

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

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

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Erick Anthony Aveiga Perea

Miguel Vladimir Pineda Parra

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

College of Maritime Engineering and Sea Science

Application of essential oils for the disinfection in the culture of Artemia of the aquaculture industries of fish and crustaceans

CAPSTONE COURSE

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Erick Aveiga

Miguel Pineda

GUAYAQUIL - ECUADOR

2020

DEDICATORIA

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

Erick Anthony Aveiga Perea

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

Miguel Vladimir Pineda Parra

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

Erick Anthony Aveiga Perea

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

Miguel Vladimir Pineda Parra

DECLARACIÓN EXPRESA

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

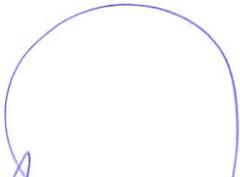


Erick Aveiga Perea



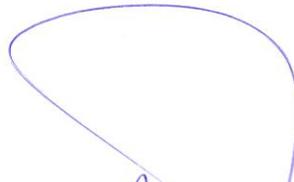
Miguel Pineda Parra

EVALUADORES



.....
Wilfrido Arguello Ph.D

PROFESOR DE LA MATERIA



.....
Wilfrido Arguello Ph.D

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

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

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

ABSTRACT

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

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

ÍNDICE

EVALUADORES	1
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción del problema	2
1.2. Justificación.	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco teórico	4
1.4.1. Importancia de la artemia en acuicultura	4
1.4.2. Desinfección de artemia	4
1.4.3. Vibrios en artemias	5
1.4.4. Mecanismo de acción de bacterias patógenas en la acuicultura.	5
1.4.5. Formación de biopelículas por <i>Vibrio</i>	6
1.4.6. Aceites esenciales y sus principales propiedades biológicas.	7
1.4.7. Emulsificación de Aceites esenciales	9
1.4.8. Métodos de extracción de aceites esenciales	9
CAPÍTULO 2	12
2. METODOLOGÍA	12
2.1. Modulación del comportamiento de Vibrios en el cultivo de <i>Artemia</i>	13
2.2. Análisis de Aceites Esenciales para desinfección de <i>Artemia</i>	14
2.2.1. Ensayo <i>in vitro</i> de evaluación de la toxicidad de los EOs	15
2.2.2. Hemograma	15
2.2.3. Cultivo celular primario de hemocitos de camarones	15
2.2.4. Exposición de hemocitos al producto evaluado	16
2.3. Descripción de los métodos de evaluación para la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.	16
2.4. Comparación de los aceites esenciales con la mayor actividad antimicrobiana.....	28
CAPÍTULO 3	30
3. RESULTADO Y ANÁLISIS	30
3.1. Comportamiento bacteriano de bacterias del género <i>Vibrio</i> en Artemias.....	30
3.2. Análisis y selección de EOs	30
3.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de los EOs seleccionados.	31

3.4. Protocolo de aplicación para la desinfección de cistos de <i>Artemias</i>	32
3.5. Análisis de costos para la aplicación de aceites esenciales	33
CAPÍTULO 4	36
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	36
BIBLIOGRAFÍA	38

ABREVIATURAS

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

SIMBOLOGÍA

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

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.1 Mecanismo de resistencia antimicrobiana de bacterianas patógenas FUENTE: Cruz, et al. 2015).....	5
Gráfico 1.2 Factores de virulencia de bacterias patógenas en sistemas acuícolas. Fuente: (Defoirdt,2014)	6
Gráfico 1.3 Vibrio Chlorae, Vibrio Pharaohaemolyticus y Vibrio vulnificus formando biopelículas mediante diferentes moléculas de expresión. Fuente: (Arunkumar et al., 2020)	7
Gráfico 1.6 Sistemas de emulsificaciones de Eos (Bakry et al., 2016).....	8
Gráfico 1.4 Mecanismo de acción de los EOs en bacterias patógenas. Fuente: (Arunkumar et al., 2020).....	8
Gráfico 1.5 Otros mecanismos de acción de los Eos en bacterias patógenas.	8
Gráfico 1.6 Sistemas de emulsificaciones de Eos (Bakry et al., 2016).....	9
Gráfico 1.8 Extracción por arrastre de vapor fuente: (Alejandro, 2013).....	10
Gráfico 1.9 Extracción de aceites esenciales mediante fluidos supercríticos.....	10
Gráfico 1.10 Representación de la extracción de aceites esenciales por microondas	11
Gráfico 2.1 Esquema del proceso de selección de EOs para la desinfección de Artemia.	12
Gráfico 3.1 Crecimiento de vibrios en 24 h post decapsulación de cistos de Artemias. 30	
Gráfico 3.2 Decapsulación de cistos de Artemias con productos químicos.....	32
Gráfico 3.3 Tanque después de la decapsulación para suministrar 10 ppm de Eo de orégano.	32
Gráfico 3.4 Composición emulsificada del Eo de orégano.	33
Gráfico 3.5 Enjuague de los nauplios de Artemia con agua filtrada por UV.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Resultados bibliográficos de los aceites esenciales usados comúnmente en acuicultura	19
Tabla 2.2 Comparación de los diferentes EOs con respecto a los criterios establecidos	29
Tabla 3.1 Calificación de los EOs con respecto a los criterios establecidos.	31
Tabla 3.2 Costos de productos químicos comúnmente usado en la decapsulación y desinfección de cistos de Artemia	34
Tabla 3.3 Precios de Eos a diferentes volúmenes con sus respectivas concentraciones.	34
Tabla 3.4 Costos de cloro y EOs para 1 Lb y 4.5 Lb de cistos de Artemias.	35

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se define como la producción de especies acuáticas en áreas confinadas con el fin de proveer alimentos a una comunidad global en constante crecimiento (FAO, 2018). Particularmente, la acuicultura de peces, crustáceos y moluscos son dependiente del uso de alimento vivo como rotíferos, copépodos, daphnia, microalgas y artemias, en etapas iniciales de desarrollo. El alimento vivo, en la mayoría de los casos, proporciona los requerimientos nutricionales básicos para el desarrollo de las especies acuáticas cultivables. Las *Artemias* uno de los principales alimento vivo usado en las industrias aportan un conveniente perfil nutricional, (50%) de proteína, (18%) de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados esenciales (PUFAs) dispensables para los peces y crustáceos en estadios iniciales(Kandathil Radhakrishnan et al., 2020). Las *Artemias* han sido consideradas como posibles vectores de contaminación bacteriana (Dhont et al., 2013; Tolomei et al., 2004), ya que está ampliamente documentado que la flora bacteriana principal de las *Artemias* pertenece al género *Vibrio* (Conceição et al., 2010; Høj et al., 2009; Tolomei et al., 2004), y que durante el cultivo de *Artemias* los vibrios pueden alcanzar altas concentraciones (10^8 UFC/ml) en 24h de cultivo (Grotkjær et al., 2016; Haché & Plante, 2011). desencadenando procesos infecciones asociandose a diferentes enfermedades bacterianas, provocando pérdidas económicas significativas en la industria acuícola (Ina-Salwany et al., 2019; Mohamad et al., 2019).

Comunmente la desinfección de los cistos de *Artemias* es mediante el uso de productos químicos que también son usados para la decapsulación (Høj et al., 2009; Pati & Belmonte, 2003). Además, antibióticos como el florfenicol han sido utilizado para la desinfección de cistos, en los países que se permite su uso en la acuicultura (Interaminense et al., 2014), perjudicando la flora bacteriana natural y una subsecuente posibilidad de generación de enfermedades emergentes (Saharan et al., 2020). Entre las prácticas amigables, el uso de productos naturales como los aceites esenciales (EOs por sus siglas en inglés) se ha constituido en una de las alternativas eficaces, (Aleksic Sabo & Knezevic, 2019; De FreitasSouza et al., 2019), destacando la actividad antimicrobiana a tal punto de ser considerados como remplazo de los antibióticos (Aleksic Sabo & Knezevic, 2019). Se han registrado la actividad antimicrobiana de

aceites esenciales contra bacterias patógenas de sistemas acuáticos mejorando el sistema inmune de las especies cultivadas, además de mejorar la tasa de supervivencia(Domínguez-Borbor et al., 2020a).

1.1. Descripción del problema

Se ha identificado que durante la eclosión y la desinfección de cistos de *Artemia* existen altas tasas de concentraciones bacterianas pertenecientes al género *Vibrio*. Convirtiéndose en un vector de contaminación bacteriana para el cultivo y por ende desencadenando procesos infecciosos aumentando las tasas de mortalidad además de las pérdidas económicas significativas. Cabe resaltar que durante el proceso de decapsulación de *Artemias* se hace uso de productos químicos con la finalidad de debilitar el corion y de desinfectar los cistos. Sin embargo, ciertos países han empleado antibióticos para la desinfección de quistes de *Artemia*, contribuyendo a la resistencia bacteriana lo que conduce a la generación de bacterias multirresistentes que pueden convertirse en un serio riesgo para la salud pública.

1.2. Justificación.

Los vibrios son difíciles de controlar en los sistemas de producción, debido a que son omnipresentes en los sistemas acuáticos, y pueden formar biopelículas, que son estructuras bien organizadas donde excretan metabolitos secundarios e intercambian genes a través de la transferencia horizontal de genes, demostrando que bajo esta estructura son mucho más resistentes que las bacterias planctónicas(Arunkumar et al., 2020). Sumado a esto, estudios han evidenciado que varias cepas de vibrios como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* mostraron una resistencia múltiple a los antibióticos como tetraciclina, ampicilina, penicilina, entre otros.(Mok et al., 2019; Rollon, Hara, Kayal, et al., 2020; Perretta et al., 2019).La inhibición microbiana por parte de los EO_s ha demostrado eficacia frente a diferentes bacterias patógenos comunes en la industria alimentaria (De FreitasSouza et al., 2019; Luis et al., 2019;). La actividad antimicrobiana de los EO se debe a la diversidad de compuestos tales como, fenólicos, alcaloides, aldehídos, cetonas o ésteres, que pueden lisar la pared celular, bloquear la síntesis de proteínas, la síntesis de ADN, inhibir la señalización del quórum sensing (QS) de bacterias entre otros mecanismos(Galvão et al., 2012; Raut & Karuppayil, 2014; Saad et al., 2013).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

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

1.3.2. Objetivos específicos

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

1.4. Marco teórico

1.4.1. Importancia de la artemia en acuicultura.

La producción de la industria acuícola para el 2016 fue de 80 MT de peces comestibles con un estimado de 231 600 millones de USD, mientras la producción de crustáceos alcanzó los 7,9 MT con un estimado de 57 100 millones de USD, según Fao, (2018) se estima que la producción de *Artemia* para uso como alimento vivo en la industria acuícola es alrededor de 1000 – 3000 toneladas anuales de cistos de *Artemias*, supliendo a la industria en un 90% de la producción. Los cistos de *Artemias* en su gran mayoría provienen del gran lago salado de Utah (Acuicultura et al., 2018; Moraga et al., 2014). La artemia son organismos filtradores no selectivos que necesitan de 24 horas de condiciones ideales para su activación y desarrollo (Beardmore et al., 2002). La artemia tiene la capacidad de resistir altas concentraciones de salinidad, sobrevive a la variación de composición iónica en el agua, extremas temperaturas, es resistente a bajas concentraciones de oxígeno (Camara, 2020), y por su característica de criptobiósis puede ser almacenada por largos periodos de tiempo hasta el momento en que se requiera. (Kandathil Radhakrishnan et al., 2020) .

1.4.2. Desinfección de artemia

Durante la eclosión, los cistos que no eclosionaron y los restos del corión, generan riesgos patológicos puesto que el compuesto principal del corion es la glicerina lo que propicia la proliferación de vibrios (Nathan & Scobell, 2012). Según Negret Redondo et al., (2008) la carga de *vibrio* en artemia, en el medio natural puede llegar hasta concentraciones de 10^7 UFC/mL, específicamente *Vibrio fluvialis*, *Vibrio cholerae*, y *Vibrio alginolyticus*(Dhont et al., 2013; Giarma et al., 2017). El proceso de decapsulación comprende el uso de compuestos químicos tales como la formalina, hipoclorito de sodio (NaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) , permanganato de potasio (KMnO₄) y Sulfato de cobre (CuSO₄), los mismos que en ocasiones son usados para la desinfección (Pati & Belmonte, 2003). Estos compuestos han brindado algunos beneficios como incrementar la tasa de eclosión, un ahorro de energía del nauplio durante la eclosión y una disminución de bacterias en los cistos de artemia. Así mismo, para la desinfección de los nauplios eclosionados, se han usado antibióticos como el cloranfenicol (30mg/L) (Gomez-Gil et al., 1998; Interaminense et al., 2014). En el estudio de Jo et al., (2020) la

resistencia bacteriana (Gráfico 1.1) fue evidenciada por parte de la cepa de *V. Parahaemolyticus* específicamente a los antibióticos, vancomicina (100%), ampicilina (97,4%), estreptomycinina (73,7%), cefotaxima (71,1%) y kanamicina (55,3%).

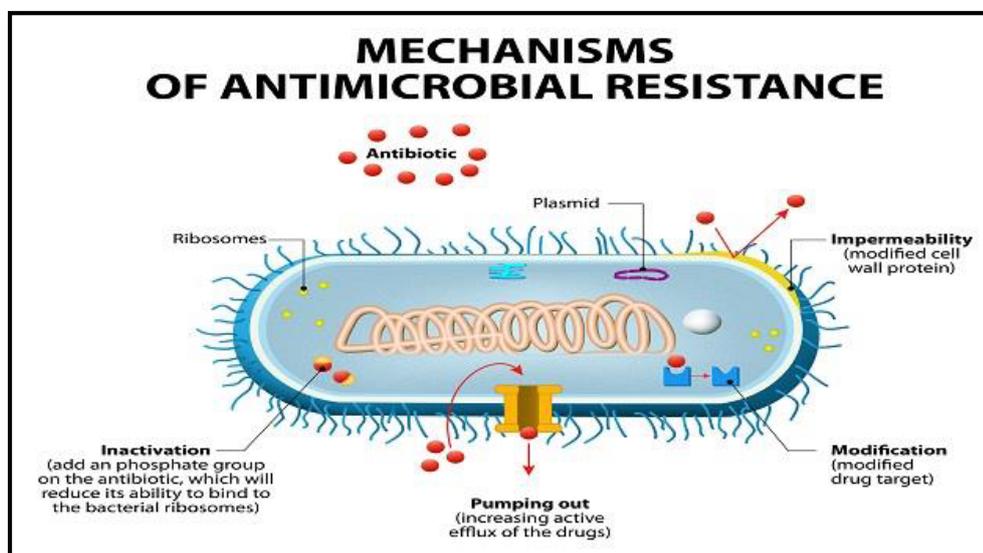


Gráfico 1.1 Mecanismo de resistencia antimicrobiana de bacterianas patógenas
FUENTE: Cruz, et al. 2015)

1.4.3. Vibrios en artemias

En el estudio de Austin et al. (1982), demostraron que la artemia trae consigo bacterias en la superficie de los cistos que resisten el proceso de almacenamiento y durante la eclosión aumenta hasta concentraciones de 10^7 UFC/mL. Las bacterias Gram negativas relacionadas al cultivo de *Artemias* que son responsables de muchas de las enfermedades que se ven en los cultivos acuícolas, son las del género *Vibrio*, además existen otros géneros como *Aeromona*, *Pseudomona*, *Tenacibaculum*, *Photobacterium* (Dhont et al., 2013; Sorgeloos et al., 2001).

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

Según Suárez-Medina, (2015) se conoce que *Vibrio* spp. es causante de varias enfermedades en los cultivos acuícolas,. Por ejemplo, en el caso del camarón blanco (*P. vannamei*), las especies que comúnmente causan enfermedades en el cultivo son: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. vulnificus* afectando todas las etapas del cultivo, pudiendo causar mortalidades hasta del 100% mediante sus diferentes factores de virulencia (Gráfico 1.2). Se ha comprobado que las bacterias están presentes en el intestino y las branquias.

En un estudio realizado por Navais Barranco et al (2013), experimentalmente se infectaron varios peces con bacterias , y se identificó la presencia bacteriana en los diferentes órganos, concluyendo que la infección se da partir de la diseminación desde el tracto intestinal. Algunas bacterias patógenas están presentes en el organismo del animal sin ser detectadas, convirtiendo a los animales en portadores de la bacteria, y ocasionando infecciones por medio de sus heces .

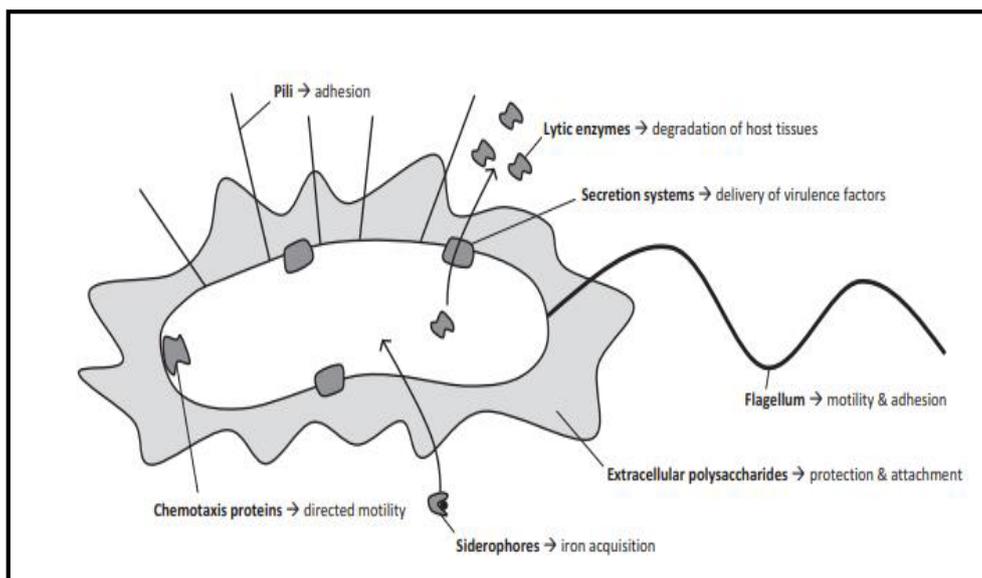


Gráfico 1.2 Factores de virulencia de bacterias patógenas en sistemas acuícolas.

Fuente: (Defoirdt,2014)

1.4.5. Formación de biopelículas por *Vibrio*

La biopelícula es un patrón de unión de microorganismos incrustados en sustancias poliméricas extracelulares producidas por las mismas bacterias para su protección, estas se producen tanto en superficies vivas como no vivas como se muestra en el gráfico 1.3. Las biopelículas desarrolladas son estructuras bien organizadas con una fuerte adherencia al sustrato, donde excretan metabolitos secundarios, materiales de desecho y también intercambian los genes a través de la transferencia horizontal de genes, así mismo en el modo de biopelícula, las células bacterianas son mil veces más resistentes que las células planctónicas, lo que dificulta su erradicación de las superficies del huésped(Defoirdt, 2014). Además, las células de biofilm son más resistentes a altas temperaturas y bajo pH(Arunkumar et al., 2020).

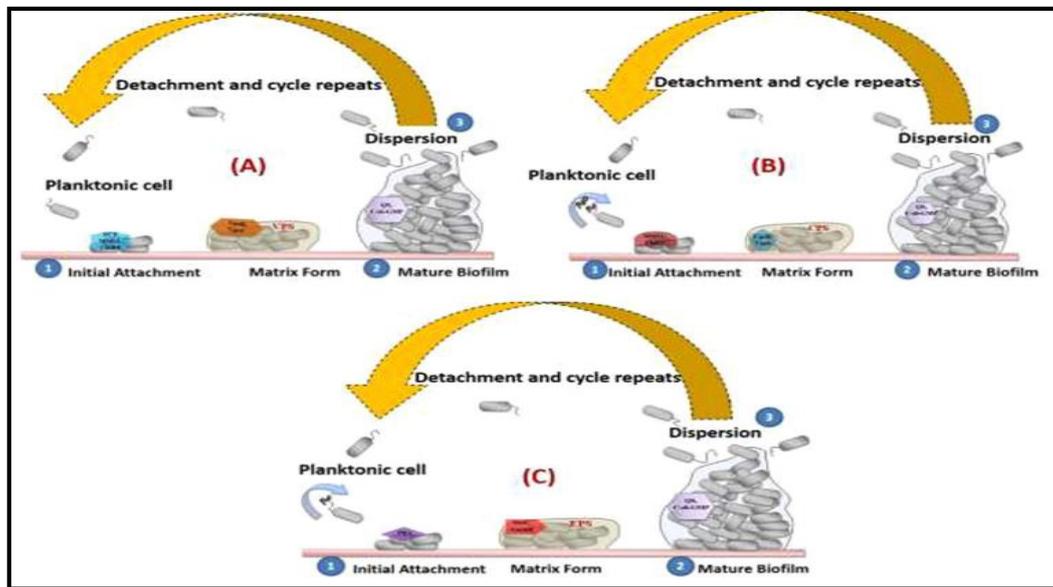


Gráfico 1.3 Vibrio Cholerae, Vibrio Parahaemolyticus y Vibrio vulnificus formando biopelículas mediante diferentes moléculas de expresión. Fuente: (Arunkumar et al., 2020)

1.4.6. Aceites esenciales y sus principales propiedades biológicas.

Los aceites esenciales son extractos vegetales segregado por células especiales que se encuentran en hojas, flores, madera, raíces o semillas. Estos extractos son bien complejos en cuanto a su composición química, y pueden contener hasta más de 300 diferentes compuestos (Peredo, Luna, Palou, 2009), pertenecen a varias clases químicas: alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres u óxidos, aldehídos, cetonas, aminas, amidas, fenoles, heterociclos, y principalmente los terpenos, de allí radica sus propiedades bioactivas. La actividad antimicrobiana se debe principalmente a los compuestos fenólicos por lo que dicha actividad está asociada a plantas con presencia de estos componentes principales, tales como, cinamaldehído, citral, carvacrol, eugenol y timol (Alibi et al., 2020; Ezzat Abd El-Hack et al., 2016; Friedman, 2017;), ya que han mostrado una actividad significativa contra bacterias patógenas gram positiva y gram negativa en la producción de especies acuáticas además de especies terrestres. La hidrofobicidad es una característica importante de los aceites esenciales, ya que le permite separar los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, lo cual la hace más permeable, provocando la pérdida de iones y otras moléculas celulares (Ultee et al., 2002). El uso de aceites esenciales es debido a su actividad antibacteriana, ya que inhibe el crecimiento de la bacteria (bacteriostática) causando efectos adversos o la muerte celular de la bacteria (bactericida) (Tariq et al., 2019), cada compuestos tiene un mecanismo de acción antibacteriana implicando una serie de reacciones bioquímicas en el interior de las células bacterianas como se muestra en la figura 1.5 – 1.6.

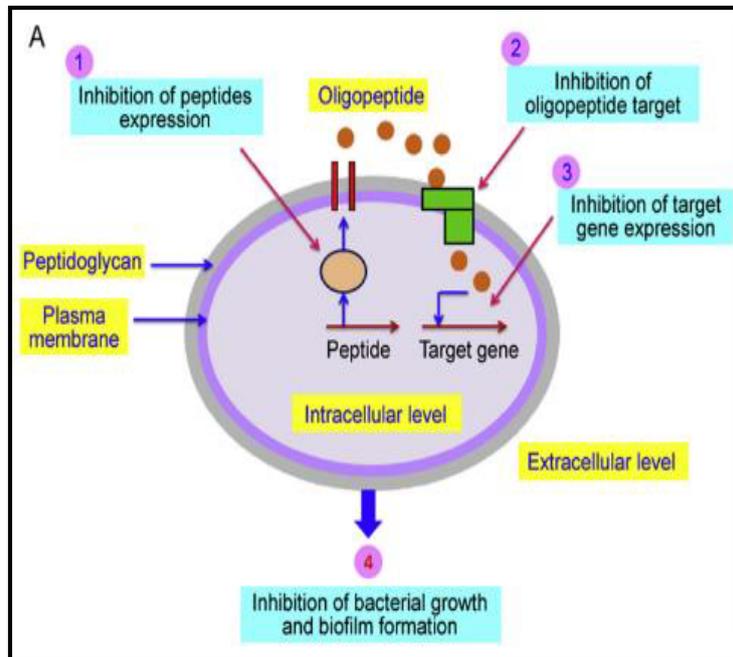


Gráfico 1.4 Otros mecanismos de acción de los Eos en bacterias patógenas.

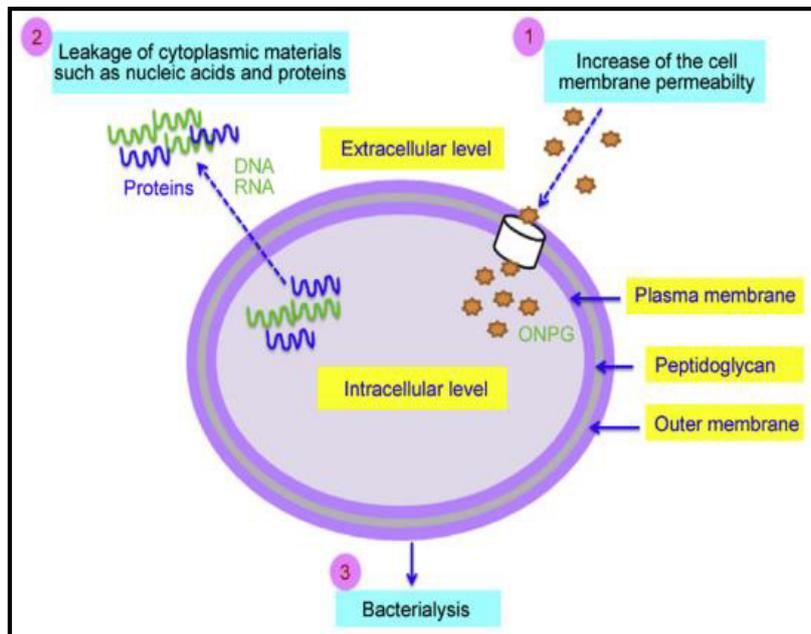


Gráfico 1.6 Mecanismo de acción de los EOs en bacterias patógenas.

Fuente: (Arunkumar et al., 2020)

1.4.7. Emulsificación de Aceites esenciales

El objetivo principal de la encapsulación es el revestir el Eos con materiales que posean una pared adecuada de tal manera que proteja los componentes principales del los EOs, a la exposición al oxígeno, las altas temperaturas y la luz solar, aumentando su estabilidad, mejorando sus diferentes propiedades de bioactividad y así mismo aumentando su especificidad(Bakry et al., 2016; Delshadi et al., 2020; Rodríguez et al., 2016). La emulsificación es uno de los métodos más comunes de encapsulación que se ha logrado mediante el proceso de homogeneización de dos líquidos inmiscibles de aceite(O) y agua(W), permitiendo diferentes mezclas con el fin de evitar la volatilidad como se muestra en el gráfico 1.7.

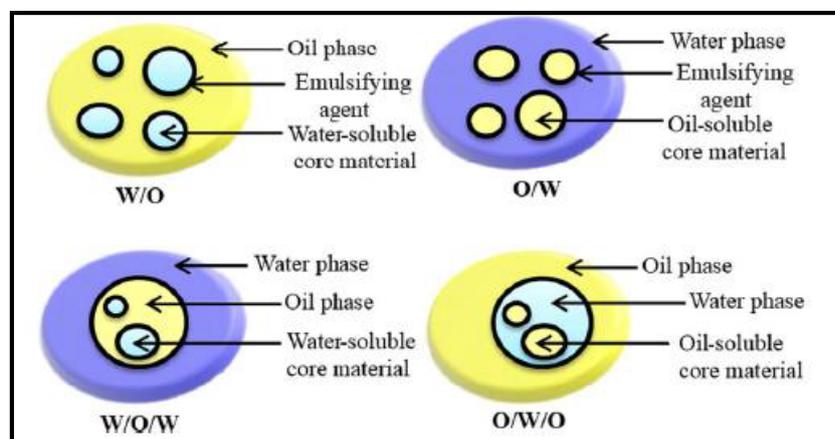


Gráfico 1.7 Sistemas de emulsificaciones de Eos (Bakry et al., 2016)

1.4.8. Métodos de extracción de aceites esenciales

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

1.4.8.1. Destilación por arrastre de vapor. - Se lleva a cabo con la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por agua y otros componentes “no volátiles”, se dan 2 fases durante el proceso de extracción (orgánica y acuosa) como se muestra en la figura 1.8. Este método de extracción es sencillo y de bajo costo, la desventaja es que requiere largos periodos de tiempo y presenta un bajo rendimiento de calidad.

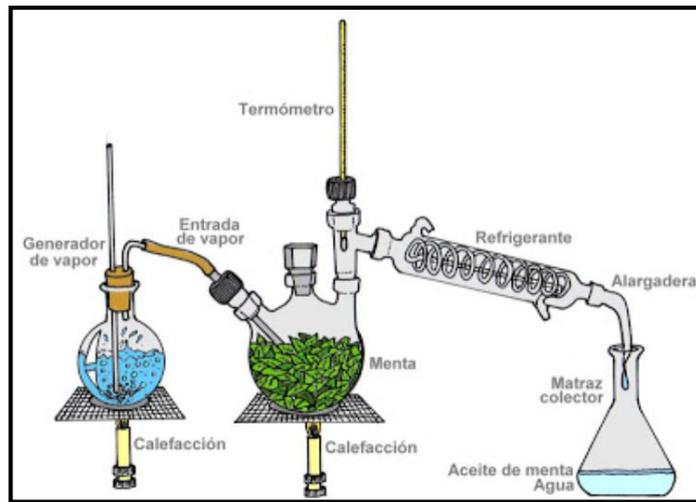


Gráfico 1.8 Extracción por arrastre de vapor fuente: (Alejandro, 2013)

1.4.8.2. Extracción con disolventes. – La muestra seca y molida se pone en interacción con disolventes orgánicos como alcohol y cloroformo, que solubilizan la esencia, pero también se solubilizan otras sustancias como grasas y cera, se obtiene “oleorresina” (extracto impuro), este método se lo realiza a escala de laboratorio, ya que industrialmente es costoso por el valor comercial de los disolventes .

1.4.8.3. Extracción por fluidos supercríticos. - Se usa un fluido llamado supercrítico como solvente, el más comúnmente usado el dióxido de carbono con una temperatura crítica proximadamente de 31°C , luego se somete a presión, por medio de un aparato de extracción con CO_2 como se muestra en la figura 1.9 . La principales ventajas es el tiempo de extracción es menor, y tiene mayor rendimiento y su desventaja es que pueden extraer

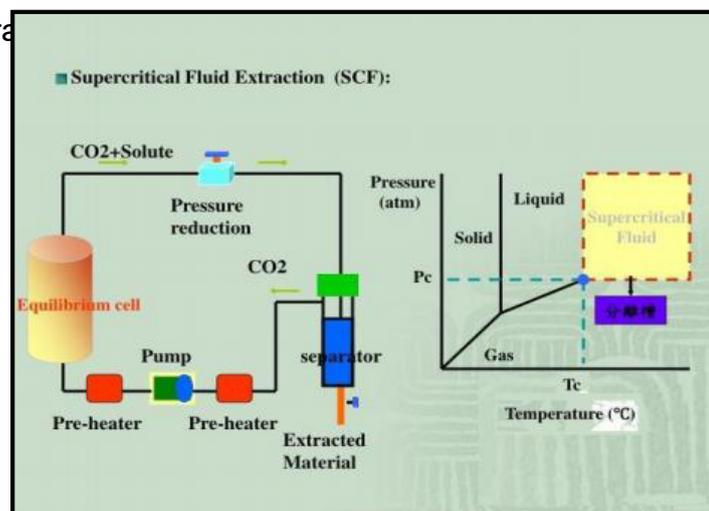


Gráfico 1.9 Extracción de aceites esenciales mediante fluidos supercríticos

1.4.8.4. Extracción por medio de microondas. – Este método es realizado en conjunto con la hidro-destilación, consiste en provocar que la muestra se caliente uniformemente por medio de las ondas electromagnéticas, de esta manera se produce la evaporación de los componentes volátiles, que luego de ser condensados se filtran para obtener el aceite esencial como se muestra en la figura 1.10. La ventaja de usar este método es la reducción del tiempo y del consumo de energía, y su principal desventaja involucra el uso de disolventes orgánicos lo que baja el rendimiento de los compuestos activos

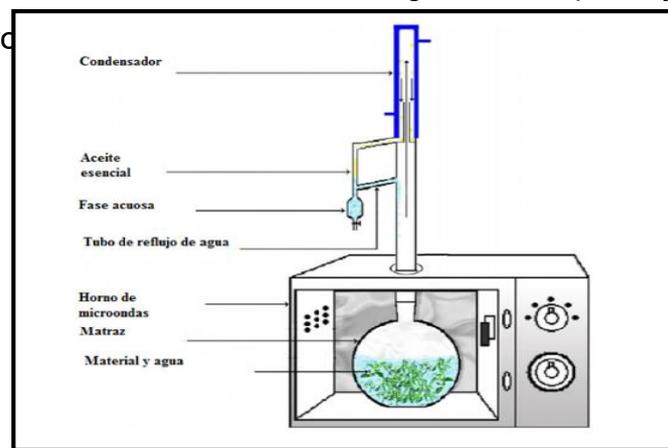


Gráfico 1.10 Extracción de aceites esenciales por microondas

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

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

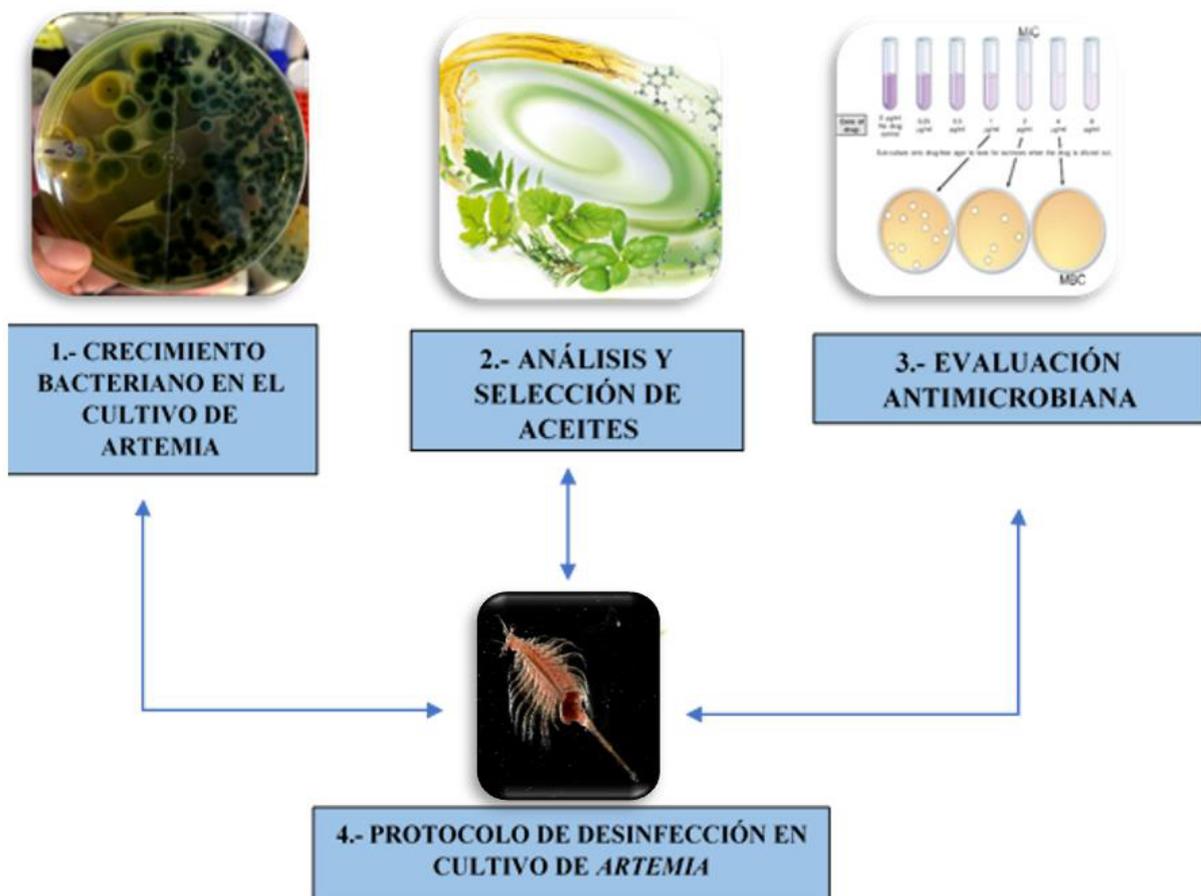


Gráfico 2.1 Esquema del proceso de selección de EOs para la desinfección de Artemia.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2. Hemograma

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

2.2.3. Cultivo celular primario de hemocitos de camarones

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

equilibrada de Hank modificada (HBSS), que contiene HBSS 1x, 2.6 g⁻¹ HEPES, NaCl 85 mM, Ca²⁺ + 12 mM y Mg²⁺ + 26 mM, pH 7.2 (MHBSS-3), se filtró en un filtro de 0.22 µm². para luego incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente para la adherencia de de los hemocitos. Se preparó el MHBSS 30 minutos antes de ser usado.

- Eliminamos los sobrenadantes e inmediatamente se depositaron 50 µl/pocillo de MHBSS-2 que contiene HBSS 1X, Ca²⁺ + 6 mM y Mg²⁺ + 12 mM (pH 7.2).

2.2.4. Exposición de hemocitos al producto evaluado

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

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

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

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

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

La inhibición de biopelículas se realizó mediante la técnica descrita por (Domínguez-Borbor et al., 2020b) para cada cepa de *Vibrio* se realizaron suspensiones bacterianas (1×10^6 UFC mL^{-1}), distribuyendo 20 μl de ésta suspensión a cada pocillo en la microplaca de 96 pocillos, además se añadió 180 μL de LBb al 2% NaCl a diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) de cada Eos. Un control se realizó mediante la suspensión bacteriana + LBb + 2% NaCl sin agregar EO, con seis réplicas para cada concentración. Además, se incluyó un antibiótico comercial (oxitetraciclina) a una concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 36 h. Luego, se eliminaron las células planctónicas, y las biopelículas generadas en los pocillos para lo cual se hizo un doble lavado usando 200 μl de PBS a un pH de 7,2. Las biopelículas fueron expuestas a 50 ° C durante 30 min y se tiñeron con 220 μL de 0.1% cristal violeta (CV) en cada pocillo en un período de 15 min. Finalmente se enjuagaron las placas para eliminar el exceso de tinte y se dejaron a temperatura ambiente para permitir el secado. El CV impregnado se eliminó mediante la solubilización con 220 μl de etanol, del producto solubilizado se distribuyó 150 μL de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos, leyéndose a una densidad óptica de 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los porcentajes de importancia se asignarán garantizando el efecto antimicrobiano del aceite esencial seleccionado, es por eso que los criterios de porcentaje de compuestos activos antimicrobianos y amplio espectro de bacterias tienen el mayor porcentaje, ya que son los principales aspectos que aseguran el efecto buscado. Seguido a estos criterios, la disponibilidad también tiene un mayor porcentaje de importancia con el fin de evitar gastos en importaciones del producto lo que puede elevar costos de producción

en la desinfección de Artemia. Por último los criterios de halo de inhibición y concentración mínima inhibitoria tienen el menor porcentaje por lo que al tener los mayores o el mayor compuesto antimicrobiano éstos tendrán excelentes resultados.

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

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

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

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

CAPÍTULO 3

3. RESULTADO Y ANÁLISIS

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

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

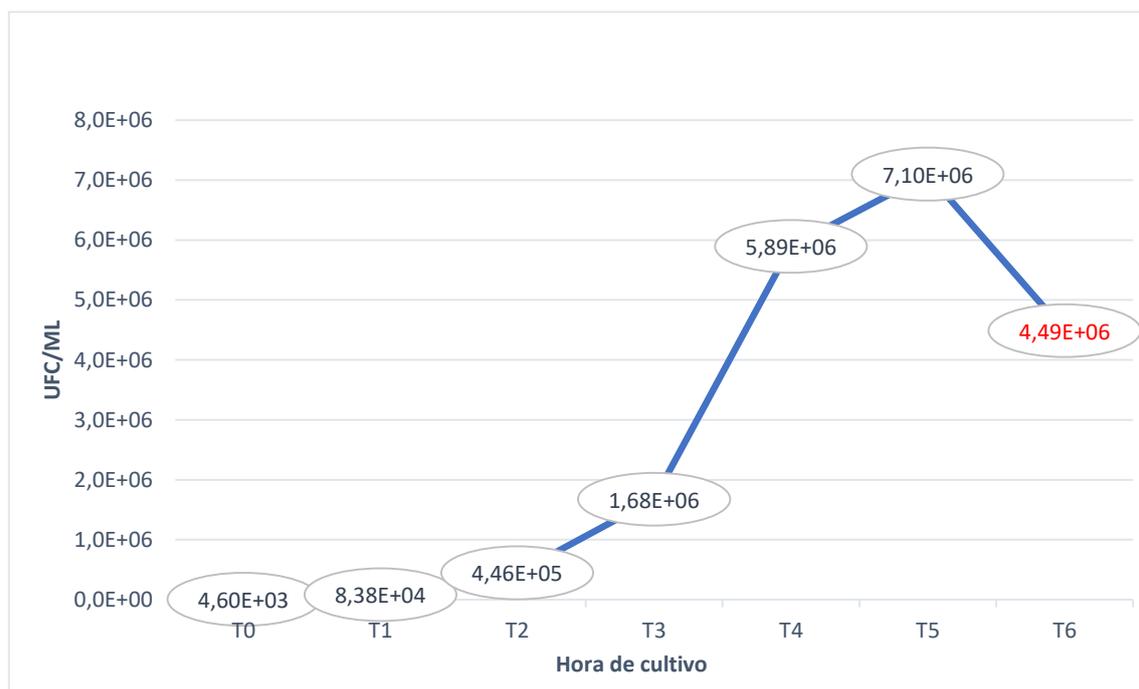


Gráfico 3.1 Crecimiento de vibrios en 24 h post decapsulación de cistos de *Artemias*.

3.2. Análisis y selección de EOs

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

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

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

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

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

3.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de los EOs seleccionados.

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

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

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

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



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

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



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

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

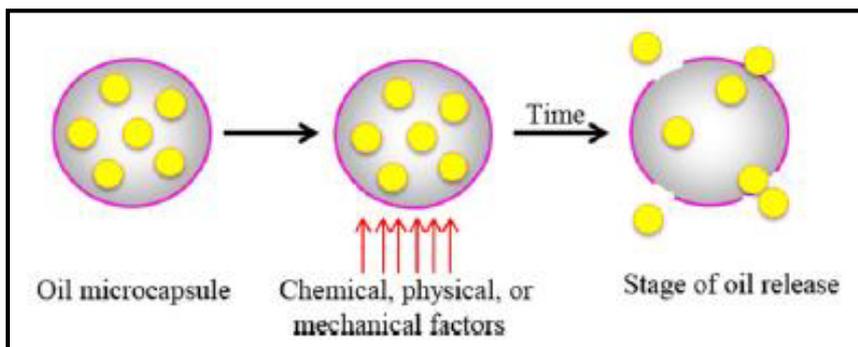


Gráfico 3.4 Composición emulsificada del Eo de orégano.

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



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

3.5. Análisis de costos para la aplicación de aceites esenciales

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

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

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

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

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

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

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

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

VI= volumen total del tanque de *Artemias*

Co= Concentraciones del Eo suministrado

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

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

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

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

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

Bibliografía

- Abdelkhalik, N. K., Risha, E., El-Adl, M. A., Salama, M. F., & Dawood, M. A. O. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of clove oil against *Streptococcus iniae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect on hepatic hepcidin expression. *Fish and Shellfish Immunology*, *104*, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.064>
- Acuicultura, I. D. E., La, T., & Csic, S. A. L. (2018). *Artemia (A . franciscana) como alimento vivo o congelado para acuariofilia Estudio de viabilidad de la producción de biomasa adulta de Artemia (A . franciscana) como alimento vivo o congelado para acuariofilia*. 1–57.
- Ahmed, A. F., Attia, F. A. K., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, *8*(3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004>
- Ahmed, H. A., El Bayomi, R. M., Hussein, M. A., Khedr, M. H. E., Abo Remela, E. M., & El-Ashram, A. M. M. (2018). Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. *International Journal of Food Microbiology*, *274*(November 2017), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.013>
- Aleksic Sabo, V., & Knezevic, P. (2019). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Industrial Crops and Products*, *132*(November 2018), 413–429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.051>
- Alibi, S., Ben Selma, W., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., Navas, J., & Ben Mansour, H. (2020). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*, *68*(2), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.01.001>
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., & Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*, *94*, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.029>
- Austin, B., & Allen, A. (1982). Microbiology of laboratory-hatched. *Elsevier Scientific*, *26*.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L.

- (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L. C., Ilboudo, A. J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C., & Dicko, M. H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, *18*(12), 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>
- Beardmore, J. A., Clegg, J. S., & Sorgeloos, P. (2002). *A R T E M I A : B a s i c a n d A p p l i e d B i o l o g y*. 1–36.
- Bharti, P., Bai, S., Seasotiya, L., Malik, A., & Dalal, S. (2012). Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of ten aromatic plants against selected bacteria. *International Journal of Drug Development and Research*, *4*(4), 342–351.
- Camara, M. R. (2020). After the gold rush: A review of Artemia cyst production in northeastern Brazil. *Aquaculture Reports*, *17*(November 2019), 100359. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100359>
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. Ben, Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. In *Phytotherapy Research* (Vol. 21, Issue 6, pp. 501–506). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>
- Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, *77*(1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00273-2)
- Charai, M., Mosaddak, M., & Faid, M. (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. Compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, *8*(6), 657–664. <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9701036>
- Cíсарová, M., úrgeová, E., Hleba, L., Charousová, I., Božik, M., Klouček, P., & Maliar, T. (2018). Inhibition effects of some antimicrobial agents from *Salvia officinalis* L. on the growth of selected gram-negative and gram-positive bacterial strains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *8*(3), 960–964.

- <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018-19.8.3.960-964>
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, *41*(5), 613–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, *29*(2), 130–135. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x>
- De FreitasSouza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., & Mancera, J. M. (2019). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. *Frontiers in Physiology*, *10*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- Defoirdt, T. (2014). Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *6*(2), 100–114. <https://doi.org/10.1111/raq.12030>
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1–2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00734-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00734-6)
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A. G., Barba, F. J., & Williams, L. L. (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.004>
- Derwish, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A., & Taouil, R. (2010). phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of EOs of *O. vulgare* from Morocco. In *American-Eurasian Journal of scientific Research* (Vol. 5, Issue 2, pp. 120–129).
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.157>
- Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., & Rodríguez, J. A. (2018). A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, *5*, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010>

- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020a). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529(June), 735639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020b). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Giovanelli, S., Rocchigiani, G., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2016). Antibacterial and antifungal activity of essential oils against some pathogenic bacteria and yeasts shed from poultry. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(4), 302–309. <https://doi.org/10.1002/ffj.3318>
- Ekici, S., Diler, Ö., Didinen, B. I., & Kubilay, A. (2011). Antibacterial activity of essential oils from medicinal plants against bacterial fish pathogens. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 17(SUPPL. A). <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.3224>
- Elmahdi, S., DaSilva, L. V., & Parveen, S. (2016). Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 57, 128–134. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2016.02.008>
- Esencial, A., Cinco, S., Del, E., & Vibrio, G. (2007). *Efecto antimicrobiano del orégano mexicano* (. 30(01), 261–267.
- Ezzat Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Zorriehzaha, J., & Adel, M. (2016). Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 365–382. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1153002>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. <https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO>
- Friedman, M. (2017). Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10406–10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>
- Fundación para la Innovación Agraria. (2009). *Resultados y Lecciones en Producción del Crustáceo Artemia en Salinas*. <https://www.opia.cl/static/website/601/articles->

75615_archivo_01.pdf

- Galvão, L. C. de C., Furletti, V. F., Bersan, S. M. F., da Cunha, M. G., Ruiz, A. L. T. G., Carvalho, J. E. de, Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., Figueira, G. M., Teixeira Duarte, M. C., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2012). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 751435. <https://doi.org/10.1155/2012/751435>
- Giarma, E., Amanetidou, E., Toufexi, A., & Touraki, M. (2017). Defense systems in developing *Artemia franciscana* nauplii and their modulation by probiotic bacteria offer protection against a *Vibrio anguillarum* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 66, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.008>
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M. A., Abreu-Grobois, F. A., & Roque, A. (1998). Bioencapsulation of Two Different *Vibrio* Species in Nauplii of the Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 6).
- Grotkjær, T., Bentzon-Tilia, M., D'Alvise, P., Dierckens, K., Bossier, P., & Gram, L. (2016). *Phaeobacter inhibens* as probiotic bacteria in non-axenic *Artemia* and algae cultures. *Aquaculture*, 462, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.001>
- H. A. Peredo, Luna, E. Palou, A. L. (2009). *Aceites esenciales - Métodos de extracción* (pp. 24–32). 2009.
- Haché, R., & Plante, S. (2011). The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain) and *Artemia* (*Artemia salina* strain *Franciscana*). *Aquaculture*, 311(1–4), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.034>
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.003>
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., & Ksouri, R. (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2186–2192. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.044>

- He, Q., Gong, B., He, J., & Xiao, K. (2019). A novel superchilling storage-ice glazing (SS-IG) approach using anti-oxidative and antimicrobial essential oil (EO) for freshness-keeping of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, *500*, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.022>
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *70*, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- Høj, L., Bourne, D. G., & Hall, M. R. (2009). Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture*, *293*(3–4), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.024>
- Huang, Z., Liu, X., Jia, S., & Luo, Y. (2017). Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. *Food Control*, *82*, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.017>
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, *31*(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Interaminense, J. A., Ferreira Calazans, N., do Valle, B. C., Lyra Vogeley, J., Peixoto, S., Soares, R., & Lima Filho, J. V. (2014). *Vibrio* spp. control at brine shrimp, artemia, hatching and enrichment. *Journal of the World Aquaculture Society*, *45*(1), 65–74. <https://doi.org/10.1111/jwas.12096>
- Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I., & Ristic, M. (2012). In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*, *25*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.019>
- Jo, S. B., Shin, C. H., Shin, Y. J., Kim, P. H., Park, J. il, Kim, M., Park, B., & So, J. S. (2020). Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish. *Marine Pollution Bulletin*, *156*, 111246. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111246>
- Jouki, M., Yazdia, F. T., Mortazavia, S. A., Koocheki, A., & Khazaei, N. (2014). Effect of

- quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.001>
- Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S., Klůga, A., Tokár, M., Kluz, M., & Ivanišová, E. (2017). The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8), 1108–1116. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.005>
- Kandathil Radhakrishnan, D., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., & Thazhakot Vasunambesan, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
- Kuźma, Ł., Kalemba, D., Różalski, M., Różalska, B., Więckowska-Szakiel, M., Krajewska, U., & Wysokińska, H. (2009). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from *Salvia sclarea* Plants Regenerated in vitro. *Molecules*, 14(4), 1438–1447. <https://doi.org/10.3390/molecules14041438>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lee, S., Najiah, M., Wendy, W., & Nadirah, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China*, 3(3), 332–336. <https://doi.org/10.1007/s11703-009-0052-8>
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1–4), 201–220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)
- Liu, H., Wang, Y., Cao, J., Jiang, H., Yao, J., Gong, G., Chen, X., Xu, W., & He, X. (2020). Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 515(August 2019), 734578. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734578>
- Luis, A. I. S., Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., & Fraceto, L. F. (2019). Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control.

- Reviews in Aquaculture*, 11(1), 119–132. <https://doi.org/10.1111/raq.12229>
- Mahboubi, M. (2020). Clary sage essential oil and its biological activities. In *Advances in Traditional Medicine* (pp. 1–12). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00420-x>
- Majewska, E., Kozłowska, M., Gruczynska-Sekowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 327–341. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113152>
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x>
- McGaw, L. (2013). Use of Plant-Derived Extracts and Essential Oils against Multidrug-Resistant Bacteria Affecting Animal Health and Production. In *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00013-6>
- McGimpsey, J. A., Douglas, M. H., Van Klink, J. W., Beauregard, D. A., & Perry, N. B. (1994). Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal*, 9(6), 347–352. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730090613>
- Miladi, H., Slama, R. Ben, Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 05(06), 729–739. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.56090>
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Alsaari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512(May). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>
- Mok, J. S., Ryu, A., Kwon, J. Y., Park, K., & Shim, K. B. (2019). Abundance, antimicrobial resistance, and virulence of pathogenic *Vibrio* strains from molluscan shellfish farms along the Korean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110559. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110559>
- Moraga, P., Ávila, R., & Vilaxa, A. (2014). *Salinidad y temperatura óptimas para*

- reproducción ovípara y desarrollo de Artemia franciscana Salinity and temperature optimum for oviparous reproduction and development of Artemia franciscana*. 33, 85–92.
- Nathan, A. J., & Scobell, A. (2012). How China sees America. *Foreign Affairs*, 91(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Navais Barranco, R. (2013). *Genes de Yersinia ruckeri relacionados con el proceso infeccioso y con el factor sensible al calor” (HSF)*.
- Negret Redondo, P., Monroy Dosta, C., & Romero Jarero, J. (2008). Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (artemia, daphnia, tenebrio y tubifex) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Veterinaria Mexico*, 39(3), 255–268.
- Nyoman Semadi Antara, Dwi Ayu Kirani Paramita, Anak Agung Duwipayana, I. B. W. G. (2016). Inhibitory Activity Of Lemongrass Essential Oil Against Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus, And Vibrio Cholera. *Anali. Chim. Acta*, 945(August), 47–56.
- Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>
- Ooi, L. S. M., Li, Y., Kam, S. L., Wang, H., Wong, E. Y. L., & Ooi, V. E. C. (2006). Antimicrobial activities of Cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb Cinnamomum cassia Blume. *American Journal of Chinese Medicine*, 34(3), 511–522. <https://doi.org/10.1142/S0192415X06004041>
- Ozogul, Y., Kuley Boğa, E., Akyol, I., Durmus, M., Ucar, Y., Regenstein, J. M., & Köşker, A. R. (2020). Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. *Food Bioscience*, 36, 100635. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100635>
- Partovi, R., Talebi, F., Boluki, Z., & Sharifzadeh, A. (2019). *Evaluation of Antimicrobial Activity of Cymbopogon citratus Essential Oil Alone and in Combination with Origanum majorana and Caryophyllus aromaticus Essential Oils against Some Foodborne Bacteria*. 7(2), 60–67. <https://doi.org/10.15171/ijep.2019.14>
- Pati, A. C., & Belmonte, G. (2003). Disinfection efficacy on cyst viability of Artemia franciscana (Crustacea), Hexarthra fennica (Rotifera) and Fabrea salina (Ciliophora). *Marine Biology*, 142(5), 895–904. <https://doi.org/10.1007/s00227-003->

- Patterson, J. E., McElmeel, L., & Wiederhold, N. P. (2019). In vitro activity of essential oils against gram-positive and gram-negative clinical isolates, including carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(12), 1–4. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz502>
- Perretta, A., Antúnez, K., & Zunino, P. (2019). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 4–8. <https://doi.org/10.29155/vet.55.211.1>
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., & Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 15–19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1022>
- Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J. M., Michel, G. M., & Baccou, J. C. (1995). Analysis of the essential oil of wild oregano from martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2), 165–173. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698492>
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. In *Industrial Crops and Products* (Vol. 62, pp. 250–264). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>
- Russo, M., Galletti, G. C., Bocchini, P., & Carnacini, A. (1998). Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3741–3746. <https://doi.org/10.1021/jf980087w>
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269–279. <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>
- Saharan, V. V., Verma, P., & Singh, A. P. (2020). High prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* isolated

- from fish samples in India. *Aquaculture Research*, 51(3), 1200–1210.
<https://doi.org/10.1111/are.14471>
- Sneha, K. G., Anas, A., Jayalakshmy, K. V., Jasmin, C., Das, P. V. V., Pai, S. S., Pappu, S., Nair, M., Muraleedharan, K. R., Sudheesh, K., & Nair, S. (2016). Distribution of multiple antibiotic resistant *Vibrio* spp across Palk Bay. *Regional Studies in Marine Science*, 3, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.11.004>
- Snoussi, M., Hajlaoui, H., Noumi, E., Usai, D., Sechi, L., Zanetti, S., & Bakhrouf, A. (2008). In-vitro anti- *Vibrio* spp . activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 3071–3076.
<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9811-6>
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P. (2001). *Use of the brine shrimp , Artemia spp ., in marine fish larviculture*. 147–159.
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, 14(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Starliper, C. E., Ketola, H. G., Noyes, A. D., Schill, W. B., Henson, F. G., Chalupnicki, M. A., & Dittman, D. E. (2015). An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>
- Stefanakis, M. K., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2014). Use of essential oils extracted from three *Origanum* species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture Research*, 45(11), 1861–1866.
<https://doi.org/10.1111/are.12137>
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, 34(2), 539–546.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.024>
- Suárez, Medina, S. et al. (2015). DISTRIBUCION DE *Vibrio* spp. EN AGUA Y SEDIMENTO DE ESTANQUES PRODUCTORES DE CAMARON *Litopenaeus vannamei*. *Redalyc*, 14, 293–299.
- Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T. Y., Lee, E., Rollon, W. D., Hara, H.,

- Kayal, A. Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.002>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, *134*(June), 103580.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tolomei, A., Burke, C., Crear, B., & Carson, J. (2004). Bacterial decontamination of on-grown *Artemia*. *Aquaculture*, *232*(1–4), 357–371. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00540-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00540-4)
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(6), 2474–2478.
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(4), 1561–1568.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(10), 4606–4610.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999>
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis*, *117*, 118–127.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.026>
- Xiao, S., Cui, P., Shi, W., & Zhang, Y. (2020). Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02898-4>
- Yazgan, H. (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *LWT*, *130*, 109669.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109669>

