si los resultados resultan favorables, consolidar una estrategia profiláctica que, aunque aún requerirá optimización en escalas productivas reales.

2 JUSTIFICACIÓN

La consolidación del sector camaronero como referente de la economía ecuatoriana, que habría de traducirse en un crecimiento sostenido de sus métricas comerciales durante 2025, reposa sobre una base exportadora ya robusta en septiembre de 2024, momento en el que la cadena productiva acumulaba USD 4,474 millones en ingresos y 2,013,190,471 libras despachadas hacia mercados donde China concentraba el 53.68% de las preferencias, en tanto que Estados Unidos y Europa se repartían el 14.93% y el 22.98% respectivamente (CNA, 2024), dinamismo que se habría intensificado siete meses después, pues hasta julio de 2025 el país registraría incrementos del 20% en divisas y del 14% en volumen físico respecto al mismo lapso del año anterior (CNA, 2025), lo cual evidencia que la diversificación geográfica de los envíos, lejos de diluir el liderazgo asiático, había operado como catalizador de una expansión cuyos rendimientos superarían progresivamente los umbrales alcanzados en el ciclo inmediatamente precedente.

La reducción de cargas bacterianas en camarones infectados mediante aceites esenciales de orégano y bacteriófagos constituye una respuesta viable a las pérdidas económicas que, de modo que la productividad acuícola pudiera recuperarse, habían venido generando las enfermedades bacterianas en los últimos años, pues aunque la aplicación profiláctica de estos tratamientos aún requeriría de validaciones futuras en distintos contextos productivos, ya se había comenzado a documentar su eficacia en

estudios que, en tanto que alternativas a los antibióticos convencionales, apuntaban hacia una gestión más sostenible de los cultivos (Domínguez et al., 2020; Jun et al., 2017).

La terapia de fagos constituye una alternativa terapéutica con potencial para combatir infecciones bacterianas en “*Penaeus vannamei*” provocadas por microorganismos multirresistentes (Cisek et al., 2017; Jun et al., 2017), en tanto que esta estrategia emplea bacteriófagos, es decir, virus especializados en infectar bacterias, cuyo mecanismo durante el ciclo lítico implica la inyección de su material genético en un hospedero específico, proceso a partir del cual el fago se replicaría generando numerosas copias que eventualmente ocasionarían la lisis y muerte celular del microorganismo afectado (Makarov et al., 2019), de modo que la especificidad del hospedero y la capacidad replicativa del fago conformarían las bases biológicas sobre las cuales descansaría la aplicación clínica de este tratamiento emergente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Comparar el efecto del uso de bacteriófagos y aceite esencial de orégano frente a la vibriosis en juveniles de *P. vannamei*, mediante un bioensayo de infección inducida con *V. parahaemolyticus*, para evaluar su potencial como estrategia profiláctica.

3.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la carga de bacterias del género *Vibrio* en juveniles tratados con bacteriófagos y aceite esencial mediante análisis pre y post-infección.
2. Evaluar el efecto combinado de la aplicación de bacteriófagos y aceite esencial de orégano y su interacción sobre el conteo de hemocitos totales y la carga bacteriana en hepatopáncreas y hemolinfa.
3. Comparar la tasa de supervivencia de los juveniles en función de su estado de salud.

4 HIPÓTESIS

H0: No existe diferencias significativas en la reducción de la carga de *Vibrio spp.* entre los tratamientos con bacteriófagos, aceite esencial de orégano y su combinación, en comparación con el grupo control.

H1: Existe al menos una diferencia significativa en la reducción de la carga de *Vibrio spp.* entre los tratamientos con bacteriófagos, aceite esencial de orégano y su combinación, en comparación con el grupo control.

5 MARCO TEORICO

5.1 Importancia de la camaronicultura ecuatoriana

5.1.1 Desarrollo histórico de la camaronicultura ecuatoriana.

La trascendencia científica y tecnológica que acompaña la dimensión productiva del sector camaronero ecuatoriano constituye hoy un escenario en el que resulta habitual observar explotaciones intensivas, laboratorios de microbiología y de biología molecular, programas de bioseguridad de gran rigurosidad y estrategias sanitarias orientadas al control de enfermedades virales y bacterianas, todo lo cual habría ido configurándose progresivamente desde que, a finales de la década de 1965, se iniciara el cultivo de *Penaeus vannamei*, transformando a la camaronicultura en uno de los pilares de la economía nacional, pues esta actividad, que originalmente se concibió como una alternativa productiva más entre tantas, terminaría por consolidar al Ecuador como líder mundial en exportación de camarón de cultivo (Balcazar & Agila, 2023), estableciéndose como una de las principales fuentes de ingreso no petrolero y como polo generador de empleo, aunque su relevancia trascienda el ámbito estrictamente económico en tanto que los sistemas de producción han evolucionado hasta potenciar una dimensión científica que acompaña y fortalece el desarrollo del sector (Castillo-Ochoa & Velasquez-Lopez, 2021).

La transformación radical del paisaje costero y de las dinámicas de inversión y empleo en Guayas y El Oro, que caracterizaría la fase inicial del desarrollo camaronero ecuatoriano, habría de constituirse como resultado de una convergencia entre disponibilidad biológica y oportunidad económica que definiría la trayectoria productiva de la costa durante décadas subsiguientes, pues el tejido empresarial diversificado que emergió con relativa facilidad, compuesto por pequeños y medianos productores que incursionaban en la actividad gracias a la ausencia de requerimientos tecnológicos sofisticados para la captura de semilla, sentaría las bases estructurales de un crecimiento que, aunque modesto en términos comparativos con lo que vendría posteriormente, ya contaba con aproximadamente 600 hectáreas dedicadas al cultivo para la década de 1970, expansión que fue posibilitada por la abundancia natural de postlarvas silvestres, recurso que entonces se presentaba como prácticamente inagotable y que consolidaría tempranamente a ambas provincias como epicentros de la industria.

La integración de una infraestructura científica que permitiría, en décadas venideras, sostener el dinamismo productivo entonces iniciado constituyó el legado más perdurable de aquella expansión industrial que, entre 1980 y 2000, había generado expectativas capaces de motivar la creación de laboratorios especializados en producción larvaria y centros de investigación acuícola, pues lo que Yockteng (2017) documenta como tecnificación del sector y consiguiente crecimiento de la producción

nacional no fue sino el resultado tangible de un proceso que transformaría radicalmente las bases productivas de la industria, aunque dichos laboratorios y centros surgieron en un contexto de optimismo económico que ya se vislumbraba como positivo para el sector, en tanto que su verdadera trascendencia residiría en haber sentado las condiciones para que el impulso inicial perdurara más allá del ciclo que lo vio nacer.

El andamiaje metodológico sobre el cual se edificarían tales mejoras productivas habría conformado, en su conjunto, el desarrollo sistemático de procedimientos técnicos para el manejo de reproductores, la producción escalable de microalgas, la nutrición optimizada en estadios larvarios y el control estricto del estatus sanitario, en tanto que la implementación de departamentos dedicados específicamente al cultivo de microalgas, junto con el ajuste continuo de los protocolos existentes, establecería las condiciones operativas indispensables para dichos avances, porque la formación especializada en biología, acuicultura y microbiología de los profesionales que habrían impulsado este proceso de fortalecimiento tecnológico resultaría determinante, de modo que la mejora cuantitativa y cualitativa en la supervivencia larval a escala nacional, documentada por Yockteng (2017), constituiría finalmente el resultado tangible de dicho proceso.

5.1.2 Producción y exportaciones del sector camaronero

El liderazgo exportador que hoy ostenta el camarón ecuatoriano como principal producto no petrolero del país, y que lo ha consolidado como el mayor proveedor mundial de camarón blanco del Pacífico, constituye el resultado de una transformación industrial que habría sido inconcebible sin la convergencia de tres factores interdependientes, a saber, la efectividad productiva, la calidad del producto y la capacidad de adaptación tecnológica de las empresas nacionales (Guevara Toscana et al., 2021), elementos que, si bien fueron forjados durante décadas de crecimiento extraordinario, seguirán definiendo la competitividad del sector en tanto que la industria mantenga su dinamismo innovador frente a los desafíos que impone el mercado global, lo cual explica por qué la expansión camaronera no ha dependido exclusivamente de condiciones naturales favorables, sino que ha requerido de una deliberada estrategia empresarial que supo capitalizar las oportunidades del comercio internacional aun cuando otros países de la región competían por los mismos nichos de exportación.

La marcada dependencia de la economía nacional hacia la industria acuícola queda evidenciada en un comportamiento exportador que, aunque habría de consolidarse en años posteriores con cifras que superarían los 8400 millones según Forbes (2026), ya mostraba en septiembre de 2021 una dinámica preocupante de concentración sectorial, pues las 218.351 hectáreas autorizadas para la producción de

camarón generaban en aquel entonces más de 3.671 millones de dólares (Guevara et al., 2021), mientras que la orientación de los envíos hacia mercados como China, Estados Unidos y diversos países europeos, siendo China el principal cliente, configuraba una estructura de vulnerabilidad que la CNA (2024) identificaría como signo inequívoco de la incapacidad del país para diversificar sus fuentes de ingreso externo.

5.1.3 Tecnificación y sostenibilidad de la industria camaronera

La prevalencia de prácticas productivas cada vez más sofisticadas en el sector acuícola ecuatoriano, que ya no se limitan al mero incremento de volúmenes de cosecha sino que apuntan hacia una gestión integral del cultivo, constituye el resultado de décadas de crecimiento industrial sostenido que, aunque inicialmente impulsado por la demanda internacional, eventualmente generaría las condiciones para la adopción de tecnologías de vanguardia que hoy resultan indispensables para la competitividad del país en mercados globales (Acosta, 2016).

Las empresas que operan tanto bajo esquemas semiintensivos como intensivos, estos últimos con densidades superiores a 20 individuos por metro cuadrado, han integrado en sus protocolos rutinarios herramientas de monitoreo microbiológico mediante técnicas bacteriológicas y moleculares, las cuales funcionarían en paralelo

con sistemas automatizados de control de parámetros físico-químicos, todo ello orientado a garantizar una calidad de agua óptima mientras que, simultáneamente, se implementarían rigurosas estrategias de bioseguridad que, en conjunto, permitirían maximizar los rendimientos productivos de manera sostenible (Acosta, 2016).

5.1.4 Enfermedades bacterianas y desafíos sanitarios en acuicultura

A pesar de los avances productivos y tecnológicos, uno de los principales desafíos de la industria camaronera ecuatoriana continúa siendo las enfermedades infecciosas, especialmente aquellas causadas por bacterias del género *Vibrio*. El incremento de las densidades de cultivo y la intensificación de los sistemas productivos favorecen a al incremento del estrés fisiológico, consecuentemente debilitando la respuesta inmune de los organismos y aumentar su susceptibilidad frente a patógenos oportunistas. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas sostenibles para el control microbiológico y fortalecimiento sanitario de los organismos cultivas (Defoirdt et al., 2007).

5.2 Biología general de *Penaeus vannamei*

5.2.1 Taxonomía y distribución de *Penaeus vannamei*

Penaeus vannamei, como principal crustáceo de cultivo a escala global, posición que alcanzaría gracias a un conjunto de atributos fisiológicos particularmente adaptables a los sistemas intensivos de producción, habría quedado sustentada en características como su notable velocidad de crecimiento, su capacidad para soportar amplias fluctuaciones de salinidad y su eficiente conversión alimenticia (Morales & Cuellar, 2014), rasgos todos ellos que, en tanto que ventajas comparativas frente a otras especies acuícolas, explicarían por qué un organismo taxonómicamente clasificado dentro del filo Arthropoda, subfilo Crustácea, clase Malacostraca y orden Decápoda terminaría ocupando el lugar preeminente que hoy detenta en los balances de producción mundial.

Figura 1

Penaeus vannamei (Colorado, 2014).



Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Crustacea

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Suborden: Dendrobranchiata

Familia: Penaeidae

Género: *Penaeus*

Especie: *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)

5.2.2 Anatomía general de *Penaeus vannamei*

Funcionalmente integrada y una porción posterior especializada en la locomoción constituye la organización corporal que caracteriza a estos artrópodos, pues el cefalotórax, protegido por un exoesqueleto de naturaleza quitinosa reforzado con depósitos de carbonato de calcio que le confieren rigidez estructural, albergará en su interior órganos cuya disposición refleja tanto la concentración de funciones vitales como la optimización de los espacios corporales disponibles, de modo que el hepatopáncreas, el estómago, las branquias y el corazón quedarán localizados en esta porción protegida, mientras que el abdomen, conformado por seis segmentos de naturaleza predominantemente muscular, desarrollará capacidades contráctiles que, aunque en apariencia obedecerían únicamente a la necesidad de desplazamiento, implicarán simultáneamente la coordinación neuromuscular y la integración de señales propioceptivas que permitirían al organismo adaptar sus movimientos a variables del medio ambiente que habrían de enfrentar durante su ciclo vital.

La vulnerabilidad agudizada frente a infecciones y condiciones ambientales adversas durante el ciclo de crecimiento de los camarones constituye el correlato inevitable de un proceso fisiológico denominado ecdisis, que estos organismos deberán atravesar periódicamente en tanto que su exoesqueleto, pese a cumplir funciones de protección física, soporte estructural y defensa frente a agentes externos, resulta incapaz de expandirse de manera continua, de modo que la muda se convierte en

una etapa crítica cuyas implicancias para la supervivencia ya habían sido documentadas (Lightner, 1996) y que seguirá representando un desafío evolutivo mientras persista esta restricción biomecánica en el desarrollo de los crustáceos.

5.2.3 Hepatopáncreas y función fisiológica

La relevancia sanitaria del hepatopáncreas como principal blanco de patologías bacterianas y virales en camarones peneidos (Morales & Cuellar, 2014) condiciona su estudio como órgano prioritario, aunque esta vulnerabilidad epidemiológica no sería comprensible sin reconocer previamente la complejidad funcional que lo define como estructura digestiva multifuncional, pues en él convergirán procesos que van desde la digestión mecánicoquímica y la absorción de nutrientes hasta el almacenamiento energético y la detoxificación metabólica, funciones que, si bien lo situarían como uno de los órganos más importantes en la fisiología del camarón blanco, también explicarían por qué su alta actividad metabólica y su exposición continua a patógenos ambientales lo convertirían en el sitio donde diversas enfermedades establecerían su principal residencia infectiva.

La detección temprana de procesos patológicos en organismos acuáticos, ya sea por infecciones bacterianas, estrés fisiológico o deterioro ambiental, encuentra en el hepatopáncreas un indicador particularmente sensible cuya utilidad diagnóstica radica

precisamente en que este órgano, según señalan Morales & Cuellar (2014), exhibirá en condiciones normales una coloración amarillenta o anaranjada mientras rodea parcialmente al estómago en el interior del cefalotórax, de modo que cualquier desviación observable en su tonalidad, en sus dimensiones o en la integridad de su arquitectura tubular constituirá, para quien examine al ejemplar, una señal inequívoca de que algo ha perturbado el equilibrio fisiológico del animal, aunque esa alteración podría haberse originado en múltiples factores que actuarían de manera simultánea o secuencial sobre el individuo.

5.2.4 Hemolinfa y Hemocitos

Una sustancia de notable relevancia para comprender el funcionamiento biológico y la defensa inmunitaria de *Penaeus vannamei* resulta ser la hemolinfa, la cual circula por un sistema circulatorio abierto y cumple funciones análogas a las que desempeña la sangre en otros organismos, transportando no solo nutrientes y metabolitos sino también hormonas junto con células inmunes conocidas como hemocitos, y esto agravó la necesidad de estudiarla con mayor profundidad en investigaciones posteriores (Rodriguez & Le Moullac, 2000).

La fagocitosis, la encapsulación, la coagulación, la melanización y la generación de compuestos antimicrobianos son procesos en los que intervienen activamente los hemocitos, células que resultan indispensables para sostener la respuesta inmune innata que presentan los camarones, de modo que cualquier variación en su conteo total se interpreta como un indicador sensible de estrés, infección o inmunosupresión, circunstancia que ya había sido advertida en estudios previos y que sigue vigente en la actualidad (Soderhall, 2016).

5.2.5 Sistema inmune en crustáceos

La ausencia de anticuerpos específicos en los crustáceos, condición que ya se había documentado ampliamente en vertebrados con sistemas adaptativos mucho más complejos, obliga a que el sistema inmune de *P. vannamei* opere exclusivamente a través de mecanismos innatos, y esto agravó la necesidad de comprender cómo barreras físicas, reconocimiento molecular y respuestas celulares rápidas se convierten en la única línea defensiva disponible frente a agentes patógenos, situación que sigue siendo objeto de estudio en la actualidad (Tassanakajon et al., 2013).

Una división operativa entre componentes humorales y celulares estructura la inmunidad innata de los camarones, de modo que enzimas antimicrobianas, lectinas, el sistema profenoloxidasa y péptidos antimicrobianos actúan como mecanismos

humorales, mientras que hemocitos especializados, los cuales ya habían demostrado capacidad de reconocer microorganismos invasores, ejercen la mediación de las respuestas celulares, y esto agravó la complejidad de modelar estas interacciones en condiciones de cultivo intensivo (Betancourt et al., 2024).

El sistema profenoloxidasa, que en crustáceos había sido identificado como uno de los mecanismos de defensa con mayor peso funcional, interviene en procesos de melanización y encapsulación de patógenos, de tal manera que su activación genera melanina junto con compuestos citotóxicos, los cuales limitan la proliferación microbiana, y esto agravó el interés por comprender su regulación en ambientes controlados de acuicultura (Soderhall, 2016).

Los camarones peneidos, según registros que ya se habían publicado en la literatura especializada, sintetizan una gama diversa de péptidos antimicrobianos entre los que figuran penaeidinas, crustinas y lisozimas, compuestos que resultan efectivos contra bacterias, hongos y algunos virus, y que constituyen una de las herramientas defensivas más relevantes dentro del arsenal de la inmunidad innata en crustáceos, y esto agravó la presión por caracterizar su espectro de acción en ensayos de laboratorio (Tassanakajon et al., 2013).

5.2.6 Influencia del estrés ambiental sobre la inmunidad.

Una susceptibilidad incrementada frente a enfermedades infecciosas, que ya había sido reportada en poblaciones sometidas a condiciones adversas, se vincula directamente con alteraciones en la función inmunológica de *P. vannamei*, y esto agravó la necesidad de comprender cómo la salinidad, la temperatura, la calidad de agua y la densidad de cultivo, factores ambientales que operan de manera simultánea en los estanques, configuran escenarios de estrés capaces de modificar la respuesta inmune del camarón, situación que sigue siendo relevante en la actualidad (La Moullar & Haffner, 2000).

Los procesos patológicos severos que desencadenan toxinas producidas por bacterias oportunistas, especialmente del género *Vibrio*, las cuales ya habían demostrado capacidad de colonizar tejidos internos, se favorecen en cultivos intensivos donde la acumulación de materia orgánica y las fluctuaciones ambientales generan condiciones propicias para su proliferación, y esto agravó la complejidad de mantener parámetros estables en sistemas de producción acuícola, circunstancia que sigue presentando desafíos para los productores (De Schryver et al., 2014).

5.3 Vibriosis

5.3.1 *Vibrio spp.* y las enfermedades bacterianas en camarón

Una problemática que ya había afectado severamente los sistemas intensivos de cultivo y la larvicultura, y que sigue siendo una de las principales preocupaciones sanitarias en la camaronicultura, se vincula con bacterias del género *Vibrio*, microorganismos Gram negativos y halófilos que habitan de manera natural ambientes marinos y estuarinos, y esto agravó la necesidad de comprender por qué especies como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio vulnificus*, las cuales generalmente operan en condiciones donde todo tiene su origen en la calidad del agua, adoptan comportamientos oportunistas cuando existen condiciones desfavorables que aumentan el estrés, provocando en larvas y juveniles de camarón signos clínicos que incluyen intestino vacío, reducción del apetito, hepatopáncreas pálido, letargo y mortalidades progresivas, circunstancia que sigue siendo objeto de investigación en la actualidad (De Schryver et al., 2014; Lightner, 2011).

La detección temprana de cepas virulentas y una comprensión más precisa de la dinámica de las enfermedades bacterianas en camarón, objetivos que ya se habían planteado en investigaciones previas, han sido posibilitadas por el uso de herramientas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR o qPCR), y esto agravó la presión por implementar monitoreo bacteriológico constante junto con estrategias de control de materia orgánica, enfoques que constituyen el manejo moderno de la

vibriosis, pues los brotes bacterianos, según registros que ya habían sido publicados, no dependen únicamente de la presencia de vibrios patógenos sino también del desequilibrio microbiano dentro del sistema de cultivo, situación que sigue siendo relevante en la actualidad (De Schryver et al., 2014).

5.3.2 AHPND: etiología e impacto en la acuicultura

Un debilitamiento rápido junto con elevadas mortalidades, que ya habían sido observados en la producción de camarón a nivel mundial, se vinculan al deterioro del hepatopáncreas, órgano que cumple funciones esenciales en la digestión, la absorción de nutriente y el almacenamiento energético, y esto agravó la necesidad de comprender que la necrosis masiva de este tejido se origina por toxinas PirAB producidas por un plásmido bacteriano que porta genes de virulencia pirA y pirB en cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*, descubrimiento que se realizó posteriormente a la demostración de Tran et al. (2013) sobre la naturaleza infecciosa de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), patología que sigue siendo considerada una de las más severas en la camaronicultura global (Tran et al., 2013; Soto-Rodriguez et al., 2015).

Una amenaza importante para laboratorios de larvas, y piscinas de precría y engorde, que ya había sido identificada por su rápida propagación y severidad, continúa representando un riesgo para la camaronicultura mundial, y esto agravó la necesidad de que la Organización Mundial de Sanidad Animal reconociera oficialmente a la AHPND como enfermedad infecciosa emergente de gran impacto económico, circunstancia que se ha tornado más compleja tras detectarse en investigaciones recientes genes *pirAB* en otras especies del género *Vibrio* como *Vibrio campbellii* y *Vibrio owensii*, hallazgo que sugiere transferencia horizontal de plásmidos de virulencia entre bacterias marinas (Xiao et al., 2017), y que sigue siendo objeto de vigilancia oficial en la actualidad (WOAH, 2023).

5.3.3 Diagnóstico y manejo sanitario de la vibriosis y AHPND.

La confirmación diferencial de la enfermedad en casos de vibriosis y AHPND, que ya había sido reconocida como un desafío técnico en laboratorios especializados, exige una integración simultánea de métodos que abarcan análisis clínicos, histopatológicos, bacterianos y moleculares, y esto agravó la necesidad de que la identificación de genes *pirA* y *pirB* mediante PCR adquiriera carácter fundamental, dado que Soto et al. (2015) confirmaron experimentalmente que no todas las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* son patógenas, circunstancia que obliga a discriminar entre aislamientos virulentos y no virulentos antes de emitir un diagnóstico definitivo, mientras que entre las técnicas más utilizadas destacan el cultivo bacteriano en agar

TCBS, medios cromogénicos (CHROMagar Vibrio) y el análisis de los órganos mediante montajes en fresco e histopatología del hepatopáncreas, procedimientos que ya habían demostrado utilidad en el diagnóstico diferencial y que siguen siendo aplicados en la actualidad.

5.4 Tratamientos profilácticos frente a la vibriosis.

5.4.1 Limitación de antibióticos y necesidad de alternativas.

Un fenómeno mediante el cual las bacterias adquieren mecanismos que les permiten sobrevivir a concentraciones de antibióticos que anteriormente eran efectivos, y que ya había sido identificado en estudios previos sobre resistencia bacteriana, se ha tornado en uno de los principales problemas derivados del uso excesivo e indiscriminado de estos compuestos, y esto agravó la preocupación por la aparición de cepas multirresistentes de *Vibrio spp.*, las cuales dificultan el tratamiento de brotes de vibriosis y reducen la eficacia terapéutica de diversos antimicrobianos, circunstancia que obliga a reconsiderar que durante varios años los antibióticos fueron una de las principales herramientas utilizadas para el control de enfermedades bacterianas en acuicultura, incluyendo las infecciones causadas por *Vibrio spp.* en camarón, situación que sigue generando serias preocupaciones sanitarias, ambientales y productivas en la actualidad (Defoirdt et al., 2011).

Un riesgo para la salud pública y el comercio internacional, que ya había sido advertido por mercados de exportación mediante restricciones sanitarias, se vincula con la acumulación de compuestos residuales de antibióticos en el medio acuático, sedimentos y tejidos de los organismos cultivados, y esto agravó la necesidad de comprender que el uso prolongado de estos compuestos altera negativamente la microbiota natural del sistema de cultivo y del tracto digestivo del camarón, de modo que la eliminación indiscriminada de bacterias benéficas, fenómeno que ya había sido documentado en investigaciones previas, favorece desequilibrios microbianos que permiten la proliferación de vibrios oportunistas y otros microorganismos patógenos, circunstancia que sigue siendo relevante más allá de la resistencia bacteriana en la actualidad (Cabello, 2006).

Un conjunto de estrategias que ya habían demostrado potencial en investigaciones previas, entre las cuales destacan el uso de probióticos, prebióticos, inmunoestimulantes, aceites esenciales, bacteriófagos y ácidos orgánicos, ha sido orientado por la acuicultura moderna hacia el desarrollo de alternativas profilácticas más sostenibles y seguras, y esto agravó la presión por abandonar prácticas tradicionales, pues como consecuencia de estas problemáticas, que ya habían sido identificadas como limitantes sanitarias y productivas, la búsqueda de nuevas herramientas de control sigue siendo una prioridad en la actualidad.

5.4.2 Aceites esencial de orégano y sus propiedades antimicrobianas

Una disminución de la mortalidad en organismos acuáticos junto con una reducción en el crecimiento bacteriano, efectos que ya habían sido documentados en ensayos con *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, se vincula con la actividad inhibitoria que posee el aceite esencial de orégano, y esto agravó la necesidad de reconocer que diversos estudios han demostrado este fenómeno, mientras que más allá de su acción antimicrobiana directa, también puede actuar como inmunomodulador, favoreciendo la respuesta inmune innata del camarón mediante el aumento de la actividad fagocítica, la producción de enzimas antioxidantes y el fortalecimiento de barreras fisiológicas, mecanismos que ya habían sido reportados y que siguen siendo objeto de investigación en la actualidad (Domínguez, 2020; Anzoátegui, 2025). Una capacidad de favorecer la respuesta inmune innata mediante el fortalecimiento de barreras fisiológicas, la producción de enzimas antioxidantes y el aumento de la actividad fagocítica, que ya había sido atribuida a su potencial inmunomodulador, se suma a la acción antimicrobiana directa del aceite esencial de orégano, y esto agravó el interés por comprender cómo estos efectos combinados operan en condiciones de cultivo intensivo, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Duche, 2025).

Un menor riesgo de generar resistencia bacteriana en comparación con los antibióticos convencionales, que ya había sido identificado como una ventaja de las alternativas naturales, se vincula con la capacidad de los aceites esenciales para incorporarse en el alimento balanceado o aplicarse en dosis controladas dentro del sistema de cultivo, y esto agravó la necesidad de evaluar rigurosamente su eficacia, pues esta depende de factores como la concentración mínima inhibitoria (MIC), el método de administración, la estabilidad química y la calidad del aceite utilizado, variables que ya habían sido reconocidas como determinantes en estudios previos y que siguen condicionando su uso en la actualidad.

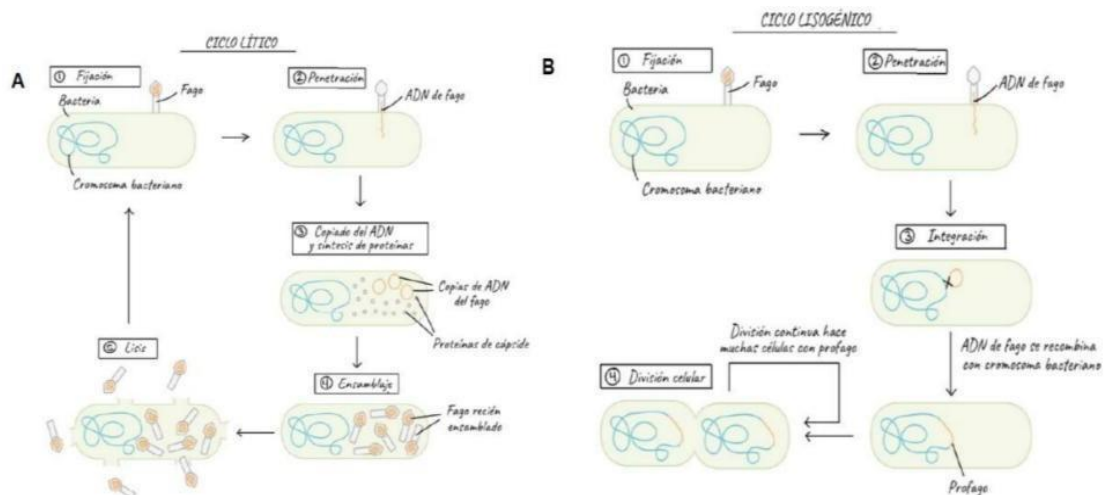
5.4.3 Bacteriófagos

La microbiota benéfica del sistema de cultivo o del tracto digestivo del camarón permanece sin alteraciones significativas cuando bacterias patógenas son eliminadas selectivamente, y esto agravó la necesidad de comprender que solo agentes con alta especificidad pueden lograr tal discriminación, siendo los bacteriófagos virus que reconocen receptores específicos en la superficie bacteriana, inyectan su material genético y utilizan la maquinaria celular del hospedero para replicarse provocando finalmente la lisis y destrucción de la bacteria, mecanismo que ya había sido identificado como una de las alternativas biotecnológicas más prometedoras para el control de enfermedades bacterianas dentro de la acuicultura, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Sulakvelidze et al., 2001).

Los fagos se multiplican únicamente en presencia de la bacteria objetivo, circunstancia que permite mantener su efecto mientras exista el patógeno en el sistema, y esto agravó la necesidad de comprender que la reducción de la carga bacteriana en agua, sedimentos y organismos infectados, que ya había demostrado potencial para disminuir la incidencia de brotes y mejorar la supervivencia de larvas y juveniles, se logra mediante bacteriófagos que poseen actividad lítica frente a especies patógenas como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, hallazgo que en el caso de la vibriosis ya había sido documentado en diferentes investigaciones y que sigue siendo relevante en la actualidad.

Figura 2

Ciclo lítico (A) y lisogénico (B) de los bacteriófagos.



Nota. En el ciclo lítico (A), el bacteriófago se fija a la bacteria, introduce su material genético, utiliza la maquinaria celular para producir nuevos fagos y provoca la lisis de la célula. En el ciclo lisogénico (B), el ADN del fago se integra en el cromosoma bacteriano como profago y se replica durante la división celular (Arreaga, 2025).

5.4.4 Ecología microbiana de *Vibrio* spp. y variabilidad entre lotes.

La proporción de cepas potencialmente patógenas y la abundancia de *Vibrio* varían considerablemente entre momentos y sitios de muestreo, incluso cuando se emplean métodos de cuantificación equivalente, y esto agravó la necesidad de comprender que su detección no equivale a enfermedad automáticamente, puesto que el resultado depende de la densidad bacteriana, la virulencia de la cepa, el estado fisiológico del hospedero y las condiciones ambientales, circunstancia que ya había sido reportada en ambientes marinos, agua de cultivo y tracto digestivo de organismos acuáticos donde las bacterias del género *Vibrio* forman parte de la microbiota natural, y que sigue siendo relevante en la actualidad (Bacian et al., 2021).

5.4.5 Bases de la terapia combinada y concepto de sinergia

El efecto que debe superar significativamente lo esperado a partir de los tratamientos individuales, condición que ya había sido planteada como necesaria para demostrar sinergia, exige que la combinación de agentes antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes no se limite a generar respuestas aditivas, sinérgicas, subaditivas o antagónicas, y esto agravó la necesidad de comprender que un mejor resultado descrito del tratamiento combinado respecto al control no constituye por sí mismo evidencia de sinergia, circunstancia que en este estudio se evaluó mediante el termino de interacción bacteriófago x aceite esencial en un diseño factorial 2 x 2.

El control prolongado del recrecimiento bacteriano en un modelo experimental, que ya había sido demostrado en estudios anteriores al combinar fagos y carvacrol (compuesto activo antimicrobiano del orégano), dependió de la dosis y del orden de aplicación para definir la magnitud del beneficio, y esto agravó la necesidad de comprender que los bacteriófagos reducen poblaciones bacterianas susceptibles mediante infección, replicación y lisis, mientras que el aceite esencial de orégano puede alterar membranas, interferir con procesos metabólicos y reducir expresiones asociadas con virulencia o comunicación celular, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Kuek et al. 2023).

5.4.6 Factores que condicionan la administración oral

La reducción de pérdidas antes de que el compuesto alcance el intestino, mecanismo que ya había sido atribuido a la encapsulación y otros sistemas de protección, mejoró la eficacia de aditivos biológicos a *P. vannamei*, y esto agravó la necesidad de comprender que la eficacia de un tratamiento incorporado al alimento depende de la homogeneidad del recubrimiento, la estabilidad durante el almacenamiento, la lixiviación en el agua, el consumo real por individuo y la supervivencia del principio activo durante el tránsito digestivo, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Andriani et al., 2022).

La susceptibilidad de los aislados circulantes, la estabilidad a diferentes condiciones y la caracterización de la cinética lítica, factores que ya habían sido confirmados en estudios recientes de fagos dirigidos contra vibrios en acuicultura como determinantes del potencial terapéutico, agregaron complejidad al examen de bacteriófagos, y esto agravó la necesidad de comprender que además de la estabilidad se necesita examinar el rango de hospedero, el título viable, la multiplicidad de infección y la presencia de receptores bacterianos accesibles, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Fu et al., 2022).

5.5 Medios de cultivo

5.5.1 TCBS

La diferenciación fenotípica de las colonias, que ya había sido facilitada por la fermentación de sacarosa en un medio cuyo pH alcalino y cuya presencia de citrato y sales biliares limitan el crecimiento de una parte de la microbiota acompañante, se vincula con el agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS), empleado para el aislamiento presuntivo de bacterias del género *Vibrio*, y esto agravó la necesidad de comprender que las colonias amarillas se asocian con microorganismos fermentadores de sacarosa y las verdes o verde azuladas con microorganismos no fermentadores, circunstancia que obliga a complementar la coloración colonial con pruebas bioquímicas o moleculares cuando se requiera confirmar la especie o su potencial de virulencia, dado que esta lectura es presuntiva, y que sigue siendo relevante en la actualidad (Hammerl et al., 2021).

5.5.2 CHROMagar Vibrio

La capacidad de discriminación cultural, que ya había sido aumentada mediante el empleo conjunto con TCBS, se vincula con CHROMagar Vibrio, medio que contiene sustratos cromogénicos que permiten diferenciar de manera presuntiva grupos de *Vibrio* según el color y la morfología de las colonias, y esto agravó la necesidad de comprender que en este estudio se utilizó para estimar la fracción cultivable de vibrios totales y reconocer fenotipos compatibles con las especies de interés, circunstancia que no impide considerar.

El resultado como una identificación confirmatoria, pues la cuantificación en estos medios se interpretó, por tanto, como un indicador microbiológico presuntivo y no como demostración molecular de patogenicidad, y esto agravó la necesidad de reconocer que la coincidencia de color entre especies y la variabilidad fenotípica de los aislados ya habían limitado la certeza diagnóstica, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Potdukhe et al., 2021).

6 METODOLOGÍA

6.1 Tipo de Estudio.

La cuantificación de cargas bacterianas, conteo total de hemocitos y alteraciones clínicas en juveniles de *Penaeus vannamei*, objetivo que ya había sido planteado en estudios previos, se logró mediante un bioensayo in vivo con apoyo de técnicas in vitro, y esto agravó la necesidad de comprender que la investigación fue cuantitativa, comparativa y experimental, pues los tratamientos profilácticos con bacteriófagos, aceite esencial de orégano y la combinación de ambos fueron aplicados a organismos sometidos a condiciones controladas, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

6.2 Área de Estudio.

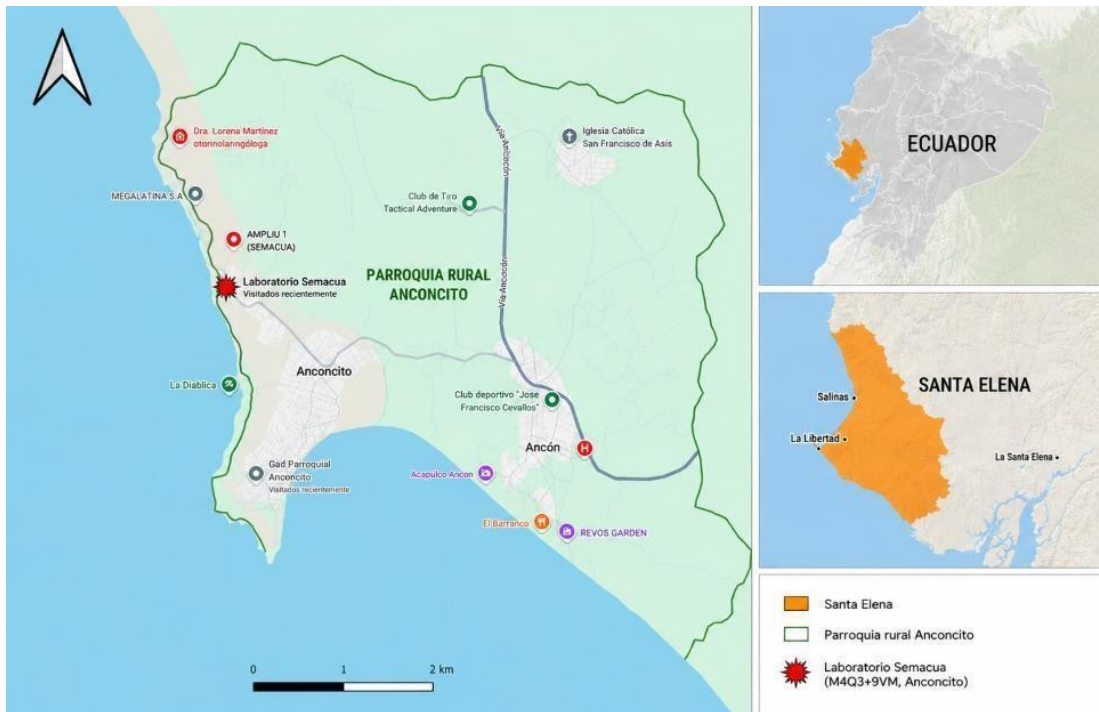
El laboratorio camaronero Semacua S.A., ubicado en la parroquia Anconcito, cantón Salinas, provincia de Santa Elena (2° 18' 41" S, 80° 53' 44" W), albergó las actividades que se realizaron, y esto agravó la necesidad de precisar el área de estudio, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

6.3 Ubicación Geográfica.

La ubicación geográfica del laboratorio camaronero Semacua S.A., localizado en la parroquia Anconcito, cantón Salinas, provincia de Santa Elena, en las coordenadas 2°18'41" S y 80°53'44" W, que ya había sido georreferenciada en trabajos previos, se presenta en la Figura 3, y esto agravó la necesidad de precisar la referencia espacial, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

Figura 3

Mapa geográfico



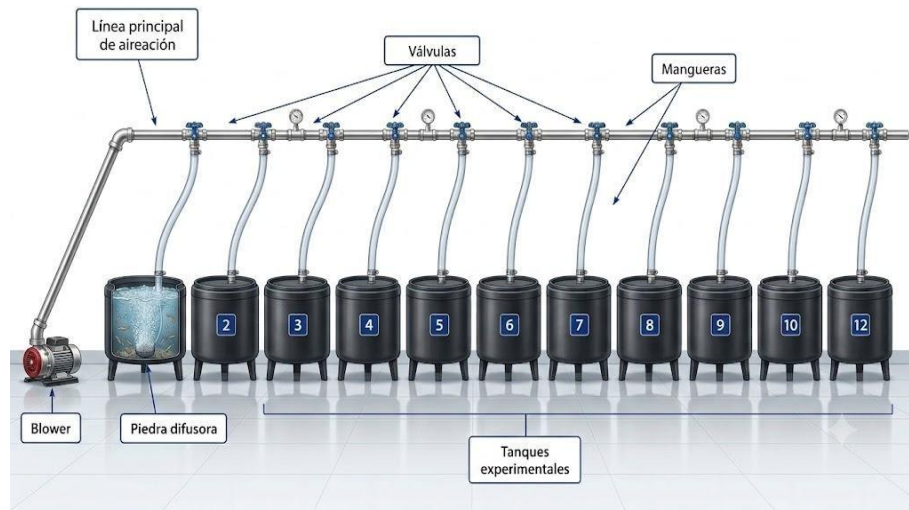
(QGIS, 2026)

6.4 Diseño experimental.

Se desarrollaron dos corridas experimentales independientes con juveniles de 10g de peso promedio. En cada corrida se utilizaron cuatro grupos: control sin tratamiento profiláctico (C), bacteriófagos (T1), aceite esencial de orégano (T2) y combinación de bacteriófagos con aceite esencial (T3). Los principales principios activos presentes en cada tratamiento consisten en un bacteriófago específico para *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) en el tratamiento 1 (T1) y el carvacrol (*Origanum vulgare*) (CAS 8007-11-2) para el tratamiento 2 (T2). Cada tratamiento estuvo representado por tres tanques por corrida; por lo tanto, el bioensayo completo comprendió seis tanques por tratamiento y 24 unidades experimentales. Cada unidad experimental correspondió a un tanque de 250 L con 18 animales en la primera corrida y 15 animales en la segunda, lo que representa una densidad de siembra de 22.92 ind/m² y 19.10 ind/m² respectivamente, y manteniendo la salinidad del sitio de origen (20 – 24 ppt).

Figura 4

Diseño completamente aleatorizado con un grupo control, 3 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento.



Nota. Los tanques fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los cuatro grupos de tratamiento.

6.5 Monitoreo y mantenimiento.

La bitácora física (cuaderno) y la digital (hoja de cálculo en Microsoft Excel) albergaron el registro diario de población, mortalidad, actividad, parámetros de agua como temperatura, salinidad, pH, amonio, nitrito, y novedades respecto a la salud, y esto agravó la necesidad de sistematizar la información en ambos formatos, pues este registro diario se realizó de manera simultánea, circunstancia adoptada en protocolos previos y que sigue siendo relevante.

Una mortalidad del 8.33% a 20 ppm de amonio, que ya había sido reportada por Frías (1997), se vincula con la toxicidad diferencial según estadios, pues a pesar de no ser igual de tóxico que en nauplios y postlarvas, este parámetro debe considerarse, y esto agravó la necesidad de realizar recambios del 50% diarios a las 10:00 para evitar su incremento, mientras que mortalidades de hasta 60% a 20 ppm de nitrito, previamente documentadas por Escobar & Nieto (2021), exigen recambios adicionales para impedir la conversión de amonio a nitrito, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

El amplio rango entre 5 y 35 ppt donde los juveniles pueden desarrollarse adecuadamente, según Fraga et al., (1997), permitió que la salinidad variara entre corridas según el sitio de origen, donde fluctuó entre 15 y 25 ppt, y esto agravó la necesidad de registrar los parámetros una hora antes de cada alimentación, pues la toma y registro en bitácora se realizó en ese horario, circunstancia que sigue siendo relevante.

6.6 Métodos.

6.6.1 Aplicación de los tratamientos

La cobertura homogénea que se consiguió mediante la mezcla del alimento tratado, se preparó separadamente para cada tratamiento con el fin de evitar contaminación cruzada, empleando gelatina sin sabor (a base de alginato) como aglutinante en una relación aproximada de 20 mL por cada 100 g de alimento, pues los productos en polvo se integraron al alimento balanceado mediante inclusión superficial, circunstancia que se realizó cada tres días y que sigue siendo relevante, cabe recalcar que la aplicación inicio un día después del análisis preinfección hasta el final del ensayo. Conservando una tasa de alimentación diaria (TDA) de 2.5% de su biomasa, con tres raciones diarias, y manteniendo vigilancia a la calidad del agua.

La distribución uniforme en la superficie de los pellets, que ya había sido procurada durante la mezcla junto con el aglutinante, se logró para el tratamiento T2 con el producto experimental de aceite esencial de orégano en la dosis de 3g/kg de balanceado, y esto agravó la necesidad de incorporar conjuntamente el producto de orégano y los bacteriófagos en T3, también aplicados según la dosis definida para el bioensayo: 7g/kg de balanceado para bacteriófagos en polvo y 3g/kg para el aceite esencial en polvo, circunstancia que cabe recalcar que las dosis fueron definidas según las recomendaciones del fabricante y que sigue siendo relevante.

El cronograma experimental (Figura 4) guió la administración profiláctica que comenzó después del muestreo preinfección y se mantuvo durante el período correspondiente, y esto agravó la necesidad de respetar la secuencia temporal, circunstancia que sigue siendo relevante.

La exposición del hospedero al agente lítico durante el periodo de mayor riesgo se buscó asegurar mediante administración previa y posterior al desafío, y esto aumentó la necesidad de incorporar los bacteriófagos en polvo al alimento de T1 y T3 mediante el mismo procedimiento de aglutinación, pues se aplicó una dosis de 7g/kg de alimento balanceado según la recomendación del fabricante, circunstancia que sigue siendo relevante.

6.6.2 Análisis a realizar.

Las observaciones resumidas a nivel de tanque, definidas como unidad de análisis, no consideraron replicas independientes a los camarones individuales, seleccionando al azar los 10 animales destinados a la evaluación preinfección, mientras que para el análisis postinfección se tomó como muestra 10 juveniles por tanque para el análisis bacteriológico y 5 animales por tanque para montajes en fresco y conteo de hemocitos, circunstancia que sigue siendo relevante.

6.6.2.1 Montajes en fresco

Los cambios en la coloración de los filamentos branquiales, como melanización, necrosis, áreas blanquecinas bien definidas, junto con la presencia de detritos del fondo del estanque, restos de microalgas, hongos, aglomerados de bacterias y deformaciones, se buscaron en el portaobjetos donde se colocó la pequeña porción de branquias, y esto agravó la necesidad de eliminar previamente con tijeras finas el exoesqueleto que recubre estas estructuras, circunstancia que sigue siendo relevante (Morales & Cuellar, 2014). .

El Índice Hepatosomático (HSI% O HPI%) que se obtuvo del pesaje del hepatopáncreas y del individuo total, procedimiento que ya había sido estandarizado, permitió decidir sobre atrofia o hipertrofia del órgano tras observar su coloración y tamaño, y esto agravó la necesidad de destapar el cefalotórax con pinzas estériles para descubrir el hepatopáncreas y el estómago, mientras que la coloración del fluido, textura, melanización y necrosis tubular, además de posibles deformidades de los túbulos, nódulos hemocíticos y encapsulación, se observaron bajo microscopio tras retirar con las mismas pinzas esta membrana que cubre el hepatopáncreas y extraer una porción, circunstancia que ya había sido descrita por Morales & Cuellar et al. (2014) y que sigue siendo relevante.

La observación al microscopio óptico, que ya había sido programada como etapa final del procedimiento, se realizó tras presionar con el cubreobjetos la muestra extendida en el portaobjetos, y esto agravó la necesidad de extraer con mucho cuidado el intestino por la región posterior, evitando que este se rompa, para lo cual se separó el abdomen del cefalotórax, del telson y se retiraron los urópodos, circunstancia que sigue siendo relevante.

Tabla 1

Descripción de signos clínicos y grados de severidad para montajes en fresco de branquias.

Signo clínico	Descripción	Grados de severidad (0–4)
Epicomensales	Organismos adheridos a las lamelas o filamentos branquiales, capaces de producir irritación, obstrucción e interferencia con el intercambio gaseoso.	0: ausentes. 1: muy baja presencia (1–5 organismos por lamela/organismo). 2: moderada (6–10). 3: alta (11–20), con lesiones asociadas. 4: severa (>20), con obstrucción, melanización o necrosis.
Filamentos deformados	Curvatura, engrosamiento, acortamiento, fusión o pérdida de la disposición normal de filamentos y lamelas branquiales.	0: estructura normal. 1: deformación focal mínima. 2: varias lamelas afectadas. 3: deformación marcada de numerosos filamentos. 4: alteración generalizada con pérdida de la arquitectura branquial.
Necrosis	Pérdida de integridad de las lamelas, con áreas opacas o blanquecinas, fragmentación y deterioro del tejido branquial.	0: ausente. 1: lesión focal mínima. 2: varias áreas pequeñas de necrosis. 3: daño marcado en numerosos filamentos. 4: necrosis extensa y generalizada.
Melanización	Depósitos oscuros de melanina sobre filamentos o lamelas, asociados con lesión, irritación o respuesta frente a agentes externos.	0: ausente. 1: uno o pocos focos pequeños. 2: varios focos o lamelas afectadas. 3: áreas extensas. 4: melanización severa y generalizada.
Suciedad y detritos	Acumulación de material orgánico, sedimento o restos particulados sobre filamentos y lamelas branquiales.	0: branquias limpias. 1: depósitos escasos y focales. 2: acumulación moderada en algunas lamelas. 3: acumulación abundante en gran parte de las branquias. 4: recubrimiento generalizado u obstrucción evidente.
Protozoarios	Presencia de protozoarios libres o adheridos sobre las estructuras branquiales, diferenciados del registro general de epicomensales en la base de datos.	0: ausentes. 1: presencia aislada. 2: presencia moderada en varias lamelas. 3: abundantes y extendidos. 4: infestación severa, con obstrucción o lesiones branquiales asociadas.

Nota. Lightner (1996); Morales & Cuellar (2014).

Tabla 2

Descripción de signos clínicos y grados de severidad para montajes en fresco de hepatopáncreas.

Signo clínico	Descripción	Grados de severidad (0–4)
Deformación tubular	Pérdida de la forma regular de los túbulos hepatopancreáticos, con contornos irregulares, estrechamiento, dilatación o desorganización de la arquitectura tubular.	0: sin deformación. 1: muy baja (1–5 túbulos deformados por organismo). 2: moderada (6–10). 3: alta (11–20), con alteraciones celulares asociadas. 4: severa (>20), con pérdida extensa de la arquitectura tubular.
Desprendimiento celular	Separación de células epiteliales de la pared tubular y presencia de células o restos celulares libres en la luz del túbulo.	0: ausente. 1: focal y escaso. 2: evidente en varios túbulos, pero limitado. 3: frecuente y extendido. 4: generalizado, con pérdida extensa del epitelio tubular.
Túbulos vacíos	Túbulos con reducción marcada o ausencia de contenido celular y digestivo en su luz, indicativos de alteración de la actividad digestiva o deterioro tisular.	0: ausentes. 1: ocasionales y focales. 2: presentes en una proporción moderada del montaje. 3: frecuentes y extensos. 4: predominantes o generalizados.
Atrofia	Reducción del tamaño del órgano o de los túbulos, acompañada de adelgazamiento estructural y disminución del tejido funcional.	0: tamaño y estructura normales. 1: reducción mínima o focal. 2: reducción leve a moderada. 3: atrofia marcada en gran parte del tejido. 4: atrofia severa y generalizada.
Reducción de vacuolas lipídicas	Disminución de las vacuolas citoplasmáticas asociadas con almacenamiento y metabolismo de lípidos en las células de los túbulos.	0: vacuolización normal. 1: reducción mínima. 2: reducción moderada en varios túbulos. 3: disminución marcada en la mayoría de los túbulos. 4: vacuolas escasas o prácticamente ausentes.
Melanización	Presencia de áreas oscuras o depósitos de melanina dentro o alrededor de los túbulos como respuesta a lesión, inflamación o encapsulación.	0: ausente. 1: uno o pocos focos pequeños. 2: varios focos claramente visibles. 3: áreas extensas en numerosos túbulos. 4: melanización severa y generalizada.
Necrosis	Degeneración y muerte celular, con pérdida de integridad del epitelio, restos celulares y alteración de la estructura tubular.	0: ausente. 1: focos aislados. 2: varios focos con daño moderado. 3: necrosis extensa en múltiples túbulos. 4: necrosis generalizada y destrucción marcada del tejido.

Nota. Lightner (1996); Morales & Cuellar (2014).

Tabla 3

Descripción de signos clínicos y grados de severidad para montajes en fresco de intestino.

Signo clínico	Descripción	Grados de severidad (0–4)
Inflamación	Engrosamiento, irregularidad o alteración de la pared intestinal, con reacción celular y pérdida variable de su organización normal.	0: pared normal. 1: alteración focal mínima. 2: inflamación leve a moderada. 3: inflamación marcada y extendida. 4: inflamación severa y generalizada, con deterioro evidente de la pared.
Melanización	Presencia de focos o áreas oscuras compatibles con deposición de melanina en la pared o regiones adyacentes al intestino.	0: ausente. 1: foco aislado. 2: varios focos pequeños. 3: áreas extensas o múltiples. 4: melanización intensa y generalizada.
Contenido vacío	Reducción o ausencia de contenido alimenticio o fecal en la luz intestinal, utilizada como indicador indirecto de inapetencia o alteración digestiva.	0: contenido intestinal normal. 1: reducción leve. 2: contenido parcialmente reducido. 3: intestino casi vacío. 4: intestino completamente vacío.

Nota. Lightner (1996); Morales & Cuellar (2014).

6.6.2.2 Supervivencia y mortalidad

La curva Kaplan-Meier que posteriormente se elaboró, y que ha sido contemplada como herramienta de análisis en estudios previos, requirió un valor porcentual que representara la supervivencia de cada tratamiento, y esto agravó la necesidad de calcular previamente la supervivencia por tanque como el porcentaje de organismos vivos al finalizar el bioensayo respecto al inicio de la alimentación, circunstancia que obligó a registrar la mortalidad de manera diaria, pues este seguimiento se realizó con rigor durante todo el ensayo, y que sigue siendo relevante en la actualidad.

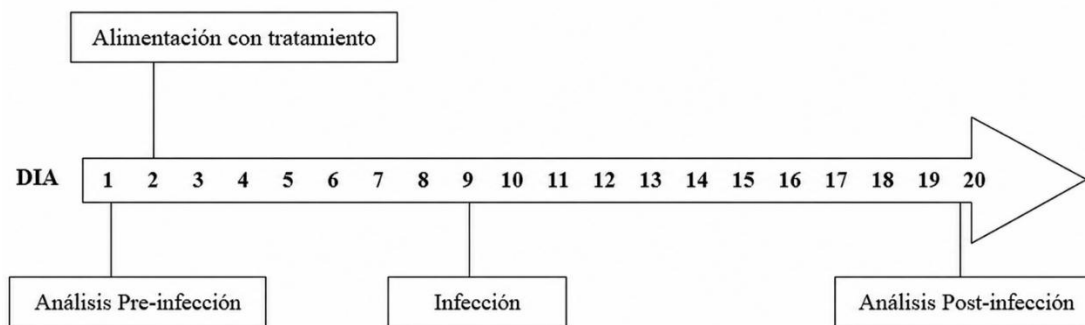
6.6.3 Análisis In vitro.

El conocimiento del estado de salud inicial de los organismos experimentales se buscó mediante la selección de 20 individuos para el análisis preinfección organizados en forma de dos pools de 10 organismos, y esto agravó la necesidad de realizar un conteo de hemocitos con el fin de conocer el estado inmunológico de los individuos para posterior correlación con la carga bacteriana y signos clínicos, mientras que los análisis bacteriológicos mediante siembras de hepatopáncreas y hemolinfa en TCBS y CHROMagar Vibrio se ejecutaron posteriormente a los montajes en fresco, donde se examinaron bajo microscopio muestras de hepatopáncreas, branquias e intestino, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Morales & Cuellar, 2014).

Los dos análisis (1 pre-infección y 1 post infección) que se realizaron durante cada bioensayo, distribuidos según indica la figura 3, con una duración de 20 días aproximadamente, se completaron en dos corridas durante un periodo de tres meses entre marzo y junio, y esto agravó la necesidad de muestrear 10 juveniles por tanque para los análisis post infección, de los cuales 5 fueron destinados para montajes en fresco, dos para extracción de hemolinfa y 10 para bacteriología del hepatopáncreas, sembrando en Chromagar y TCBS un pool por tanque, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Morales & Cuellar, 2014).

Figura 5

Cronograma del bioensayo



Nota: La figura muestra la secuencia del experimento. Los animales se aclimataron tres días previo al inicio del ensayo. Alimentación con el tratamiento para T1, T2 y T3 desde el día 2 hasta el final de la corrida. La infección se realizó acorde a la metodología mencionada en la sección 6.6.3.2, y se la realizó durante tres días seguidos.

6.6.3.1 Preparación de la suspensión bacteriana

La cepa Vp+418 de *Vibrio parahaemolyticus*, cedida por South Florida Farming Corp., que ya había sido seleccionada para el desafío experimental, se empleó en la preparación de una suspensión bacteriana ajustada al estándar de turbidez 0,5 de McFarland, y esto agravó la necesidad de diluir un concentrado bacteriano en solución salina estéril al 2.5%, pues los camarones fueron infectados mediante la inyección de esta suspensión, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Peña & Varela, 2015).

La siembra del inóculo, que siempre confirmó la concentración (UFC/mL) en el exponente deseado, validó la suspensión con una concentración estimada de 1.5×10^6 UFC/mL (lo que equivale a una dosis infectiva de 1.5×10^5 UFC/mL que se inyectó tras diluir la preparada a partir del patrón de turbidez de McFarland, la cual estimaba una concentración promedio de 1.5×10^8 UFC/mL, y esto agravó la necesidad de realizar diluciones seriadas y siembra en CHROMagar Vibrio para determinar la concentración, pues la medición inicial de la densidad óptica a 600nm (OD600) ya había servido como indicador rápido de la turbidez y biomasa bacteriana del cultivo, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Li et al., 2020; Ellett et al., 2022; Leighton et al., 2023; Pozo et al., 2024; Peña & Varela, 2015).

6.6.3.2 Inoculación

Los 100 µL de la suspensión que se inyectaron en cada individuo, dosis que ya había sido estandarizada en protocolos previos, se administraron mediante aplicación intramuscular en la región dorsal o dorso lateral, entre el tercer y cuarto segmento abdominal con una jeringa estéril de 1 ml y aguja de calibre 29x½, y esto agravó la necesidad de evitar traumatismos excesivos, pues los juveniles fueron capturados dentro de una malla o chayo para luego ser tomados uno por uno, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Peña & Varela, 2015).

6.6.3.3 Procesamiento

El área de trabajo que se desinfectó con cloro a 10% y posteriormente con alcohol a 75%, secando con papel toalla, requirió una serie de materiales que ya habían sido listados en protocolos previos, y esto agravó la necesidad de contar con una gradilla, un rotulador, jeringas de insulina (1 ml), microtubos (eppendorf), mechero de bunsen, alcohol a 75%, cloro a 10%, una balanza digital, pinzas estériles y papel toalla, pues el procesamiento de juveniles se realizó con estos insumos, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

La cuantificación de hemocitos totales que se realizó a partir de la hemolinfa extraída y colocada en una Cámara de Neubauer o hemocitómetro, junto con la siembra de hemolinfa de forma directa sin diluciones en anticoagulante. Cabe mencionar que se extrajo 100 μ L de hemolinfa con una jeringa de insulina previamente cargada con 100 μ L de citrato de sodio al 10% con el bisel de la aguja hacia arriba en el sitio de punción, en el seno hemolinfático ventral localizado entre el abdomen y el cefalotórax, logrando una relación 1:1 (Morales & Cuellar, 2014).

Los órganos que quedaron finalmente expuestos, tras destapar el cefalotórax dorsalmente ubicando pinzas sumergidas en alcohol y flameadas entre el primer segmento abdominal y el cefalotórax aplicando presión hacia abajo, ya habían sido

revelados mediante esta técnica descrita previamente, y esto agravó la necesidad de extraer el hepatopáncreas de 10 individuos por tanque para macerar en pool dentro de un microtubo y posteriormente poner en tubo de ensayo con 9ml de solución salina al 2%, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Cuellar, 2014).

La maceración y los pasos siguientes que se realizaron en el área designada para la simbra en placas Petri con CHROMagar Vibrio y Agar TCBS, requirieron previamente la acumulación de muestra hasta al gramo, y esto agravó la necesidad de extraer una porción del hepatopáncreas con una pinza estéril y colocarla en un microtubo, pues con las pinzas se elevó el ciego dorsal dejando el hepatopáncreas a la vista, procedimiento que se repitió con los 10 individuos para posteriormente macerar y una vez culminado agregar al tubo de ensayo con 9ml de solución salina (2%), circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

6.6.3.4 Cuantificación de Hemocitos

La cuantificación de hemocitos que se realizó en una cámara de Neubauer o hemocitómetro, ya había requerido la preparación de la muestra en condiciones específicas, y esto agravó la necesidad de colocar la hemolinfa con citrato de sodio como anticoagulante en una relación 1:1, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad. La fórmula por utilizar para el cálculo es:

$$THC \left(\frac{Cel}{mL} \right) = \frac{Celulas\ contadas\ en\ los\ cuadros}{Volumen\ contado\ (mm^3)} * Factor\ de\ dilucion\ (2) * 10^3$$

6.6.3.5 Siembra de muestras

Las placas de CHROMagar Vibrio que serán incubadas a 32 °C durante 24-30 h al igual que las sembradas en TCBS, y esto agravó la necesidad de realizar siembras por duplicado, pues se cuantificaron en CHROMagar Vibrio las diluciones seriadas hasta 10^{-4} , que ya habían sido preparadas para el hepatopáncreas, mientras que la hemolinfa se sembró directamente sin realizar diluciones en el mismo medio, sembrando 100 µL con el método de extensión por superficie (Bacian et al., 2021).

6.6.3.6 Cuantificación de Placas Petri.

La fórmula que se presenta a continuación, y que ya había sido estructurada para el cálculo correspondiente, requiere previamente que se considere una placa representativa para el conteo toda aquella donde haya crecido más de 40 colonias y menos de 300, y esto agravó la necesidad de precisar este criterio antes de su uso, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Srimaryati et al., 2021). La fórmula es la siguiente:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{Numero\ de\ colonias * factor\ de\ dilución}{Volumen\ sembrado\ (mL) * Masa\ de\ tejido\ (g)}$$

7 RESULTADOS

7.1 Efecto de los tratamientos sobre la carga de *Vibrio spp.* en juveniles de *Penaeus vannamei*.

7.1.1 Carga bacteriana preinfección

La carga basal muy baja que presentó *V. parahaemolyticus* en la segunda corrida, circunstancia que contrastó con el comportamiento de la primera corrida, reflejó la variación que existe entre los animales de diferente origen, comprendiendo que la carga basal fue mayor para vibrios totales con 2.92×10^5 UFC/g, donde *V. alginolyticus*, siendo la concentrada con 2.74×10^5 UFC/g, fue seguida por *V. vulnificus* con 1.83×10^4 UFC/g, mientras que en la primera corrida la carga basal promedio en hepatopáncreas fue de 4.52×10^4 UFC/g para vibrios totales estimados a partir de las especies registradas en Chromagar, dentro del cual *V. alginolyticus* presentó un promedio de 2.03×10^4 UFC/g, *V. parahaemolyticus* de 1.24×10^4 UFC/g y *V. vulnificus* de 1.25×10^4 UFC/g, datos que fueron obtenidos en CHROMagar Vibrio, y esto agravó la necesidad de establecer una referencia inicial de la carga bacteriana antes del desafío experimental y previo a la interpretación del efecto de los tratamientos, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad (Tabla 4).

Los juveniles que ingresaron al ensayo con una microbiota bacteriana previa, principalmente por *V. alginolyticus* y otros vibrios presentes en hepatopáncreas, representaron una condición detectada en las cargas basales obtenidas antes del desafío experimental, mostrando la necesidad de comprender que estos datos proponen esta situación, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

Tabla 4

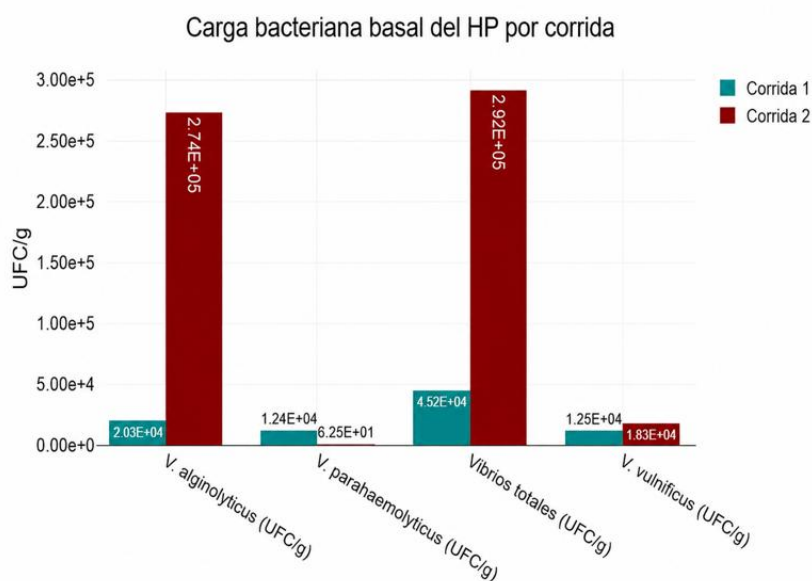
Promedio de carga bacteriana basal o preinfección

	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>V. alginolyticus</i>	1.47×10^5	1.79×10^5	2.03×10^4	2.74×10^5
<i>V. parahaemolyticus</i>	6.23×10^3	8.72×10^3	6.25×10^1	1.24×10^4
<i>V. vulnificus</i>	1.54×10^4	4.10×10^3	1.25×10^4	1.83×10^4
Vibrios totales	1.69×10^5	1.75×10^5	4.52×10^4	2.92×10^5

Nota. Valores expresados en UFC/g de muestra. Al tratarse de muestras basales agrupadas, no se realizó comparación estadística entre tratamientos.

Figura 6

Carga bacteriana preinfección o basal por corrida.



7.1.2 Carga bacteriana postinfección en hepatopáncreas

Las cargas bacterianas post-infección de las dos corridas fueron analizadas respetando la asignación del tratamiento por tanque en cada corrida. De esta manera, cada tratamiento quedó representado por seis observaciones para microbiología.

Posterior del desafío bacteriano, el grupo presentó las cargas más altas de vibrios totales, con $1.13 \times 10^6 \pm 6.01 \times 10^5$ UFC/g. Los demás tratamientos registraron las cargas más bajas, siendo T3 la de menor concentración con $3.25 \times 10^5 \pm 2.58 \times 10^5$ UFC/g, seguida por T2 con $3.89 \times 10^5 \pm 4.48 \times 10^5$ UFC/g, y T1 con $5.64 \times 10^5 \pm 5.08 \times 10^5$ UFC/g. De manera descriptiva, el tratamiento 3 fue el que presentó menor carga total post infección de vibrios en hepatopáncreas, ubicándose 71.21% debajo del control, seguido por T2 con 65.58% y T1 con 50.02%.

Tabla 5

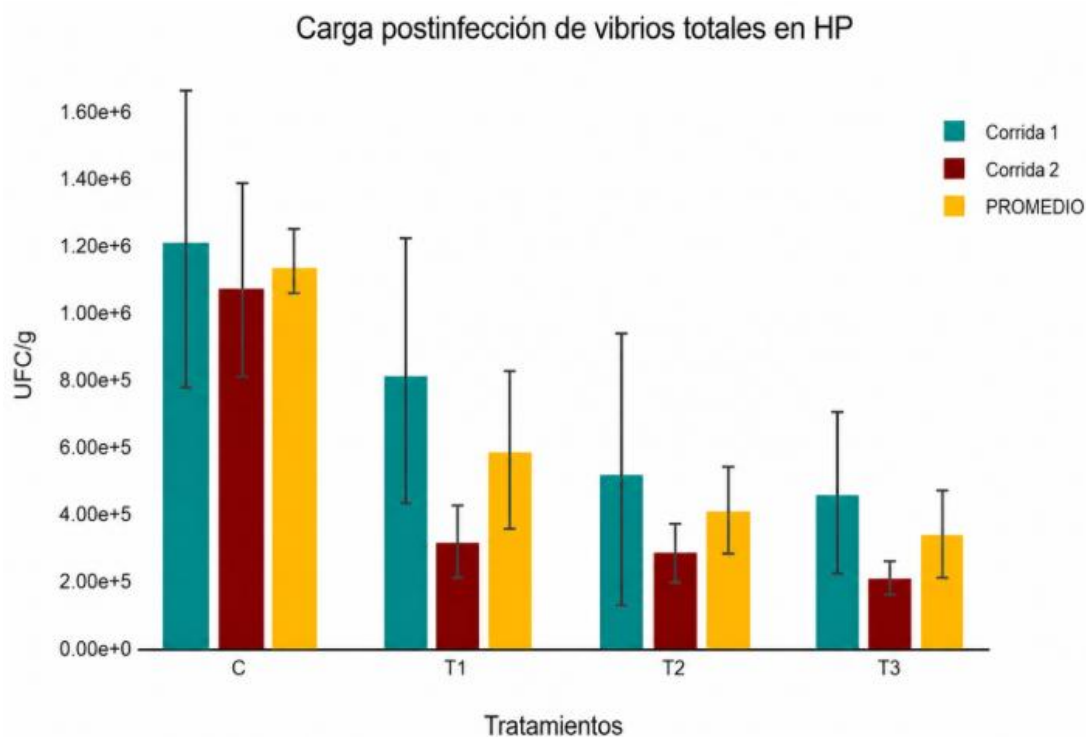
Carga post-infección de vibrios totales en hepatopáncreas por tratamiento y corrida.

Nivel	C	T1	T2	T3
Corrida 1	$1.21 \times 10^6 \pm 8.04 \times 10^5$	$8.13 \times 10^5 \pm 6.56 \times 10^5$	$4.99 \times 10^5 \pm 6.69 \times 10^5$	$4.46 \times 10^5 \pm 3.42 \times 10^5$
Corrida 2	$1.05 \times 10^6 \pm 4.85 \times 10^5$	$3.15 \times 10^5 \pm 1.70 \times 10^5$	$2.78 \times 10^5 \pm 1.33 \times 10^5$	$2.04 \times 10^5 \pm 7.02 \times 10^4$
Ensayo total	$1.13 \times 10^6 \pm 6.01 \times 10^5$	$5.64 \times 10^5 \pm 5.08 \times 10^5$	$3.88 \times 10^5 \pm 4.48 \times 10^5$	$3.25 \times 10^5 \pm 2.58 \times 10^5$

Nota. Los datos corresponden a media $\pm$ DE en UFC/g. HP = hepatopáncreas; n = 3 tanques por tratamiento en cada corrida; n = 6 para el ensayo total.

Figura 7

Carga bacteriana postinfección de vibrios totales en hepatopáncreas por tratamiento.



Para *V. parahaemolyticus* se pudo observar un patrón parecido, aunque con cargas menores que vibrios totales. Durante el ensayo completo, el grupo control presentó una carga de $8.85 \times 10^5 \pm 1.11 \times 10^5$ UFC/g. Los grupos tratados mostraron cargas inferiores: T1 llegó a $3.51 \times 10^4 \pm 3.47 \times 10^4$ UFC/g, T2 a $3.06 \times 10^4 \pm 2.62 \times 10^4$ UFC/g, y T3 alcanzó $1.77 \times 10^4 \pm 1.76 \times 10^4$ UFC/g. El tratamiento 3 mostro mayor disminución respecto al control para *V. parahaemolyticus*, con una carga menor que el control en un 80.04%.

Tabla 6

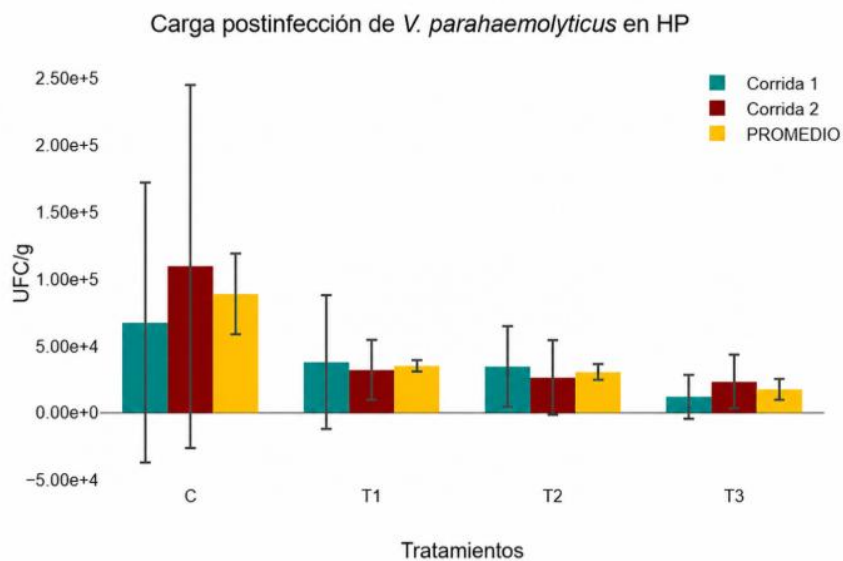
Carga postinfección de *V. parahaemolyticus* en hepatopáncreas por tratamiento y corrida.

	C	T1	T2	T3
Corrida 1	$6.75 \times 10^4 \pm 1.04 \times 10^5$	$3.80 \times 10^4 \pm 4.99 \times 10^4$	$3.47 \times 10^4 \pm 3.00 \times 10^4$	$1.22 \times 10^4 \pm 1.64 \times 10^4$
Corrida 2	$1.09 \times 10^5 \pm 1.36 \times 10^5$	$3.22 \times 10^4 \pm 2.23 \times 10^4$	$2.65 \times 10^4 \pm 2.77 \times 10^4$	$2.32 \times 10^4 \pm 2.03 \times 10^4$
Ensayo total	$8.85 \times 10^4 \pm 1.11 \times 10^5$	$3.51 \times 10^4 \pm 3.47 \times 10^4$	$3.06 \times 10^4 \pm 2.62 \times 10^4$	$1.77 \times 10^4 \pm 1.76 \times 10^4$

Nota. Estos valores representan la media $\pm$ DE en UFC/g. Para hacer la parte estadística se aplicó $\log_{10}(x+1)$, pero esta tabla presenta los datos en la carga bacteriana real.

Figura 8

Carga de *V. parahaemolyticus* postinfección promedio.



Para *V. alginolyticus* se pudo observar un patrón muy parecido de vibrios totales. Durante el ensayo completo, el grupo control presentó una carga de $1.04 \times 10^6 \pm 1.11 \times 10^5$ UFC/g. Los grupos tratados mostraron cargas inferiores: T1 llegó a $5.09 \times 10^5 \pm 5.17 \times 10^5$ UFC/g, T2 a $3.43 \times 10^5 \pm 4.28 \times 10^5$ UFC/g, y T3 alcanzó $3.02 \times 10^5 \pm 2.72 \times 10^5$ UFC/g.

Tabla 7

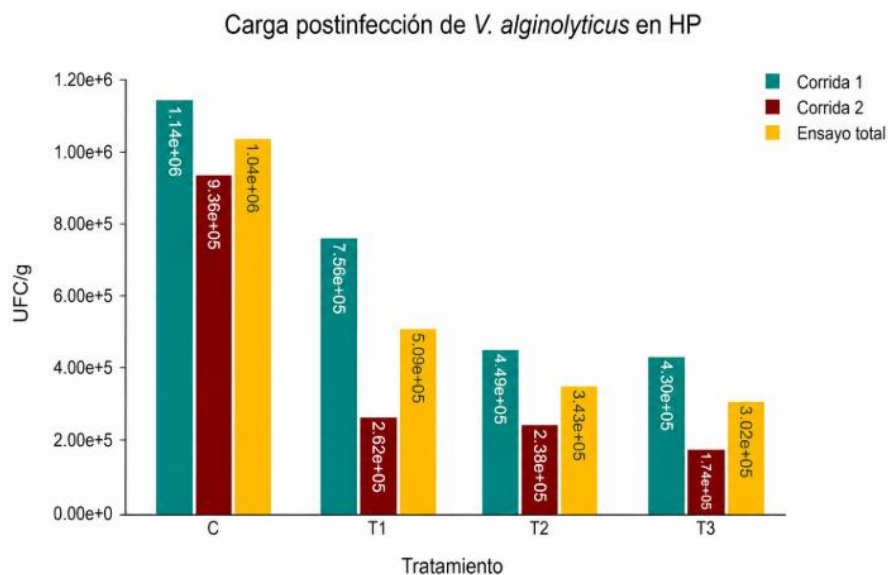
Carga postinfección de *V. alginolyticus* en hepatopáncreas por tratamiento y corrida.

	C	T1	T2	T3
Corrida 1	$1.14 \times 10^6 \pm 7.60 \times 10^5$	$7.56 \times 10^5 \pm 6.76 \times 10^5$	$4.49 \times 10^5 \pm 6.40 \times 10^5$	$4.30 \times 10^5 \pm 3.65 \times 10^5$
Corrida 2	$9.36 \times 10^5 \pm 3.55 \times 10^5$	$2.62 \times 10^5 \pm 1.66 \times 10^5$	$2.38 \times 10^5 \pm 1.17 \times 10^5$	$1.74 \times 10^5 \pm 5.23 \times 10^4$
Ensayo total	$1.04 \times 10^6 \pm 5.42 \times 10^5$	$5.09 \times 10^5 \pm 5.17 \times 10^5$	$3.43 \times 10^5 \pm 4.28 \times 10^5$	$3.02 \times 10^5 \pm 2.72 \times 10^5$

Nota. T3 presentó la menor carga de *V. alginolyticus*, quien a su vez representa un porcentaje alto de los vibrios totales.

Figura 9

Carga postinfección de *V. alginolyticus* en hepatopáncreas por tratamiento y por corrida.



Los resultados de la siembra de hepatopáncreas en TCBS se analizaron separadamente por corrida ya que la primera conservó conteos muy bajos, por debajo del rango cuantificable, mientras que la segunda corrida presentó un carga de 1.42×10^5 UFC/g en C, 5.08×10^4 en T1, 8.53×10^4 en T2 y 5.78×10^4 en T3. Lo cual no mostró la misma tendencia que en hepatopáncreas.

Tabla 8

Cuantificación del hepatopáncreas en agar TCBS.

Corrida	Tratamiento	Verdes	Amarillas	Total	Unidad
1	C	5.83×10^1	9.33×10^1	1.52×10^2	UFC/g
1	T1	2.00×10^2	1.17×10^2	3.17×10^2	UFC/g
1	T2	9.33×10^1	1.50×10^1	1.08×10^2	UFC/g
1	T3	3.13×10^2	1.23×10^2	4.37×10^2	UFC/g
2	C	7.10×10^4	7.05×10^4	1.42×10^5	UFC/g
2	T1	2.80×10^4	2.28×10^4	5.08×10^4	UFC/g
2	T2	2.40×10^4	6.13×10^4	8.53×10^4	UFC/g
2	T3	3.47×10^4	2.32×10^4	5.78×10^4	UFC/g

Nota. Los resultados no fueron uniformes entre corridas; los resultados se muestran por separado.

Al combinar las dos corridas, los porcentajes de reducción de carga de vibrios totales respecto a los datos del grupo control (reducción relativa) también favorecieron a los tratamientos, especialmente T3, la cual tuvo una reducción del 71.21%. Los tratamientos 1 y 2 presentaron una reducción del 50.02% y 65.58% respectivamente. Respecto a *Vibrio parahaemolyticus*, utilizada en el desafío bacteriano, tuvo una reducción del 80.04% en T3, seguida por T1 y T2 con 60.36% y 65.44% respectivamente. En el caso de *Vibrio alginolyticus* presentó una reducción del 50.9% en T1, 66.94% en T2 y 70.93% en T3. Para determinar si estas diferencias descriptivas estaban respaldadas estadísticamente, se compararon las cargas bacterianas postinfección de los cuatro grupos, utilizando el tanque como unidad experimental y

los datos transformados mediante $\log_{10}(\text{UFC/g} + 1)$. El ANOVA de una vía no mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para vibrios totales, $F(3, 20) = 2,872$; $p = 0,062$, ni para *V. alginolyticus*, $F(3, 20) = 2,423$; $p = 0,096$. Para *V. parahaemolyticus*, al no cumplirse el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis, que tampoco mostró diferencias significativas, $H(3) = 1,629$; $p = 0,653$. Por tanto, aunque T3 presentó las mayores reducciones porcentuales respecto al control, las diferencias en las cargas postinfección no fueron estadísticamente significativas y no se rechazó la hipótesis nula.

Tabla 9

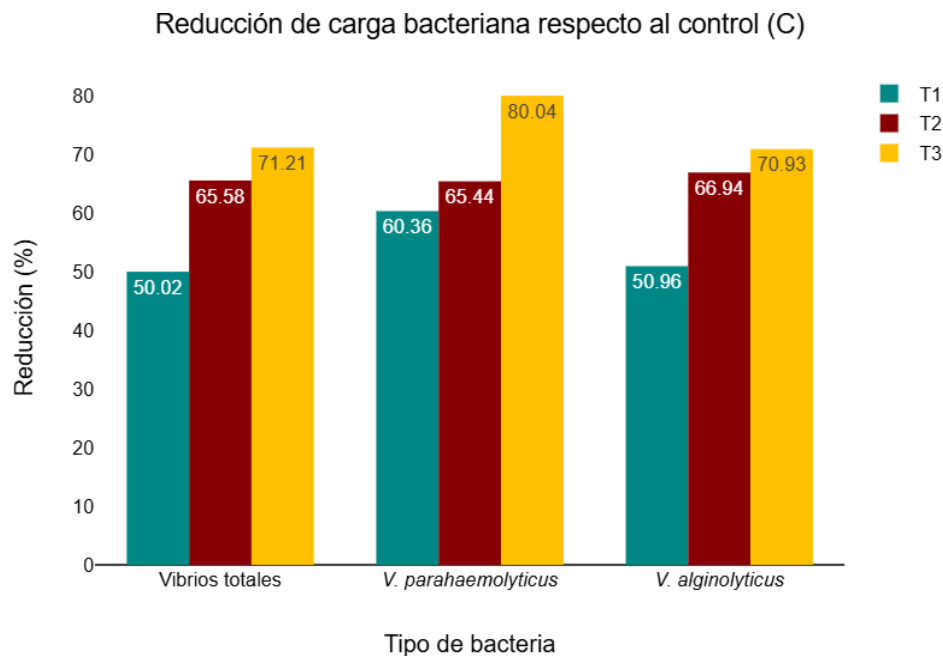
Reducción porcentual de la carga bacteriana en hepatopáncreas respecto al grupo control.

		T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)
Vibrios totales	Corrida 1	32.88	58.79	63.18
Vibrios totales	Corrida 2	69.86	73.45	80.50
Vibrios totales	Ensayo total	50.02	65.58	71.21
<i>V. parahaemolyticus</i>	Corrida 1	43.70	48.64	81.98
<i>V. parahaemolyticus</i>	Corrida 2	70.62	75.80	78.84
<i>V. parahaemolyticus</i>	Ensayo total	60.36	65.44	80.04
<i>V. alginolyticus</i>	Corrida 1	33.68	60.63	62.30
<i>V. alginolyticus</i>	Corrida 2	71.98	74.64	81.43
<i>V. alginolyticus</i>	Ensayo total	50.96	66.94	70.93

Nota. Los valores se expresan en porcentaje de reducción respecto al grupo control. La reducción se calculó con las medias aritméticas: $(\text{media C} - \text{media del tratamiento}) / \text{media del control} * 100$.

Figura 10

Reducción postinfección de vibrios totales, V. parahaemolyticus y V. alginolyticus respecto al grupo control.



Al comparar las cargas postinfección con la carga basal específica de cada corrida, se observó un incremento promedio de vibrios totales en todos los grupos. Calculado por tanque, el aumento medio fue de 1419.87% en C, 853.81% en T1, 500.05% en T2 y 428.56% en T3. Por lo tanto, aunque ningún tratamiento produjo una reducción global respecto a la condición basal, T2 y especialmente T3 limitaron la magnitud del incremento bacteriano frente al control.

En el hepatopáncreas, T3 presentó las menores cargas medias tanto de vibrios totales como de *V. parahaemolyticus*, con 3.25×10^5 y 1.77×10^4 UFC/g, respectivamente. En hemolinfa, la respuesta no siguió el mismo orden: T3 registro la mayor media de vibrios totales, mientras que T2 y T3 presentaron cargas muy bajas de *V. parahaemolyticus*.

Tabla 10

Comparación de la carga bacteriana preinfección o basal, y la carga postinfección.

Ámbito	Trat.	Basal (UFC/g)	Post (UFC/g)	Red. basal (%)	vs	Aum. basal (%)	vs	Factor
1	C	4.52×10^4	1.21×10^6	-2579.94		2579.94		26.80×
1	T1	4.52×10^4	8.13×10^5	-1698.67		1698.67		17.99×
1	T2	4.52×10^4	4.99×10^5	-1004.35		1004.35		11.04×
1	T3	4.52×10^4	4.46×10^5	-886.73		886.73		9.87×
2	C	2.92×10^5	1.05×10^6	-258.33		258.33		3.58×
2	T1	2.92×10^5	3.15×10^5	-7.99		7.99		1.08×
2	T2	2.92×10^5	2.78×10^5	4.85		-4.85		0.95×
2	T3	2.92×10^5	2.04×10^5	30.14		-30.14		0.70×
Total	C	1.69×10^5	1.13×10^6	-1419.14		1419.14		15.20×
Total	T1	1.69×10^5	5.64×10^5	-853.81		853.81		9.54×
Total	T2	1.69×10^5	3.88×10^5	-500.05		500.05		6.00×
Total	T3	1.69×10^5	3.25×10^5	-428.56		428.56		5.29×

Nota. Se logra observar el factor de incremento, y como este es 3 veces menor en el tratamiento 3 en comparación con el grupo control.

7.1.3 Carga bacteriana postinfección en hemolinfa

La carga bacteriana de hemolinfa presentó diferencias marcadas entre corrida, donde los vibrios totales fueron 10.67 ± 11.24 UFC/mL en C, 5.00 ± 6.08 UFC/mL en T1, 72.33 ± 48.21 UFC/mL en T2 y 163.00 ± 278.86 UFC/mL en T3. En la segunda corrida se registraron 2.76×10^3 , 4.31×10^3 , 2.48×10^3 y 6.42×10^3 UFC/mL, respectivamente.

Para *V. parahaemolyticus*, las medias de la primera corrida fueron 2.33 UFC/mL en C, 0.33 en T1, 6.67 en T2 y 2.00 en T3. En la segunda corrida, el control alcanzó 4.45×10^2 UFC/mL, mientras que T1, T2 y T3 presentaron 70.00, 6.67 y 11.67 UFC/mL.

Tabla 11

Carga bacteriana postinfección en hemolinfa

Corrida	Tratamiento	Vibrios totales, media $\pm$ DE	<i>V. parahaemolyticus</i> , media $\pm$ DE
1	C	$1.07 \times 10^1 \pm 1.12 \times 10^1$	$2.33 \times 10^0 \pm 2.52 \times 10^0$
1	T1	$5.00 \times 10^0 \pm 6.08 \times 10^0$	$3.33 \times 10^{-1} \pm 5.77 \times 10^{-1}$
1	T2	$7.23 \times 10^1 \pm 4.82 \times 10^1$	$6.67 \times 10^0 \pm 7.23 \times 10^0$
1	T3	$1.63 \times 10^2 \pm 2.79 \times 10^2$	$2.00 \times 10^0 \pm 3.46 \times 10^0$
2	C	$2.75 \times 10^3 \pm 2.05 \times 10^3$	$4.45 \times 10^2 \pm 6.20 \times 10^2$
2	T1	$4.31 \times 10^3 \pm 2.54 \times 10^3$	$7.00 \times 10^1 \pm 2.29 \times 10^1$
2	T2	$2.48 \times 10^3 \pm 1.33 \times 10^3$	$6.67 \times 10^0 \pm 7.64 \times 10^0$
2	T3	$6.42 \times 10^3 \pm 2.43 \times 10^3$	$1.17 \times 10^1 \pm 1.04 \times 10^1$

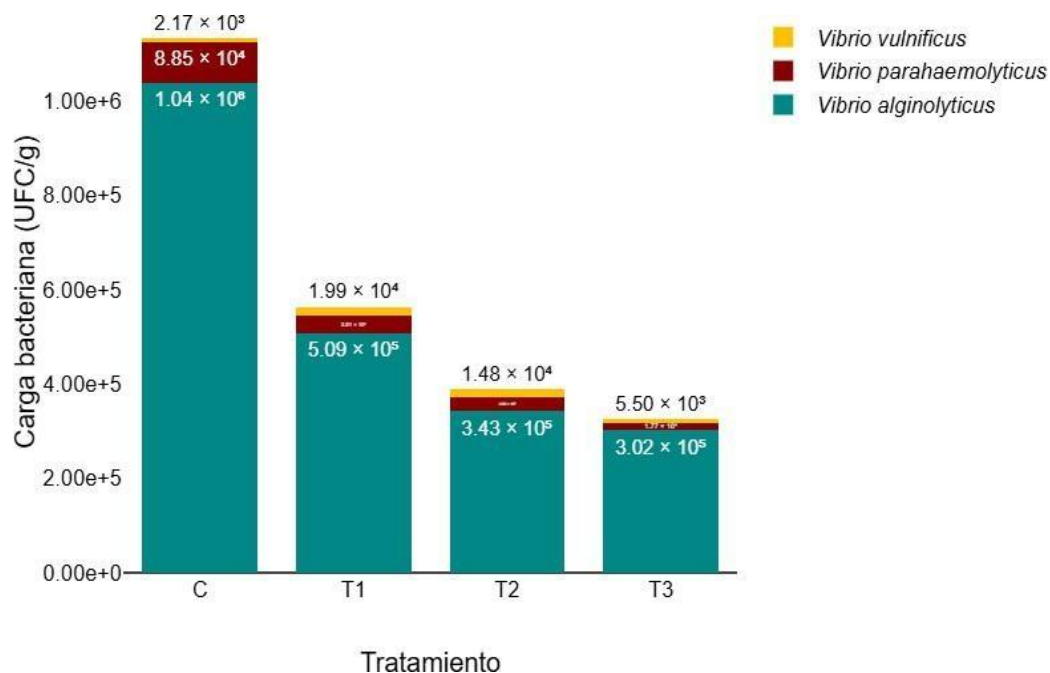
Nota. Carga bacteriana media postinfección en hemolinfa expresada en UFC/mL.

7.1.4 Composición bacteriana postinfección

La composición bacteriana post-infección mostró una predominancia de *V. alginolyticus* dentro del total de carga bacteriana en hepatopáncreas. En el grupo control, *V. alginolyticus* alcanzó una carga de $1.04 \times 10^6 \pm 5.42 \times 10^5$ UFC/g, mientras que *V. parahaemolyticus* representó $8.85 \times 10^4 \pm 1.11 \times 10^5$ UFC/g. En T3, la carga de *V. alginolyticus* disminuyó a $3.02 \times 10^5 \pm 2.12 \times 10^5$ UFC/g, y *V. parahaemolyticus* a $1.77 \times 10^4 \pm 1.76 \times 10^4$ UFC/g. Este resultado propone que la mayor parte de los vibrios totales está asociada a *V. alginolyticus* y no exclusivamente *V. parahaemolyticus*.

Figura 11

Composición bacteriana postinfección en hepatopáncreas por tratamiento.



7.1.5 Comparación estadística de la carga bacteriana entre tratamientos.

Al comparar descriptivamente las cargas postinfección con el grupo control, los tres tratamientos mostraron una disminución de vibrios totales, *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. T3 presentó las mayores reducciones durante el ensayo total, con 71.21 % para vibrios totales, 80.04 % para *V. parahaemolyticus* y 70.93 % para *V. alginolyticus*. En T2, las reducciones fueron de 65.58 %, 65.44 % y 66.94 %, respectivamente, mientras que T1 alcanzó 50.02 %, 60.36 % y 50.96 %. Estos porcentajes se interpretaron únicamente de manera descriptiva, debido a que fueron calculados a partir de las medias de cada grupo y, por tanto, no constituyeron observaciones independientes para efectuar una prueba de hipótesis.

Para evaluar estadísticamente como cambian los vibrios totales respecto a la carga basal, se calculó el porcentaje de reducción de cada tanque. La prueba de Shapiro-Wilk indicó ausencia de normalidad en C ($W = 0.716$, $p = .009$), T1 ($W = 0.754$, $p = .022$), T2 ($W = 0.579$, $p < .001$) y T3 ($W = 0.673$, $p = .003$), mientras que Levene mostró homogeneidad de varianzas, $F(3, 20) = 2.825$, $p = .065$. Debido al incumplimiento de normalidad, se aplicó Kruskal-Wallis, sin encontrarse diferencias significativas entre los cuatro grupos, $H(3) = 5.113$, $p = .164$; por consiguiente, no se rechazó la hipótesis nula. Aunque T3 presentó el menor incremento promedio respecto a la basal, seguido de T2, T1 y el control, esta tendencia no fue estadísticamente concluyente. Los cálculos se realizaron a partir de los valores basales y postinfección registrados por tanque.

7.2 Efecto de los bacteriófagos y el aceite esencial y orégano sobre la respuesta inmunitaria y la carga bacteriana.

7.2.1 Conteo total de hemocitos.

El THC medio fue $4.41 \pm 0.95 \times 10^6$ cell/mL en el control, $8.28 \pm 3.95 \times 10^6$ en T1, $8.65 \pm 3.24 \times 10^6$ en T2 y $8.34 \pm 2.71 \times 10^6$ cell/mL en T3. Los cuatro grupos experimentales para THC cumplieron normalidad y Levene no rechazó la homogeneidad, $p = 0.135$. El ANOVA mostro un valor $p = 0.064$, por lo tanto, el aumento descriptivo del THC no fue estadísticamente significativo, sin embargo, se considera una tendencia biológica con posible relación con la carga bacteriana.

Tabla 12

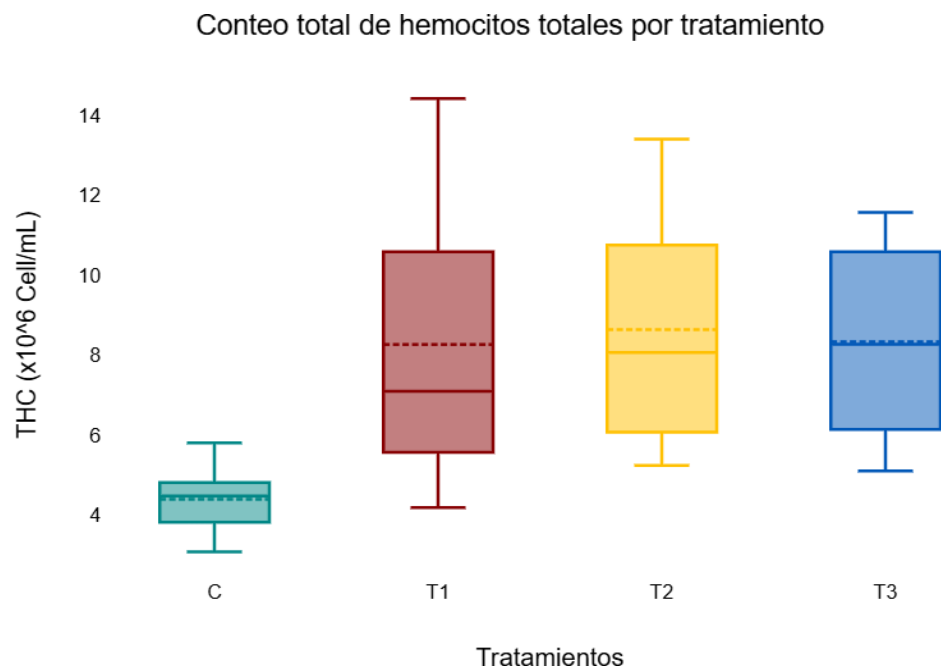
Conteo total de hemocitos por tratamiento

Tratamiento	n	Media $\pm$ DE ($\times 10^6$ células/mL)	Mediana	Rango
C	6	4.41 ± 0.95	4.49	3.10–5.81
T1	6	8.28 ± 3.95	7.10	4.20–14.43
T2	6	8.65 ± 3.24	8.07	5.25–13.41
T3	6	8.34 ± 2.71	8.28	5.12–11.58

Nota. Promedio total del bioensayo para THC.

Figura 12

Conteo total de hemocitos por tratamiento.



7.2.2 Evaluación del efecto combinado sobre el conteo de hemocitos.

Para el conteo total de hemocitos, la interacción fue estadísticamente significativa en términos nominales, $\beta = -4.175$, $F(1,19) = 4.790$, $p = 0.041$. A pesar de esto el coeficiente presentó una dirección negativa. EL valor esperado para T3 bajo una respuesta aditiva fue de 12.53×10^6 cell/mL, mientras que la media fue de 8.34×10^6 cell/mL. Al combinar los tratamientos se evidenció un incremento en el conteo de hemocitos totales, inferior al esperado a partir de los efectos individuales, lo que significa que hubo una interacción subaditiva y no una respuesta sinérgica.

7.2.3 Evaluación del efecto combinado sobre la carga bacteriana.

Los valores estadísticos que ya habían sido calculados para los vibrios totales, $\beta = 0.374$, $F(1,19) = 1.200$, $p = 0.287$, y para *V. parahaemolyticus*, $\beta = 0.374$, $F(1,19) = 0.203$, $p = 0.657$, confirmaron que la interacción no fue significativa ni en el hepatopáncreas ni en la hemolinfa, donde tampoco se detectó una interacción significativa para los vibrios totales $\beta = 0.039$, $F(1,19) = 0.006$, $p = 0.937$, ni para *V. parahaemolyticus*, $\beta = 0.244$, $F(1,19) = 0.212$, $p = 0.650$, indicando que la combinación causó una carga menor que la esperada a partir de la suma de los tratamientos individuales en la escala logarítmica, pues a pesar de que T3 alcanzó las mayores reducciones descriptivas frente al control, estos resultados no demostraron una interacción sinérgica, circunstancia que ya había sido observada en T3 al presentar menores cargas de vibrios totales y de *Vibrio parahaemolyticus* en el hepatopáncreas.

La respuesta de T3 que fue menor que la esperada a partir de la suma de los efectos individuales, y que ya había sido clasificada como de dirección negativa o subaditiva, se detectó en el conteo total de hemocitos mediante una interacción significativa, y esto agravó la necesidad de comprender que no se demostró una reducción adicional atribuible específicamente a una interacción sinérgica, pues los términos de interacción bacteriófago x aceite esencial fueron no significativos para las cargas bacterianas, circunstancia que ya había sido observada aunque T3 presentó las mayores reducciones descriptivas respecto al control.

7.2.4 Relación entre el conteo total de hemocitos y la carga bacteriana.

El conteo total de hemocitos presentó asociaciones negativas con las cargas de vibrios totales ($\rho = -0,368$; $p = 0,077$), *V. parahaemolyticus* ($\rho = -0,251$; $p = 0,237$) y *V. alginolyticus* ($\rho = -0,377$; $p = 0,070$), siendo los vibrios totales y *V. alginolyticus* quienes presentan valores cercanos a la significancia.

Tabla 13

Correlaciones entre el conteo total de hemocitos y las cargas bacterianas.

Variable	n	ρ	p	Conclusión
HP vibrios totales	24	-0.368	0.077	No significativa
HP <i>V. parahaemolyticus</i>	24	-0.251	0.237	No significativa
HP <i>V. alginolyticus</i>	24	-0.377	0.070	No significativa
Hemolinfa vibrios totales	24	-0.366	0.078	No significativa
Hemolinfa <i>V. parahaemolyticus</i>	24	-0.368	0.076	No significativa

Nota. P = coeficiente de correlación de Spearman. Las cargas bacterianas se analizaron como $\log_{10}(x+1)$.

Figura 13

Relación entre el conteo total de hemocitos y la carga de vibrios totales en hepatopáncreas.

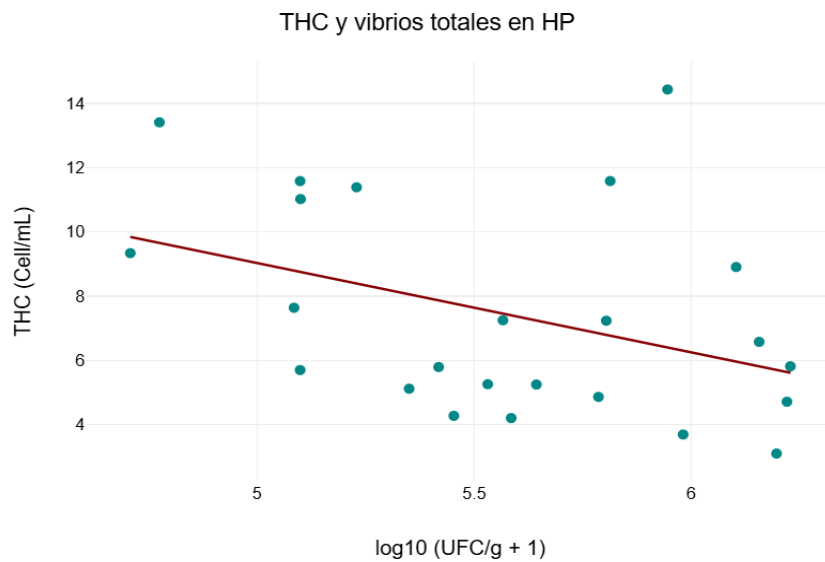
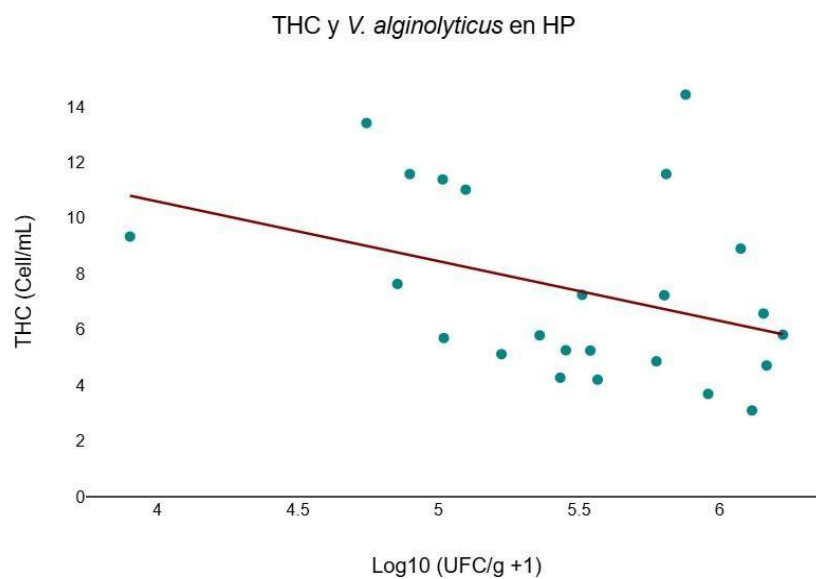


Figura 14

*Relación entre el conteo total de hemocitos y la carga de *V. alginolyticus* en hepatopáncreas.*



7.3 Supervivencia y estado de salud de los juveniles de *P. vannamei*

7.3.1 Supervivencia final por tratamiento.

La supervivencia fue $80.93 \pm 5.46\%$ en C, $89.07 \pm 3.88\%$ en T1, $91.67 \pm 5.25\%$ en T2 y $95.00 \pm 4.32\%$ en T3 (Figura 15). Los cuatro grupos cumplieron supuesto de normalidad y presentaron homogeneidad de varianzas ($p = 0.528$); por ello se aplicó ANOVA de una vía, que mostró diferencias significativas entre tratamientos, $F(3,20) = 9.509$; $p < 0.001$.

La prueba post hoc de Tukey confirmó una supervivencia significativamente mayor en T1 ($p = 0.036$), T2 ($p = 0.005$) y T3 ($p < 0.001$) respecto al control.

Tabla 14

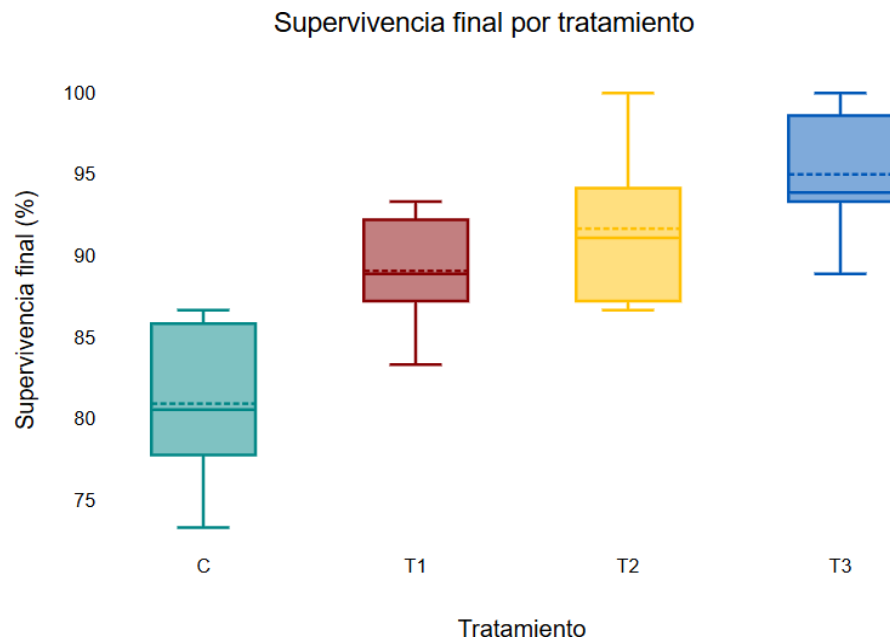
Supervivencia final por tratamiento

Tratamiento	n	Media $\pm$ DE (%)
C	6	80.93 ± 5.46
T1	6	89.07 ± 3.88
T2	6	91.67 ± 5.25
T3	6	95.00 ± 4.32

Nota. Se observa la supervivencia final promedio con su desviación estándar.

Figura 15

Supervivencia final por tratamiento.



7.3.2 Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier

Las 11 mortalidades que habían dejado apenas 43 organismos supervivientes de un total de 54 individuos, correspondientes al 79,63% de supervivencia acumulada, representaban el valor más bajo alcanzado por el grupo control al finalizar la primera corrida durante los 19 días de seguimiento, y esto agravó la necesidad de reconocer que la curva de Kaplan-Meier mostraba diferencias en el comportamiento de los cuatro grupos, pues T1 alcanzaba una supervivencia final de 87.04% con siete mortalidades, mientras que T2 y T3 presentaban valores más altos, ambos con 94.44% de supervivencia y tres mortalidades por grupo.

Las mayores probabilidades de supervivencia que se conservaban al finalizar el seguimiento, y que ya habían sido preservadas por T2 y T3, se vinculaban con el comportamiento estable que mantuvo T2 durante los primeros diez días y los descensos aislados que presentaba T3, y esto agravó la necesidad de contrastar estos resultados con la curva del control, la cual comenzaba a descender desde el día 6 y presentaba reducciones sucesivas hasta el día 15 evidenciando una mayor frecuencia de mortalidades durante el periodo experimental, mientras que en T1 se había identificado una serie de descensos tempranos durante los primeros días y nuevas mortalidades en los días 6, 11 y 12.

El rechazo de la hipótesis nula de igualdad entre las curvas de supervivencia, que ya había sido determinado por la comparación global mediante la prueba de rangos logarítmicos, se fundamentaba en la existencia de diferencias significativas estadísticamente entre las distribuciones de supervivencia de los tratamientos, $X^2(3) = 8.22$; $p = 0.042$, y esto agravó la necesidad de reconocer que la separación había estado asociada principalmente con la menor supervivencia del control frente a las mayores probabilidades observadas en T2 y T3, mientras que la mediana de supervivencia no fue alcanzada en ninguno de los grupos debido a que más del 50% de los juveniles permanecieron vivos hasta el final del ensayo.

Tabla 15

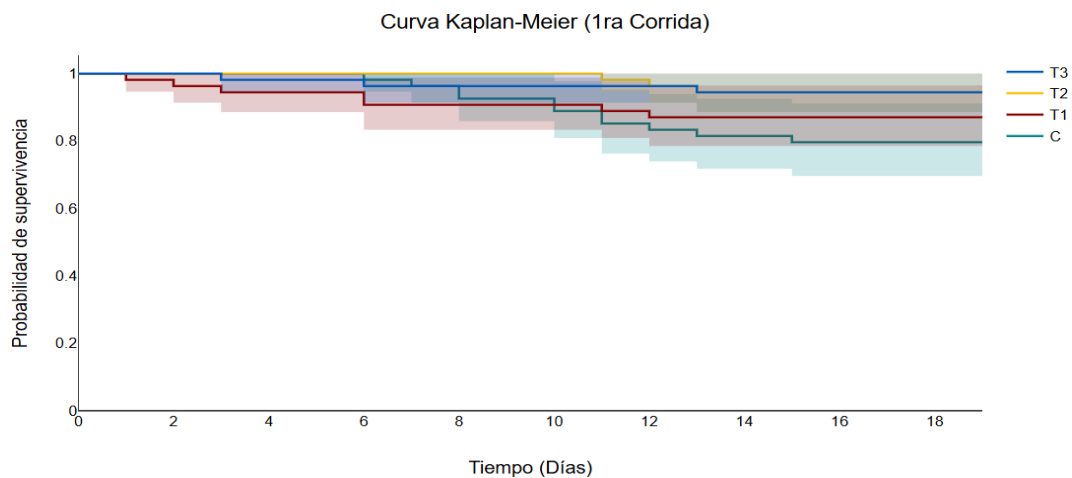
Resultados de la prueba de rangos logarítmicos (Log Rank) para cada corrida.

	Corrida	χ^2	df	P
Log-Rank	1	8.22	3	0.042*
	2	4.37	3	0.225

Nota. χ^2 = estadístico de Chi-cuadrado; df = grados de libertad; p = nivel de significancia de la prueba de rangos logarítmicos (Log-rank). Se consideró diferencia estadísticamente cuando $p < 0.05$. El asterisco (*) indica significancia estadística.

Figura 16

Curva de supervivencia Kaplan-Meier de juveniles de *P. vannamei* durante la primera corrida



Las ocho mortalidades registradas de 45 organismos que alcanzaron una supervivencia acumulada final de 82.22% en el control representaron el valor más bajo entre los grupos evaluados, y esto agravó la necesidad de reconocer que en la segunda corrida las curvas de Kaplan-Meier presentaron una tendencia descriptiva de mayor

supervivencia en los grupos respecto al control, pues T1 presentó cuatro mortalidades y una supervivencia final de 91.11%, mientras que T2 registró cinco mortalidades y una supervivencia de 88.89%, y el mayor valor correspondió a T3 con dos mortalidades y 95.56% de supervivencia.

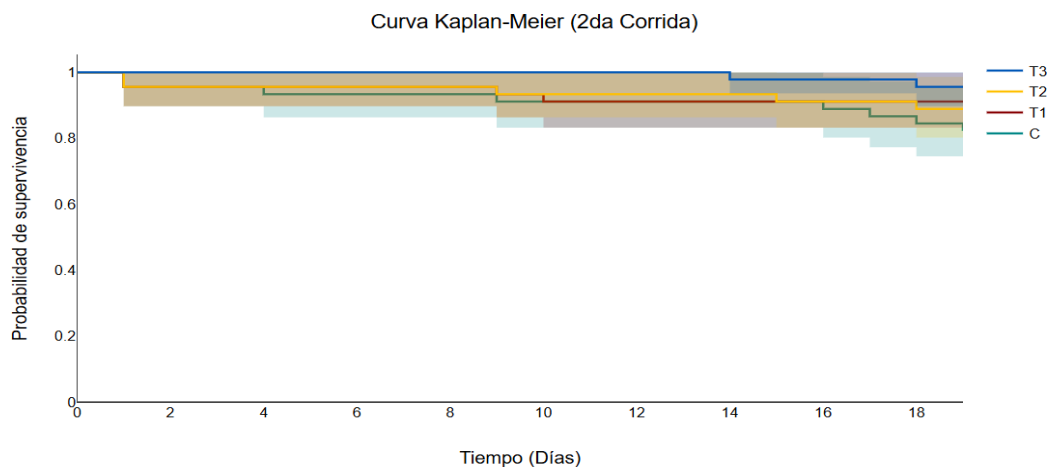
Los descensos que se mantuvieron aislados durante el seguimiento, y que ya habían sido observados en T3 hasta el día 14 donde conservó una supervivencia de 100%, configuraron a este grupo como el de mayor supervivencia acumulada al finalizar la corrida, y esto agravó la necesidad de contrastar este comportamiento con el del control, el cual descendió desde el primer día y continuó registrando mortalidades durante diferentes momentos del ensayo especialmente hacia los días finales, mientras que T1 y T2 también mostraron unas reducciones iniciales pero posteriormente mantuvieron probabilidades de supervivencia superiores a las del control, circunstancia que sigue siendo relevante.

La mediana de supervivencia que ningún grupo alcanzó, al igual que en la primera corrida, se vinculó con la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia cuando se realizó la prueba de rangos logarítmicos, $X^2(3) = 4.37$; $p = 0.225$, y esto agravó la necesidad de no rechazar la hipótesis nula de igualdad de las distribuciones de supervivencia, pues los resultados indican que a pesar de que T3, T1 y T2 presentaron porcentajes de supervivencia

descriptivamente superiores al grupo control, la magnitud y distribución temporal de las mortalidades no fueron suficientes para demostrar un efecto estadísticamente significativo durante esta corrida, circunstancia que sigue siendo relevante.

Figura 17

Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de juveniles de *Penaeus vannamei* de la segunda corrida.



7.3.3 Estado de salud de los juveniles.

El IHP, el índice hepatopancreático normalizado, el índice branquial normalizado, el índice global y la prevalencia promedio de signos clínicos no mostraron diferencias entre tratamientos ($p = 0,222$; $0,693$; $0,877$; $0,932$ y $0,826$, respectivamente). En los signos hepatopancreáticos analizados individualmente tampoco se detectaron diferencias significativas; sin embargo, la deformación tubular mostró una tendencia entre los tratamientos, $H(3) = 6,909$; $p = 0,075$.

Descriptivamente, el control presento mayor prevalencia de deformación tubular (100%), desprendimiento celular (70%) y melanización (30%) que T3 (76,67 %, 40,00% y 3,33 %).

Tabla 16

Indicadores descriptivos del estado de salud por tratamiento.

Indicador	C	T1	T2	T3
Índice hepatosomático, HSI/IHP (%)	3,78 ± 0,35	4,12 ± 0,13	3,94 ± 0,27	4,02 ± 0,30
Índice de severidad hepatopancreática normalizado (%)	31,21 ± 13,11	28,03 ± 5,31	24,09 ± 17,82	24,70 ± 3,79
Índice branquial normalizado (%)	20,89 ± 8,54	20,22 ± 9,52	21,11 ± 10,10	24,22 ± 8,41
Índice global de salud normalizado (%)	30,50 ± 14,05	28,41 ± 5,94	26,16 ± 15,21	28,41 ± 5,18
Prevalencia promedio de signos clínicos (%)	52,39 ± 14,49	51,10 ± 6,19	45,72 ± 19,49	50,19 ± 6,83
Prevalencia de deformación tubular (%)	100,00 ± 0,00	90,00 ± 16,73	56,67 ± 40,82	76,67 ± 26,58
Prevalencia de desprendimiento celular (%)	70,00 ± 41,47	63,33 ± 29,44	46,67 ± 46,76	40,00 ± 47,33
Prevalencia de melanización (%)	30,00 ± 27,57	10,00 ± 10,95	20,00 ± 40,00	3,33 ± 8,16

Nota. Los valores se presentan como media ± desviación estándar. Para la prevalencia de signos hepatopancreáticos se aplicó Kruskal-Wallis; ninguna comparación alcanzo $p < 0.05$, aunque la deformación tubular mostró una tendencia ($p = 0.075$).

Figura 18

Indicadores de salud por tratamiento.

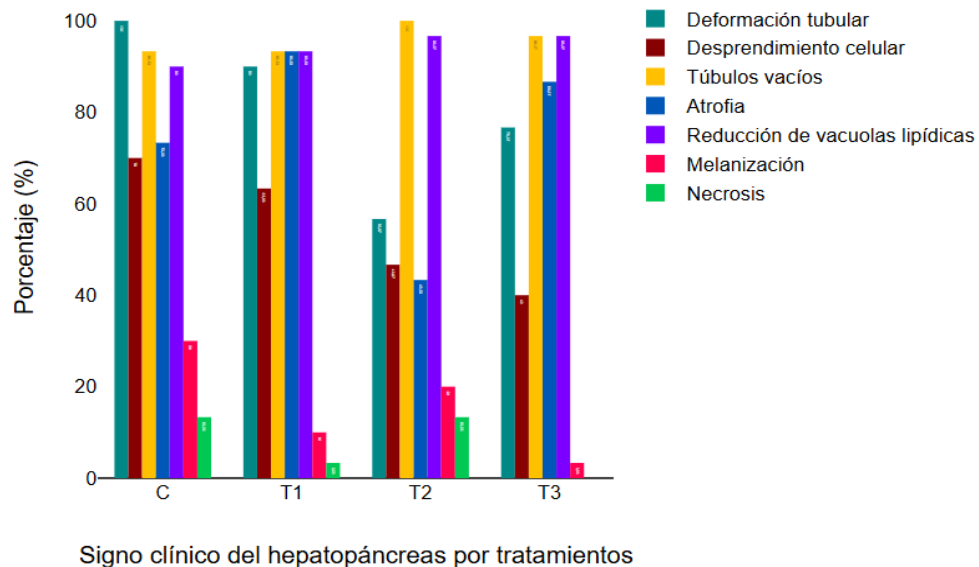


Tabla 17*Correlaciones generales entre supervivencia y prevalencia de signos del hepatopáncreas.*

Signo clínico	n	ρ	p	Conclusión
Deformación tubular	24	-0,631	0,001	Significativa
Desprendimiento celular	24	-0,431	0,036	Significativa
Túbulos vacíos	24	0,030	0,891	No significativa
Atrofia	24	-0,299	0,156	No significativa
Reducción de vacuolas lipídicas	24	0,167	0,434	No significativa
Melanización	24	-0,557	0,005	Significativa
Necrosis	24	-0,236	0,267	No significativa

Nota. P = coeficiente de correlación de Spearman.**7.3.4 Relación entre la supervivencia y los signos clínicos del hepatopáncreas.**

Al analizar los signos clínicos hepatopancreáticos individualmente, la deformación tubular ($\rho = -0,631$; $p = 0,001$), el desprendimiento celular ($\rho = -0,431$; $p = 0,036$) y la melanización ($\rho = -0,557$; $p = 0,005$) se correlacionaron negativamente con la supervivencia. Por lo tanto, los tanques con mayor prevalencia de estas alteraciones tendieron a presentar una menor proporción de organismos supervivientes.

Figura 19

Relación entre la supervivencia final y prevalencia de desprendimiento celular en HP.

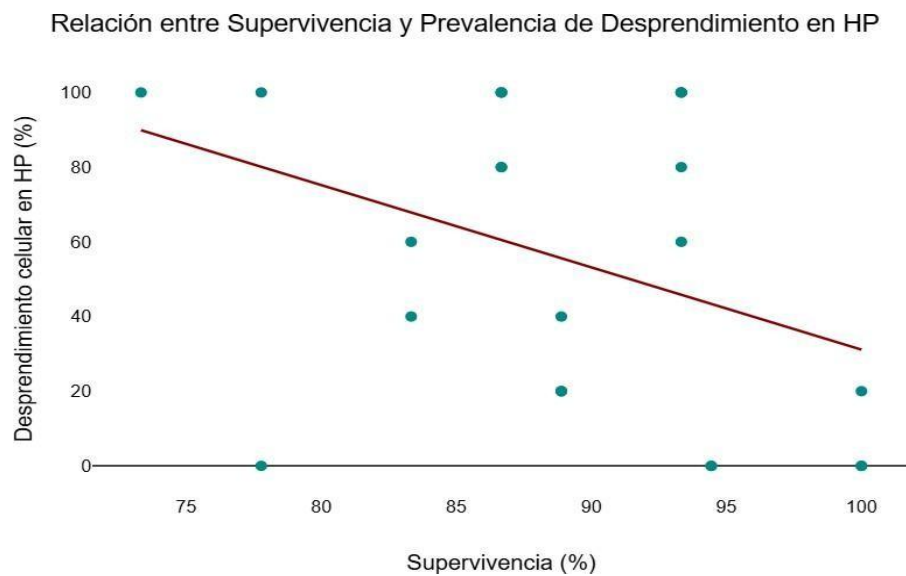


Figura 20

Relación entre la supervivencia final y prevalencia de deformación tubular en HP.

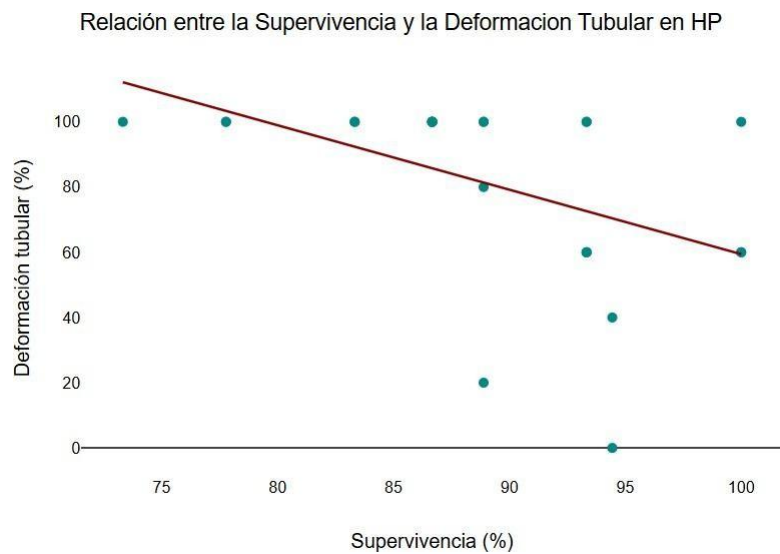
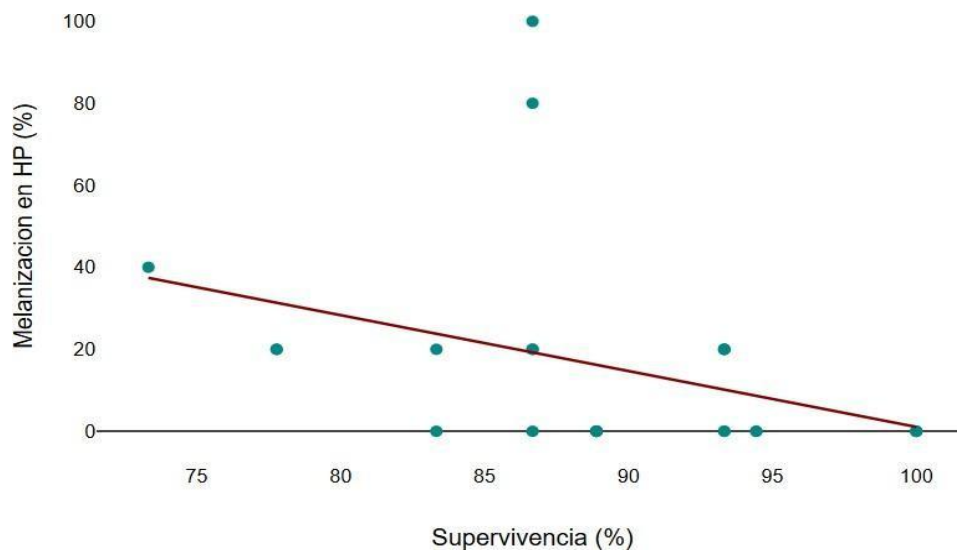


Figura 21

Relación entre la supervivencia final y prevalencia de melanización en HP.



8 DISCUSIÓN

Las concentraciones de *V. parahaemolyticus* total y potencialmente patógeno que suelen cambiar con el tiempo aún bajo constantes muestreos, y que fueron demostradas por Bacian et al. (2021) mediante un seguimiento longitudinal, explican por qué los juveniles al momento de la llegada presentaron una carga bacteriana con diferencias entre corridas, y esto agravó la necesidad de comprender que este hallazgo tiene sentido cuando se analiza la naturaleza ecológica del género *Vibrio*, cuyas poblaciones varían con el origen de los animales, salinidad, temperatura, materia orgánica y la estructura microbiana del sistema, circunstancia que se vincula con la heterogeneidad temporal y espacial de *V. harveyi* dentro de una empresa acuícola que ya había sido observada por Da Fonseca Ferreira et al. (2024), con reservorios asociados a profundidad y superficies, y que refleja como la magnitud de respuesta no fue idéntica durante cada corrida, pues estos antecedentes son importantes y siguen siendo relevantes en la actualidad.

La virulencia y la respuesta al ambiente que dependen de la cepa, y que ya habían sido documentadas mediante una elevada diversidad fenotípica y molecular entre aislados de *V. harveyi* obtenidos en acuicultura, haciendo evidente esta condición, se vinculan con la predominancia de *V. alginolyticus* dentro de los vibrios totales postinfección, y esto agravó la necesidad de comprender que el desafío con *V. parahaemolyticus* se desarrolló sobre una microbiota preexistente y no en sistema

monoespecífico, circunstancia reportada por Pavlinec et al. (2022), mientras que la adaptación de *V. harveyi* que modifica la interacción entre temperatura y pH, y que ya había sido demostrada por Gundogdu et al. (2023), agrega complejidad a este escenario y sigue siendo relevante en la actualidad.

Las reducciones de 71,21% para vibrios totales y 80.04% para *V. parahaemolyticus* respecto al grupo control, que ya habían sido calculadas en el análisis descriptivo, se vinculan con el gradiente consistente que se pudo observar en el hepatopáncreas, y esto agravó la necesidad de reconocer que el grupo control presentó las cargas más elevadas mientras que T3 las menores, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

Los comportamientos de virulencia y quorum sensing de vibrios que los aceites esenciales pueden reducir, además de ejercer actividades antimicrobianas, y que ya habían sido demostrados por Zhang et al. (2023) en un estudio con *P. vannamei*, configuran un antecedente directo importante para el uso de estos compuestos frente a la vibriosis, y esto agravó la necesidad de comprender que la disminución más marcada en T2 y T3 es compatible con un efecto local del producto de orégano sobre el tracto digestivo y la comunidad cultivable, circunstancia que los resultados actuales hacen aún mayor en un bioensayo con juveniles y que sugiere que el efecto puede expresarse principalmente en la matriz digestiva, y que sigue siendo relevante en la actualidad.

La eficacia sobre carga bacteriana, inmunidad y supervivencia que depende de la formulación y de la protección del principio activo, y mencionada en varias investigaciones recientes sobre intervenciones alimentarias en *Penaeus vannamei*, se vincula con las mejoras de salud y resistencia que Wang et al. (2021) observaron al aplicar mediante vía oral *Lactobacillus pentosus*, y esto agravó la necesidad de reconocer que la eficacia de *Bacillus subtilis* que incrementaron mediante la encapsulación, ya había sido reportada por Hakim et al. (2025), circunstancia que demuestra que ambos trabajos, aunque no evalúan aceite de orégano, demuestran que la vía oral puede producir respuestas biológicas cuantificables y que la tecnología de formulación condiciona la magnitud del efecto, y que sigue siendo relevante en la actualidad.

Los coeficientes de interacción positivos y no significativos en las cargas de hepatopáncreas, lo que indica que T3 no redujo la carga por debajo de la esperada a partir de T1 y T2 en la escala logarítmica, y que ya habían sido separados del efecto principal de fagos y aceites mediante el análisis factorial, se vinculan con el mejor desempeño descriptivo en hepatopáncreas que mostró el tratamiento 3, que consistió en Fagos + Aceite esencial de orégano, recalcando que un tratamiento combinado no es necesariamente sinérgico, circunstancia que permite afirmar que existió un efecto combinado favorable en algunas respuestas, pero no evidencia de sinergia a la dosis, formulación y cronograma evaluados, y que sigue siendo relevante.

El techo fisiológico o de mecanismos homeostáticos que limitan la concentración de hemocitos circulantes, y que se ha planteado como explicación posible, se vincula con la interacción subaditiva del THC que refuerza esta interpretación, y esto agravó la necesidad de comprender que T1 y T2 elevaron el conteo respecto al control, pero T3 no produjo la suma esperada de ambos efectos, circunstancia que además permite considerar que una parte de los hemocitos haya migrado hacia los tejidos o participado en coagulación, encapsulación y melanización, y que esto puede ser corroborado con estudios anteriores sobre como los aditivos orales pueden mejorar los parámetros inmunológicos en *P. vannamei*, pero no siempre cambian en paralelo ni de forma aditiva, según registros ya publicados por Wang et al. (2021) y Hakim et al. (2025), y que sigue siendo relevante.

La plausibilidad de combinar fagos con un fenol, según Shen et al. (2025), se pudo observar que la combinación de bacteriófagos y carvacrol prolongó el control de una bacteria fitopatógena frente a los agentes individuales, muestra también que la respuesta depende de la concentración y secuencia de aplicación, y comprender que en el presente estudio se evaluó una sola dosis de cada agente, por tanto la falta de interacción no excluye que otras proporciones, tiempos o formulaciones puedan generar sinergia, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

La sensibilidad a factores ambientales o al estado basal del lote que sugiere la gran influencia de la corrida sobre las cargas de hemolinfa, ha sido apoyada por Da Fonseca Ferreira et al. (2024) y Royer & Barkovskii (2025) al mostrar que parámetros de agua permiten predecir cambios temporales de vibrios en instalaciones acuícolas, se vincula con la respuesta de hemolinfa que no reprodujo el patrón del hepatopáncreas, y esto evidenció la necesidad de reconocer que T3 presentó la media más alta de vibrios totales en hemolinfa, mientras que T2 y T3 mostraron valores muy bajos de *V. parahaemolyticus*, circunstancia que Harrison et al (2022) también documentaron al registrar cambios en la prevalencia de especies de *Vibrio* en ambientes productivos, y que apoya que la hemolinfa debe evaluarse mediante series temporales y no únicamente como una medición final, y que sigue siendo relevante.

La estimulación o acumulación de la población celular circulante que sugiere el patrón observado, y registrado en varios estudios donde las intervenciones alimentarias modifican parámetros inmunes y resistencia en *P. vannamei*, según Novriadi et al. (2023) y Chuchird et al. (2021), se vincula con el THC medio superior al control que presentaron los tres tratamientos, aunque el ANOVA general no alcanzó significancia, reconociendo que la suplementación con *Bacillus spp.* que mejoró respuestas inmunes y resistencia frente a un desafío infeccioso, ya había sido encontrada por Monier et al. (2023), circunstancia que en conjunto apoya que una tendencia inmunológica pueda coexistir con alta variabilidad individual.

La tendencia o dirección biológicamente coherente que mostraron las asociaciones negativas entre THC y las cargas de vibrios totales o *V. alginolyticus*, a pesar de no haber alcanzado significancia, se vincula con los cambios tisulares e inmunes complejos que la patogénesis puede involucrar en *P. vannamei*, y que ya habían sido demostrados por Wu et al. (2023) al señalar que no consiste en un solo biomarcador, y esto agravó la necesidad de comprender que los estudios a futuro deberían complementar THC con diferencia de hemocitos, actividad fenoloxidasa, fagocitosis, lisozima y expresión de genes inmunes, circunstancia que sigue siendo relevante en la actualidad.

La normalidad y homogeneidad que cumplieron los datos, y que ya habían sido verificadas como supuestos previos, permitieron que el ANOVA confirmara diferencias estadísticas entre tratamientos, y esto agravó la necesidad de reconocer que la supervivencia final aumentó progresivamente desde el control hasta T3, circunstancia que Tukey mostró al evidenciar que T1, T2 y T3 presentaron supervivencia significativamente mayor que el control, y que coincide con Hoa et al., (2023), quienes observaron que la inclusión dietaria de una mezcla de aceites esenciales redujo significativamente la mortalidad de *Penaeus vannamei* desafiado con *Vibrio parahaemolyticus* y disminuyó el recuento de *Vibrio spp.* en el hepatopáncreas, especialmente con la dosis más alta, mientras que Eissa et al. (2025) registraron una supervivencia significativamente mayor, un mayor conteo total de hemocitos y una

reducción de las alteraciones histopatológicas del hepatopáncreas en camarones alimentados con nanopartículas de aceite esencial antes del desafío con *V. parahaemolyticus*, y ambos casos respaldan que una mayor carga de vibrios y un mayor grado de alteración hepatopancreática se relacionan con una menor supervivencia, mientras que una respuesta hemocitaria más elevada se asocia con una mayor capacidad defensiva y supervivencia frente a la infección, y que sigue siendo relevante.

La pérdida de la arquitectura tubular, la separación del epitelio y la activación de respuestas frente al daño, procesos que pueden comprometer digestión, absorción y el almacenamiento energético, se vinculan con los indicadores tisulares más consistentes que fueron la deformación tubular, el desprendimiento celular y la melanización, y esto agravó la necesidad de comprender que estas alteraciones se asociaron negativamente con la supervivencia, circunstancia que ya había sido observada en análisis previos y que permite afirmar que integrar supervivencia, carga bacteriana, conteo de hemocitos y montajes en fresco permitió caracterizar el estado sanitario con mayor precisión que cualquiera de estos indicadores de forma aislada, y que sigue siendo relevante.

La mayor severidad hepatopancreática general y las mayores prevalencias de deformación tubular, desprendimiento celular y melanización que presentó descriptivamente el control, a pesar de que las comparaciones de prevalencia entre

tratamientos no alcanzaron significancia estadística, se vinculan con la mayor carga media de vibrios y la menor supervivencia del mismo grupo, y esto agravó la necesidad de comprender que la ausencia de diferencias significativas en cada signo puede atribuirse a la variabilidad entre tanques, pero esto no invalida el desafío, ya que la dirección conjunta de los resultados microbiológicos, tisulares e inmunológicos, junto con las correlaciones negativas entre daño y supervivencia, demuestra que la respuesta patológica se manifestó como una gradiente de afectación, circunstancia que sigue siendo relevante.

Las cuatro tendencias que merecen evaluación adicional y que los resultados permiten reconocer, identificadas como patrones emergentes, incluyen el efecto consistente del aceite esencial de orégano y del tratamiento combinado (T3) en hepatopáncreas, una respuesta específica por matriz con variabilidad en hemolinfa, un aumento descriptivo de THC sin aditivo de la combinación, y una relación negativa entre carga total, daño tubular y supervivencia, y esto agravó la necesidad de comprender que estas tendencias biológicas son congruentes con la naturaleza multifactorial de la enfermedad, circunstancia que justifica estudios con mayor número de tanques y caracterización molecular, y que sigue siendo relevante en la actualidad.

La evidencia experimental útil que proporcionaron el diseño experimental y la repetición por dos corridas, y que ya había sido valorada como aporte metodológico, se vincula con el tratamiento combinado (T3) que es sinónimo de mayor supervivencia y menores cargas descriptivas en hepatopáncreas, aclarando una vez más la necesidad de comprender que el análisis factorial no demostró sinergia, circunstancia que no desacredita el tratamiento conjunto, sino que define con mayor precisión su alcance como estrategia combinada favorable que requiere optimización antes de atribuirle una interacción sinérgica, y que sigue siendo relevante.

9 CONCLUSIONES

La caracterización de la carga bacteriana basal demostró que los juveniles de *P. vannamei* ingresaron al bioensayo con una microbiota cultivable preexistente, donde la composición y concentración variaron entre ambas corridas experimentales. La predominancia de *V. alginolyticus* dentro del recuento total confirmó que el desafío con *V. parahaemolyticus* se desarrolló sobre una comunidad bacteriana establecida previamente. Después de la infección, se observó una limitación descriptiva del incremento de vibrios en el hepatopáncreas respecto al control, destacándose T3 con reducciones de 71.21% para vibrios totales y 80.04% para *V. parahaemolyticus*. Debido a que estas diferencias globales de carga no alcanzaron significancia estadística, estos resultados deben interpretarse como una tendencia biológica consistente de reducción y no como eliminación bacteriana. En consecuencia, no se rechazó la hipótesis nula (H_0), debido a que no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la carga bacteriana entre los tratamientos evaluados y el grupo control.

El análisis factorial no demostró una interacción sinérgica entre los bacteriófagos y el aceite esencial de orégano bajo las dosis y condiciones evaluadas. La interacción existente y observable sobre el THC presentó una dirección negativa o subaditiva, mientras que los términos de interacción bacteriófago $\times$ aceite esencial no fueron significativos ni favorables para las cargas de hepatopáncreas y hemolinfa.

Aunque T3 presentó descriptivamente las menores cargas medias en el hepatopáncreas y una respuesta favorable frente al control, este comportamiento no representa evidencia estadística de sinergia. Por ende, la combinación puede describirse como una estrategia profiláctica potencial favorable, pero no como un tratamiento sinérgico confirmado.

Los grupos tratados con bacteriófagos, aceite esencial de orégano y su combinación presentaron conteos totales medios de hemocitos superiores al control; sin embargo, las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas, por lo que no puede concluirse que los productos ocasionaron directamente la estimulación inmunitaria. No obstante, el conteo total de hemocitos se asoció positivamente con supervivencia de los juveniles ($p = 0,448$; $p = 0,028$), lo que respalda su utilidad como indicador de la capacidad defensiva de los organismos, sin que esta asociación deba interpretarse como una relación causal.

La supervivencia presentó el valor más bajo en el grupo control y el más alto en T3, evidenciando un comportamiento general favorable de los tratamientos profilácticos. De la misma manera, la supervivencia disminuyó conforme aumentó la carga de vibrios totales en el hepatopáncreas y alteraciones hepatopancreáticas evaluables mediante montajes en fresco, principalmente la deformación tubular, el desprendimiento celular y la melanización. La integración de los indicadores

microbiológicos, inmunitario y tisulares respalda el potencial profiláctico de los bacteriófagos y el aceite esencial de orégano, aplicados individualmente o en combinación para mejorar la respuesta de los juveniles frente al desafío bacteriano; no obstante, el mejor comportamiento descriptivo de T3 no debe atribuirse a una interacción sinérgica estadísticamente comprobada.

10 RECOMENDACIONES

Para futuros estudios relacionados a la presente investigación, se recomienda mantener el tanque como la unidad experimental y si es posible trabajar con un número mayor de replicas por tratamiento, para así poder confirmar o descartar las tendencias biológicas identificadas durante el experimento.

También sería conveniente repetir la evaluación combinada de los bacteriófagos y aceite esencial de orégano utilizando diferentes concentraciones, proporciones y tiempos de administración. La respuesta en T3 indica que, aunque no se identificó sinergia, esto no excluye la posibilidad de que otras proporciones generen una respuesta aditiva o sinérgica.

Ampliar la evaluación inmunológica mediante conteo diferencial de hemocitos, actividad fenoloxidasa, capacidad fagocítica, enzimas antioxidantes y expresión de genes inmunitarios, ya que estos indicadores permitirían interpretar con mayor precisión el incremento descriptivo de THC y la interacción subaditiva encontrada en el tratamiento 3. De la misma manera, debe conservarse la integración de supervivencia, bacteriología y condición tisular, debido a que la deformación tubular y la melanización mostraron relaciones relevantes con la supervivencia.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Andriani, Y., Pratama, R. I., & Safitri, R. (2022). The effect of encapsulated probiotic to performance of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research, 17(3), 32–38. <https://doi.org/10.9734/AJFAR/2022/v17i330407>
- Anzoategui García, S. Y. (2025). Efecto de ácidos orgánicos, aceites esenciales y su sinergia en el crecimiento y supervivencia de *Penaeus Vannamei* [Tesis de posgrado, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. Repositorio UPSE. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/13445>
- Bacian, C., Verdugo, C., García, K., Perez-Larruscain, J., de Blas, I., Cachicas, V., & Lopez-Joven, C. (2021). Longitudinal study of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (tdh+ and/or trh+) in two natural extraction areas of *Mytilus chilensis* in southern Chile. Frontiers in Microbiology, 12, Artículo 621737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621737>
- Barrantes, E. (2023). Efectos de la bacteria patógena *Vibrio parahaemolyticus* en camarones (*Litopenaeus vannamei*) de cultivo y en la salud del consumidor. Pensamiento Actual. <https://archivo.revistas.ucr.ac.cr//index.php/pensamiento-actual/article/view/55171>

- Betancourt, J. L., Rodríguez-Ramos, T., & Dixon, B. (2024). Pattern recognition receptors in Crustacea: Immunological roles under environmental stress. *Frontiers in Immunology*, 15, Artículo 1474512. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1474512>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Cámara Nacional de Acuacultura [CNA]. (2024). Estadísticas de exportación camaronera ecuatoriana. Cámara Nacional de Acuacultura.
- Castillo-Ochoa, B. del C., & Velásquez-López, P. C. (2021). Manejo estacional de los sistemas de producción de camarón en el Ecuador. *Sociedad & Tecnología*, 4(3), 447–461.
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>

- Chimalapati, S., de Souza Santos, M., Servage, K., De Nisco, N. J., Dalia, A. B., & Orth, K. (2018). Natural transformation in *Vibrio parahaemolyticus*: A rapid method to create genetic deletions. *Journal of Bacteriology*, 200(9), e00032-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00032-18>
- Ciesielski, M., Clerkin, T., Lucas, J., Noble, R. T., & Ben-Horin, T. (2026). Characterizing microbial dynamics associated with *Crassostrea virginica* mortality. *Aquaculture Reports*, 48, Artículo 103563. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2026.103563>
- Colorado, J. F. (2014, 15 de octubre). Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). iNaturalist. <https://www.inaturalist.org/photos/1441420>
- Cordero Jara, A. A. (2025). Análisis bibliográfico del uso de bacteriófagos para control de *Vibrio spp.* en el cultivo de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) [Trabajo de titulación, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional UPS. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/30199>
- Cuéllar, J. A. (2021). Acuicultura en Latinoamérica: ¿Cuál es el panorama? *Veterinaria Digital*. <https://www.veterinariadigital.com/articulos/acuicultura-en-latinoamerica-cual-es-el-panorama/>
- De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: A microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathogens*, 10(4), e1003919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003919>

- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: Luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25(10), 472–479.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.001>
- Domínguez-Borbor, C., et al. (2020). Quorum sensing inhibition and antimicrobial activity of essential oils against *Vibrio* species isolated from shrimp culture systems. *Aquaculture Reports*, 17, Artículo 100338.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100338>
- Eissa, et al. (2025). Pumpkin seed oil-loaded chitosan nanoparticles enhance growth, digestive enzymes, and immune response in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Impacts on histopathology and survival against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 40, Artículo 102599.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102599>
- Ellett, A. N., Rosales, D., Jacobs, J. M., Paranjpye, R., & Parveen, S. (2022). Growth rates of *Vibrio parahaemolyticus* sequence type 36 strains in live oysters and in culture medium. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02112-22.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.02112-22>
- Escobar, D. M., & Nieto, C. E. (2021). Efectos de Nitrito en *Penaeus vannamei* Cultivados en Aguas de Baja Salinidad [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. DSpace en ESPOL.
<https://dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/51441>

- Fraga, P., Regina de Borba, M., Germano, T., & Wasielesky, W. (1997). Effect of salinity on performance and body composition of Pacific white shrimp juveniles reared in a super-intensive system. *Revista Brasileira de Zootecnia*.
<https://www.scielo.br/j/rbz/a/f8vvcPgDnfsQZYwpXLfct3m/?lang=en>
- Frías, M. G. (1997). Estudio sobre el efecto del amonio en postlarvas y juveniles de *Penaeus vannamei* [Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio de Tesis DGB UNAM.
<https://ru.dgb.unam.mx/items/b0083d5a-d3eb-4286-8c51-1381ef7f54ea>
- Fu, J., Li, Y., Zhao, L., Wu, C., & He, Z. (2023). Characterization of vB_ValM_PVA8, a broad-host-range bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 14, Artículo 1105924.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1105924>
- Guevara Toscana, M. E., Palma Caicedo, T. A., & Cabrera Enríquez, D. M. (2021). Impacto económico y ambiental generado por el sector camaronero del Ecuador. *International Journal of Studies in Administrative Sciences STRATEGOS*, 1(2). <https://doi.org/10.53591/strategos.v1i2.1844>
- Hammerl, J. A., Göllner, C., Jäckel, C., Swidan, F., Gutmann, H., & Strauch, E. (2021). The acquisition of the scr gene cluster encoding sucrose metabolization enzymes enables strains of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* to utilize sucrose as carbon source. *Frontiers in Microbiology*, 12, Artículo 645755. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645755>

- Ho, et al. (2023). Growth performance and disease resistance against *Vibrio parahaemolyticus* of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed essential oil blend (Phyto AquaBiotic). *Animals*, 13(21), Artículo 3320.
<https://doi.org/10.3390/ani13213320>
- Intriago, Pablo & Medina, Andres & Espinoza, Jorge & Enriquez, Xavier & Arteaga, Kelly & Aranguren, Fernando & Shinn, Andrew & Romero, Xavier. (2023). Acute mortality of *Penaeus vannamei* larvae in farm hatcheries associated with the presence of *Vibrio* sp. carrying the VpPirAB toxin genes. *Aquaculture International*. 31.10.1007/s10499-023-01129-0.
- Jun, J. W., Kim, J. H., Shin, S. P., Han, J. E., Chai, J. Y., & Park, S. C. (2017). Protective effects of the *Aeromonas* phage pAh6-C against mass mortality of shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 476, 122–129.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.020>
- Kuek, M., McLean, S. K., & Palombo, E. A. (2023). Control of *Escherichia coli* in fresh-cut mixed vegetables using a combination of bacteriophage and carvacrol. *Antibiotics*, 12(11), Artículo 1579.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12111579>
- Le Moullac, G., & Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture*, 191(1–3), 121–131.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00422-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00422-1)

- Leighton, R. E., Xiong, L., Anderson, G. K., Astarita, G. M., Cai, G., Norman, R. S., & Decho, A. W. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in vitro biofilm dispersal from microplastics influenced by simulated human environment. *Frontiers in Microbiology*, 14, Artículo 1236471. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236471>
- Li, J., Liu, J., Fu, K., Qin, K., Wu, C., Yu, X., Zhou, S., & Zhou, L. (2020). Rapid identification and detection of *Vibrio parahaemolyticus* via different types of modus operandi with LAMP method in vivo. *Annals of Microbiology*, 70, Artículo 40. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01585-6>
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society.
- Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1), 110–130. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>
- Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Muleba, L. (2022). Evaluación de la eficacia antibacteriana de los desinfectantes de manos de uso común en Sudáfrica. *PubMed Central*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9367797>

- Novriadi, R., Davies, S., Triatmaja, K. I. K., Hermawan, M., Kusnendar Muljana Kontara, E., Tanaka, B., Rinaldy, A., & Nugroho, J. E. (2024). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) as an alternative to marine ingredients elicits superior growth performance and resistance to *Vibrio harveyi* infection for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 24(1), TRJFAS24343. <https://doi.org/10.4194/TRJFAS24343>
- Ortiz Núñez, A. D. (2018). Evaluación de aceites esenciales y antibióticos sobre los índices productivos y morfometría de las vellosidades intestinales en pollos de engorde. Red de Investigadores Ecuatorianos | REDI. <https://redi.cedia.edu.ec/document/226617>
- Partanen, K. H., & Mroz, Z. (1999). Organic acids for performance enhancement in pig diets. Nutrition Research Reviews, 12(1), 117–145. <https://doi.org/10.1079/095442299108728884>
- Peña, N., & Varela, A. (2015). Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. SciELO – Scientific Electronic Library Online. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212015000100005

- Potdukhe, T. V., Caffrey, J. M., Rothfus, M. J., Daniel, C. E., Swords, M. E., Albrecht, B. B., Jeffrey, W. H., & Waidner, L. A. (2021). Viable putative *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in the Pensacola and Perdido Bays: Water column, sediments, and invertebrate biofilms. *Frontiers in Marine Science*, 8, Artículo 745656. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.745656>
- Pozo, F., Borbor, M., Solórzano, R., Sonnenholzner, S., & Bayot, B. (2024). Optimized swarming motility assay to identify anti-virulence products against *Vibrio parahaemolyticus*, a pathogen of farmed shrimp. *MethodsX*, 12, Artículo 102622. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102622>
- Rimbaldo Luzon, A., et al. (2024). Global shrimp trade and Ecuadorian export competitiveness in international seafood markets. *Aquaculture Economics & Management*. <https://doi.org/10.1080/13657305.2024.xxxxx>
- Rodríguez, J., & Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191(1–3), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00421-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00421-X)
- Saltos, M. M. (2024). El top ten de exportadoras de camarón en el primer semestre de 2024. *Forbes Ecuador*. <https://www.forbes.com.ec/rankings/el-top-ten-exportadoras-camaron-primer-semester-2024-n57294>

- Shen, Y., Li, Y., Wang, L., Wu, C., Su, X., & Tian, Y. (2025). Carvacrol and streptomycin in combination weaken streptomycin resistance in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Plants*, 14(6), Artículo 908. <https://doi.org/10.3390/plants14060908>
- Slinker, B. K. (1998). The statistics of synergism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(4), 723–731. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0655>
- Smith, V. J., Brown, J. H., & Hauton, C. (2003). Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1), 71–90. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00140-7)
- Söderhäll, K. (2016). Crustacean immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 93–113. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., Rio-Rodriguez, R., Diéguez, A. L., & Romalde, J. L. (2015). Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* strains causing AHPND in shrimp. *Aquaculture*, 435, 332–338. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25548045/>
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>

- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 954–967.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55.
<https://doi.org/10.3354/dao02621>
- World Organisation for Animal Health. (2023). Acute hepatopancreatic necrosis disease. WOAHA Aquatic Manual.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/2.2.01_AHPND_ESP.pdf
- Wu, Z., Chu, K. H., & Ma, K. Y. (2023). Transcriptome analysis of multiple tissues in the shrimp *Penaeus vannamei* reveals the typical physiological response to three pathogens. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(2), Artículo 389. <https://doi.org/10.3390/jmse11020389>
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7, Artículo 42177. <https://doi.org/10.1038/srep42177>

- Yockteng, J. (2017). Situación y alternativas de continuidad y desarrollo apropiado para largo plazo de las larvicultura de camarones en el ecuador. Bioartemia. <https://www.bioartemia.com/ayuda-memoria/>
- Zhang, S., Yang, Q., Eggermont, M., & Defoirdt, T. (2022). Quorum sensing interference in vibrios. *Journal of Fish Diseases*, 45(10), 1463–1480. <https://doi.org/10.1111/jfd.13693>

12 ANEXOS

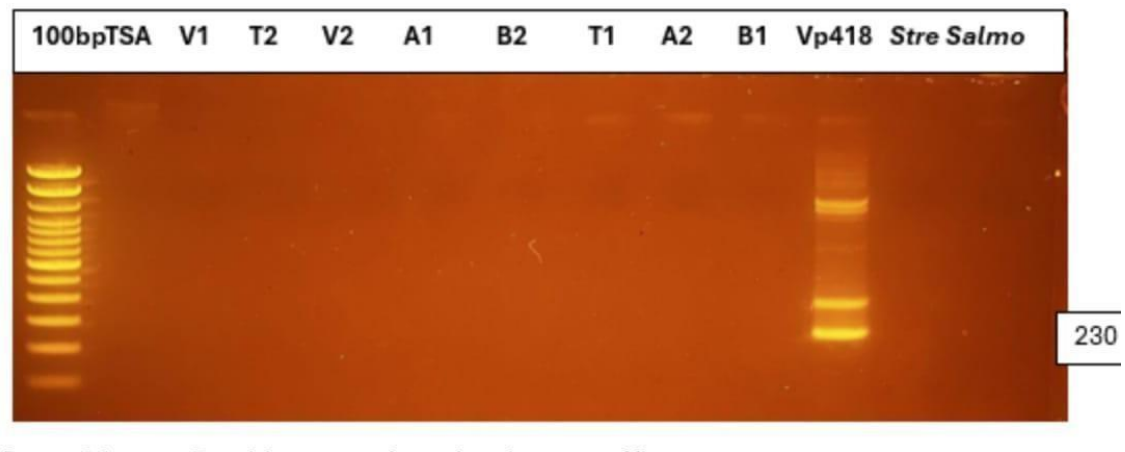


Figura 22 PCR positiva para Vp+418. (Intriago et al., 2023)



Figura 23 Juvenil de *Penaeus vannamei* de 10g.



Figura 24 Área de microscopio óptico.

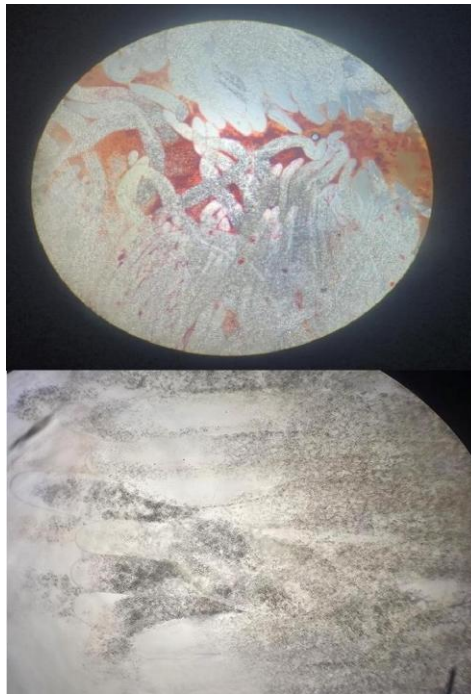


Figura 25 Izquierda: Tubulos con lípidos grado dos, melanización grado 2, Contenido vacío grado 1; Derecha: Lípidos grado 3, melanización grado 1, y con contenido vacío grado 1



Figura 26 Izquierda: Presencia de bacterias filamentosas grado 1, melanización grado 2, y detritos grado 3; derecha: Lamela branquial bifurcada.



Figura 27 Intestinos inflamados, llenos de alimento, microalgas y detritos.

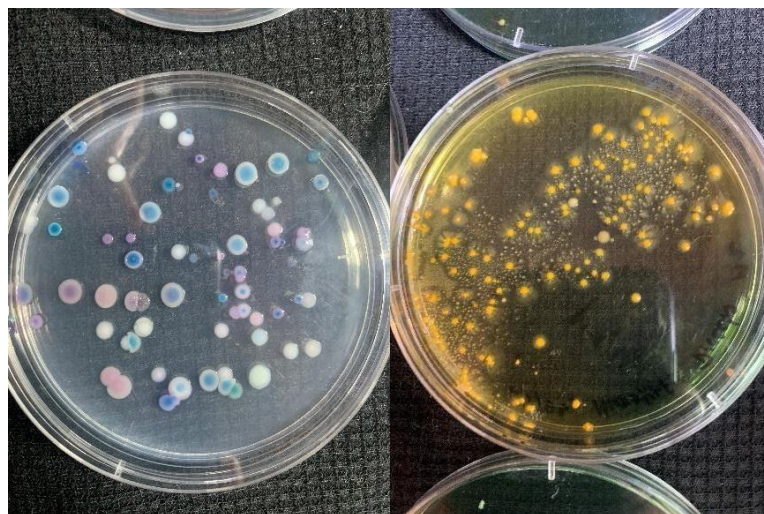


Figura 28 Crecimiento bacteriano en CHROMagar y TCBS.



Figura 29 Pool de HP de 10 organismos para microbiología

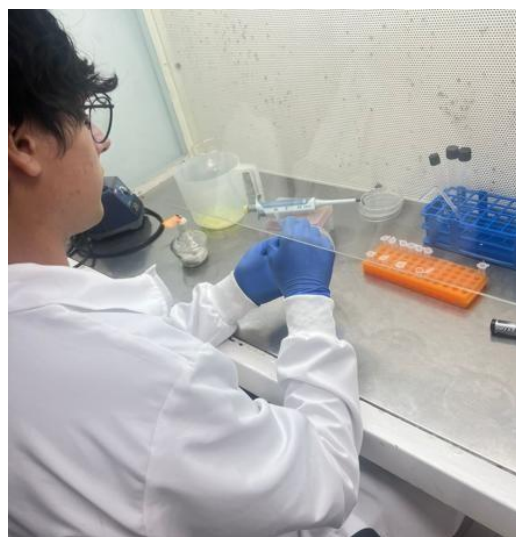


Figura 30 Siembra de muestras por método de extensión por superficie.



Figura 31 Captura de los juveniles.



Figura 32 Medición de parámetros rutinaria.



Figura 33 Despacho de juveniles provenientes de camaronera en Playas.



Figura 34 Visita de la Acui. Sonnya Mendoza, PhD.



Figura 35 Medición rutinaria de Amonio y Nitrito por colorimetría

Tabla 18

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk por tratamiento

Variable	Tratamiento	W	p	Normalidad
Vibrios totales	C	0.8465	0.1476	Sí
Vibrios totales	T1	0.9175	0.4879	Sí
Vibrios totales	T2	0.9766	0.9335	Sí
Vibrios totales	T3	0.9299	0.5790	Sí
<i>V. parahaemolyticus</i>	C	0.8235	0.0947	Sí
<i>V. parahaemolyticus</i>	T1	0.6492	0.0017	No
<i>V. parahaemolyticus</i>	T2	0.8699	0.2258	Sí
<i>V. parahaemolyticus</i>	T3	0.8522	0.1640	Sí
<i>V. alginolyticus</i>	C	0.8950	0.3452	Sí
<i>V. alginolyticus</i>	T1	0.9151	0.4705	Sí
<i>V. alginolyticus</i>	T2	0.9385	0.6472	Sí
<i>V. alginolyticus</i>	T3	0.8406	0.1318	Sí
<i>V. vulnificus</i>	C	0.7653	0.0280	No
<i>V. vulnificus</i>	T1	0.6848	0.0043	No
<i>V. vulnificus</i>	T2	0.7129	0.0084	No
<i>V. vulnificus</i>	T3	0.7199	0.0099	No
Reducción respecto al grupo control (%)	T1	0.8176	0.1575	Si
Reducción respecto al grupo control (%)	T2	0.819	0.161	Si
Reducción respecto al grupo control (%)	T3	0.773	0.051	Si
THC ($\times 10^6$ células/mL)	C	0.9412	0.5324	Sí
THC ($\times 10^6$ células/mL)	T1	0.9756	0.7004	Sí
THC ($\times 10^6$ células/mL)	T2	0.9965	0.8875	Sí
THC ($\times 10^6$ células/mL)	T3	0.9997	0.9645	Sí

Nota. Para las variables microbiológicas se utilizaron valores transformados mediante $\log_{10}(\text{UFC/g} + 1)$. Se consideró normalidad cuando $p > .05$.

Tabla 19*Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas*

Variable	Estadístico	<i>p</i>	Homogeneidad
Vibrios totales	0.2522	0.8588	Sí
<i>V. parahaemolyticus</i>	0.6082	0.6174	Sí
<i>V. alginolyticus</i>	0.5172	0.6752	Sí
<i>V. vulnificus</i>	2.0353	0.1413	Sí
THC ($\times 10^6$ células/mL)	0.8955	0.4843	Sí

Nota. Se consideró homogeneidad de varianzas cuando $p > 0.05$.

Tabla 20*Resumen de las pruebas inferenciales de carga bacteriana*

Matriz/ámbito	Variable	Prueba	Estadístico	<i>p</i>	Conclusión
HP, ensayo total	Vibrios totales	ANOVA	$F(3, 20) = 2.872$	.062	No significativa
HP, ensayo total	<i>V. parahaemolyticus</i>	Kruskal-Wallis	$H(3) = 1.629$	.653	No significativa
HP, ensayo total	<i>V. alginolyticus</i>	ANOVA	$F(3, 20) = 2.423$	.096	No significativa
HP, ensayo total	<i>V. vulnificus</i>	Kruskal-Wallis	$H(3) = 4.042$	.257	No significativa
Hemolinfa, corrida 1	Vibrios totales	ANOVA	$F(3, 8) = 1.217$	.365	No significativa
Hemolinfa, corrida 2	Vibrios totales	Kruskal-Wallis	$H(3) = 4.846$	.183	No significativa
Hemolinfa, corrida 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	Kruskal-Wallis	$H(3) = 3.999$	.262	No significativa
Hemolinfa, corrida 2	<i>V. parahaemolyticus</i>	ANOVA	$F(3, 8) = 5.411$	.025	Significativa

Nota. HP = hepatopáncreas. Las pruebas se realizaron con cargas transformadas mediante $\log_{10}(x + 1)$.

En la corrida 2, Tukey identificó diferencias C–T3 para vibrios totales ($p = .031$), C–T3 para *V. alginolyticus* ($p = .042$) y C–T2 para *V. parahaemolyticus* en hemolinfa ($p = .036$).

Tabla 21*Resultados del conteo total de hemocitos y del análisis factorial*

Variable respuesta	Análisis	Estadístico	p	Interpretación
THC	ANOVA de una vía	F(3, 20) = 2.840	.064	No significativa
THC	Fago × orégano	$\beta = -4.175$; F(1, 19) = 4.790	.041	Interacción subaditiva
HP vibrios totales	Fago × orégano	$\beta = 0.374$; F(1, 19) = 1.200	.287	No significativa
HP V. <i>parahaemolyticus</i>	Fago × orégano	$\beta = 0.410$; F(1, 19) = 0.203	.657	No significativa
Hemolinfa vibrios totales	Fago × orégano	$\beta = -0.039$; F(1, 19) = 0.006	.937	No significativa
Hemolinfa	Fago × orégano	$\beta = 0.244$; F(1, 19) = 0.212	.650	No significativa

V.
parahaemolyticus

Nota. El modelo factorial incluyó los efectos de bacteriófagos, aceite esencial de orégano, su interacción y la corrida. Una interacción significativa con dirección favorable sería necesaria para sustentar sinergia.

Tabla 22*Correlaciones entre el conteo total de hemocitos y las cargas bacterianas*

Variable	n	ρ	p	Conclusión
HP vibrios totales	24	-0.368	.077	No significativa
HP V. <i>parahaemolyticus</i>	24	-0.251	.237	No significativa
HP V. <i>alginolyticus</i>	24	-0.377	.070	No significativa
Hemolinfa vibrios totales	24	-0.366	.078	No significativa
Hemolinfa V. <i>parahaemolyticus</i>	24	-0.368	.076	No significativa

Nota. P = coeficiente de correlación de Spearman. Las cargas se analizaron como $\log_{10}(x + 1)$.

Tabla 23*Comparación de supervivencia e indicadores de salud entre tratamientos*

Variable	Prueba	Estadístico	p	Conclusión
Supervivencia final	Kruskal-Wallis	H(3) = 13.688	0.003	Significativa
IHP	ANOVA	F(3, 20) = 1.597	.222	No significativa
Índice hepatopancreático	ANOVA	F(3, 20) = 0.490	.693	No significativa
Índice branquial	ANOVA	F(3, 20) = 0.226	.877	No significativa
Índice global de salud	Kruskal-Wallis	H(3) = 0.440	.932	No significativa
Prevalencia promedio de signos	ANOVA	F(3, 20) = 0.298	.826	No significativa

Nota. La supervivencia de la segunda corrida se calculó con 15 organismos por tanque. Los datos cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se aplicó ANOVA de una vía.

Tabla 24

Comparaciones por pares mediante la prueba de tukey para la supervivencia final.

Comparación	<i>p</i> sin ajustar	<i>p</i> Bonferroni	Conclusión
C-T1	0,063	0,377	No significativa
C-T2	0,010	0,059	No significativa
C-T3	< 0,001	0,002	Significativa
T1-T2	0,469	1,000	No significativa
T1-T3	0,086	0,517	No significativa
T2-T3	0,321	1,000	No significativa

Nota. La única comparación significativa fue C-T3.

Tabla 25

Prueba de rangos logarítmicos para las curvas de Kaplan-Meier

Corrida	χ^2	gl	<i>p</i>	Conclusión
Primera	8.22	3	.042	Significativa
Segunda	4.37	3	.225	No significativa

Nota. La prueba Log-Rank comparó globalmente las cuatro curvas de supervivencia en cada corrida.

Tabla 26

Correlaciones entre supervivencia y variables generales

Variable	n	ρ	<i>p</i>	Conclusión
IHP promedio	24	0.164	0.443	No significativa
Índice hepatopancreático	24	-0.477	0.018	Significativa
Índice branquial	24	-0.042	0.847	No significativa
Índice global de salud	24	-0.286	0.176	No significativa
Prevalencia promedio de signos	24	-0.385	0.063	No significativa
Vibrios totales en HP	24	-0.472	0.020	Significativa
<i>V. parahaemolyticus</i> en HP	24	-0.191	0.372	No significativa
THC	24	0.448	0.028	Significativa

Nota. Las correlaciones se realizaron entre la supervivencia y las variables generales presentes en la tabla. Las cargas bacterianas se expresaron como $\log_{10}(x + 1)$.

Tabla 27

Correlaciones entre supervivencia y prevalencia de signos hepatopancreáticos.

Signo clínico	n	ρ	p	Conclusión
Deformación tubular	24	-0.631	0.001	Significativa
Desprendimiento celular	24	-0.431	0.036	Significativa
Túbulos vacíos	24	0.030	0.891	No significativa
Atrofia	24	-0.299	0.156	No significativa
Reducción de vacuolas lipídicas	24	0.167	0.434	No significativa
Melanización	24	-0.557	0.005	Significativa
Necrosis	24	-0.236	0.267	No significativa

Nota. Las correlaciones significativas fueron deformación tubular, desprendimiento celular y melanización

Tabla 28

Reducción porcentual postinfección respecto al grupo control

Grupo bacteriano	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)
Vibrios totales	50.02	65.58	71.21
<i>V. parahaemolyticus</i>	60.36	65.44	80.04
<i>V. alginolyticus</i>	50.96	66.94	70.93

Nota. Reducción = (media del control – media del tratamiento) / media del control × 100. Los porcentajes se calcularon con las medias aritméticas en UFC/g.

Tabla 29

Características relevantes de la cepa Vp+418 utilizada para la preparación de la suspensión bacteriana.

Característica evaluada	Marcador molecular detectado	Resultado
Identificación de la especie	Gen toxR específico de <i>V. parahaemolyticus</i>	Positivo
Genes de toxinas asociados con AHPND	Genes <i>pirA</i> ^Δ Vp y <i>pirB</i> ^Δ Vp, evaluados individualmente y en configuración conjunta <i>pirAB</i> ^Δ Vp	Positivo
Integridad de la región toxigénica	Región conjunta de <i>pirAB</i> ^Δ Vp y segmentos adyacentes aguas arriba y aguas abajo	Positivo
Plásmido asociado con AHPND	Región del plásmido pVA1/Pvpa3-1 y los fragmentos plasmídicos evaluados	Positivo
Genes complementarios de secreción y procesamiento proteico	ORF70, ORF75, ORF78 y ORF79	Positivo
Uso experimental	Preparación del inóculo para el desafío bacteriano	Cepa utilizada

Nota. La caracterización molecular detallada de la cepa Vp+418 fue obtenida de la ficha técnica no publicada proporcionada por South Florida Farming Corp. Los resultados positivos indican la detección de las regiones genéticas evaluadas mediante PCR, pero no demuestran necesariamente su expresión ni la producción efectiva de las toxinas correspondientes.

Tabla 30

Datos agrupados por tanque de carga bacteriana postinfección y conteo total de hemocitos

Corrida	Tanque	Tratamiento	THC (×10 ⁶ células/mL)	V. <i>alginolyticus</i> (UFC/g)	V. <i>parahaemolyticus</i> (UFC/g)	V. <i>vulnificus</i> (UFC/g)	Vibrios totales (UFC/g)
1	1	C	5,81	1.680.000	12.000	0	1.692.000
1	2	T2	8,90	1.187.500	64.000	17.000	1.268.500
1	3	C	4,27	271.000	2.500	10.000	283.500
1	4	T2	11,38	103.500	36.000	30.000	169.500
1	5	T3	11,58	646.000	4.000	0	650.000
1	6	T3	7,23	635.500	1.500	0	637.000
1	7	C	4,71	1.469.000	188.000	1.500	1.658.500
1	8	T1	14,43	757.500	94.500	30.000	882.000
1	9	T1	6,57	1.431.500	0	0	1.431.500
1	10	T3	9,34	8.000	31.000	12.000	51.000
1	11	T1	11,58	79.000	19.500	27.000	125.500
1	12	T2	13,41	55.500	4.000	0	59.500
2	1	T2	7,25	324.500	2.000	41.500	368.000
2	2	C	3,10	1.303.500	265.000	1.500	1.570.000
2	3	T1	5,25	347.000	57.500	35.000	439.500
2	4	T3	5,79	229.000	27.500	5.500	262.000
2	5	T1	4,20	368.500	15.500	1.000	385.000
2	6	T3	5,12	167.500	41.000	15.500	224.000
2	7	C	4,86	595.000	16.500	0	611.500
2	8	T2	5,25	283.500	56.500	0	340.000
2	9	C	3,69	910.500	47.000	0	957.500
2	10	T2	5,70	104.500	21.000	0	125.500
2	11	T3	11,02	125.000	1.000	0	126.000
2	12	T1	7,63	71.500	23.500	26.500	121.500

Nota. La unidad experimental fue el tanque. Las cargas bacterianas corresponden al muestreo postinfección y se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de hepatopáncreas (UFC/g).
 THC = conteo total de hemocitos; C = control; T1 = bacteriófagos; T2 = aceite esencial de orégano; T3 = combinación de bacteriófagos y aceite esencial de orégano. No se detectó *V. cholerae* en las muestras analizadas.

Salinas, 10 de Julio de 2026.

CERTIFICADO

Por medio del presente, se certifica que el señor **Gianlucca Forestieri Ávila**, portador de la cédula de ciudadanía N° 0953240751, realizó el bioensayo correspondiente a su trabajo de titulación en las instalaciones de **SEMACUA – EMPAGRAN**, ubicadas en **Salinas** en la parroquia **Anconito**, sector **La Diablica**, provincia de **Santa Elena**.

Las actividades experimentales fueron desarrolladas durante el periodo comprendido entre el mes de marzo de 2026 y junio de 2026, utilizando las instalaciones, equipos y unidades experimentales disponibles en el establecimiento, de acuerdo con los requerimientos metodológicos establecidos para su investigación.

El presente certificado se emite a petición del interesado para los fines académicos y administrativos que considere pertinentes.

Salinas, 10 de Julio de 2026.

Atentamente,



JORGE ESPINOZA HENRIQUEZ
GERENTE DIVISION LABORATORIO
SEMACUA – EMPAGRAN

Figura 36 Certificado de haber realizado el experimento en Semacua