

Evaluación del extracto de Semillas *Citrus paradisi* para inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* en *Litopenaeus vannamei*.

Stephanie, Añazco-Sánchez¹; Francisco, Pozo-Miranda^{2*}

Resumen

Los cultivos larvales de *Litopenaeus vannamei* presentan altas mortalidades por la presencia del patógeno *Vibrio parahaemolyticus*, siendo combatido con antibióticos, lo que genera presión de selección y resistencia bacteriana. Por lo que se evaluó el extracto en testas de *Citrus paradisi* para inhibir la proliferación de *V. parahaemolyticus* y mejorar la supervivencia de *L. vannamei*, realizado en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, durante octubre y diciembre 2019. Por ello, se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria CMI, movilidad, crecimiento, biopelícula y toxicidad realizadas con postlarvas de *L. vannamei*. Los resultados demuestran inhibición del crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones; la actividad en CMI se observó a 43 mg/ml de extracto; para el ensayo de movilidad, biopelícula y crecimiento bacteriano la inhibición resulta a 5,3 mg/ml. El ensayo de toxicidad determina que sometidas a concentraciones de 0,08-0,325 mg/ml mantienen una supervivencia del 60%, pero en concentraciones de 0,650 mg/ml la supervivencia disminuye a 33%, comprobándose que concentraciones altas son más tóxicas para las postlarvas. Se concluye que, en concentraciones elevadas, el extracto de *C. paradisi* inhibe la proliferación bacteriana del patógeno *V. parahaemolyticus*, siendo recomendable su uso como desinfectante en instalaciones para el cultivo larvario de *L. vannamei*.

Key words: *Citrus paradisi*, cultivo, *Litopenaeus vannamei*, potencial inhibitorio

Evaluation of the of the extract of seeds *Citrus paradisi* for inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei*.

Abstract

This quantitative research study assessed the potential of *Citrus paradisi* seed extract to inhibit the proliferation of *Vibrio parahaemolyticus* and improve the survival of *Litopenaeus vannamei* *in vitro*. Farming of white shrimp *L. vannamei* has high mortality rates because of the presence of the pathogenic *V. parahaemolyticus*, which is treated with antibiotics, and this produces selection pressure and antibiotic resistance. Accordingly, this research was carried out in the microbiology laboratory at Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Manabí from October through December 2019. There were conducted some assays of minimum inhibitory concentration –MIC– Test, motility, growth, biofilm, and toxicity with *L. vannamei* postlarvae. The findings reveal that there is inhibition of bacterial growth in the assays at different concentrations; the activity in MIC is seen in 43 mg/ml of extract, and in the motility assay the inhibition corresponds to 2,6 mg/ml. In bacterial growth assays, concentrations of 5,3 mg/ml cause inhibition, whereas in biofilms inhibition occurs at 2,6 mg/ml. By working to improve survival of larvae, toxicity testing show that when they are subjected to concentrations ranging from 0,08 to 0,325 mg/ml, they have larval survival up to 60%, but with concentrations of 0,650 mg/ml, larval survival decreases by 33%; this determines that higher concentrations are more toxic for postlarvae. It is concluded that high concentrations of *C. paradisi* seed extract do inhibit bacterial proliferation of *V. parahaemolyticus*, and it is recommended as a disinfectant in facilities of *L. vannamei* larval farming.

Palabras clave: *Citrus paradisi*, culture, *Litopenaeus vannamei*, inhibition potential

Recibido: 29 de julio de 2020

Aceptado: 15 de octubre 2020

¹ Bióloga marina; NLProinsu, Ecuador; sanazco@nlproinsu.com

² Biólogo Marino, Ph. D (c); Docente investigador; Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, Ecuador; fpozo@pucesm.edu.ec; <https://orcid.org/0000-0003-4294-3130>

*Autor para correspondencia: fpozo@pucesm.edu.ec

I. INTRODUCCIÓN

En Ecuador, la economía es influenciada por el sector acuícola (Ochoa, Campoverde, & Santacruz-Reyes, 2017) debido a los ingresos de divisas por exportación, generando 506000 toneladas métricas de camarón representando 3234 millones de dólares al mercado internacional (CNA, 2019) siendo *Litopenaeus vannamei* una de las especies más producidas en el Ecuador (FAO, 2020), aportando además con alimentos proteicos y fuentes de trabajo para el país (Carchipulla, 2018).

Actualmente la producción de camarón está siendo afectada por la incidencia de bacterias patógenas principalmente del género *Vibrio*, que afecta la salud de larvas y juveniles, siendo un factor limitante en el desarrollo del cultivo (Ochoa et al., 2017). Esta bacteria halofílica Gram-negativa pertenece a la familia Vibrionacea (Freitas, Glatter, & Ringgaard, 2019). Causante de grandes pérdidas de producción de camarón en China en el año 2009, propagándose a Vietnam (2010), Malasia (2011), Tailandia y Filipinas (2012) (Saavedra-Olivos et al., 2018), detectándose en el 2013 en Centroamérica y Suramérica (Mejías, 2018), asociada al síndrome de mortalidad temprana (EMS, por sus siglas en inglés), debido a la presencia de un plásmido que posee los genes *PirA* y *PirB*, que producen toxinas que causan la necrosis aguda en el hepatopáncreas (Restrepo et al., 2018), y consecuentemente la mortalidad del 100% del cultivo larval (Redrován, 2017).

Para controlar esta enfermedad caracterizada por la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) en cultivos larvales, los acuicultores utilizan antibióticos como: oxitetraciclina, enrofloxacin y florfenicol, manipulados sin criterio técnico ocasionan un impacto ambiental negativo, ya que sus residuos se acumulan en el fondo de los estanques. Expulsado por medio de la excreta de los camarones, además de provocar resistencia bacteriana (Varela Mejías & Alfaro Mora, 2018).

Una alternativa amigable con el ambiente es el uso de extractos de plantas, las cuales poseen la capacidad de disminuir la propagación bacteriana en *Vibrio sp.*, gracias a su composición de flavonoides (Ochoa et al., 2017). A su vez se ha reportado que el extracto de la semilla de toronja

Citrus paradisi, combate una alta variedad de hongos y bacterias patógenas (Maldonado, 2017) debido a la presencia de polifenoles y flavonoides (Oroya, 2016). Con base en lo mencionado es importante realizar esta investigación para dar a conocer una alternativa amigable con el ambiente que contrarreste la propagación bacteriana en cultivos larvales. El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar las propiedades del extracto de testas de *Citrus paradisi*, sobre el patógeno *V. parahaemolyticus* en cultivos *in vitro*.

II. METODOLOGÍA

Obtención de bacterias

Se obtuvieron cinco individuos *Litopenaeus vannamei* de una piscina afectada por vibriosis, de la camaronera Dufer ubicada en San Vicente Km 5 vía Chone sector La Polvosa, Manabí con coordenadas 0°37'07" Lat. S, 80°23'35" Long. O.

De cada organismo se extrajo el hepatopáncreas, y maceró por separado, diluyéndose en 1,0 ml de agua estéril en un tubo eppendorff (1.5 ml). Posteriormente se sembró en 100 µl en agar TCBS, e incubó por 24 h a 29,0±1,0°C.

Obtención del extracto de la testa *Citrus paradisi*

Las semillas de *Citrus paradisi* fueron pre secadas al ambiente, luego se obtuvo la testa para su secado completo en estufa a 80±1°C. Una vez seca la testa se dejó en etanol (96%) para que actúe como solvente de extracción durante 24 h en una plataforma de agitación (Heidolph). Se procedió a filtrar y el sobrenadante se colocó en el rotavapor 30±1°C a 3 rpm. Se recuperó el 4% del volumen de trabajo. Este se colocó en un recipiente ámbar estéril que no permitió el paso de la luz. A continuación, se cerró herméticamente y congeló hasta su uso.

Reactivación de la cepa bacteriana

De las cepas extraídas de *V. parahaemolyticus* se tomaron las colonias por medio de un asa de vidrio y se inoculó en medio de Peptona (Acumedia LAB) en tubos de ensayo estériles. Se incubó hasta que el crecimiento fue equivalente a una turbidez de 0,1 de densidad óptica (DO).

Concentración mínima inhibitoria CMI

Para la determinación de la CMI, en agua de peptona (Acumedia LAB) se prepararon diluciones del extracto de *Citrus paradisi* a concentraciones de 6%=5,3 mg/ml, 12,5%= 10,7 mg/ml, 25% = 21,5 mg/ml y 50% = 43 mg/ml, y se distribuyeron en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro en forma seriada en medio de cultivo LB en cajas Petri. Como control se utilizaron discos de 6 mm de diámetro de oxitetraciclina. Con un hisopo se inoculó por barrido, una suspensión bacteriana de 0,1% de densidad óptica medida en el espectrofotómetro (Spectroquant ® NOVA60) a 600 nm de longitud de onda ($DO_{600} = 0,1$) y se incubó por 24 h a $29\pm 1^{\circ}C$. Los análisis se realizaron con 5 réplicas por concentración de acuerdo a Pardo., Monsalve., Ereira., Espinosa., & Jaramillo., (2017). Para establecer las concentraciones efectivas para disminuir el crecimiento bacteriano se determinó la CMI, acorde a las categorías resistente ($R < 14,0$ mm), intermedio (I de 15,0 a 18,0 mm) y sensible ($S > 19,0$ mm).

Ensayos de motilidad

Se prepararon las diferentes soluciones del extracto de *C. paradisi* para obtener en cajas de Petri con agar LB al 0,5% y NaCl al 2%. Se distribuyeron alícuotas de 5 μ l de cultivo bacteriano de $DO_{600} = 1,0$ en placas de agar LB. Se incubó durante 24 h a $30\pm 1^{\circ}C$ y se midió el halo de movilidad (Yang et al., 2017).

Cada tratamiento tuvo concentraciones de 10,7 mg/ml (12,5%), 5,3 mg/ml (6%) y 2,6 mg/ml (3%). Se emplearon 5 réplicas por tratamiento.

Ensayos de crecimiento bacteriano

Para los ensayos de crecimiento bacteriano, se cultivó *V. parahaemolyticus* por 24 h en medio nutritivo Agua de Peptona (Acumedia LAB) a una $DO_{600} = 0,1$ con extracto y sin extracto de *C. paradisi*. Las concentraciones de extractos fueron: 10,7 mg/ml (12,5%), 5,3 mg/ml (6%), 2,6 mg/ml (3%). Los cultivos se desarrollaron en volúmenes de 2 ml en celdas de vidrio a $29\pm 1^{\circ} C$ tapados con algodón estéril durante 24 h, y la turbidez se cuantificó cada 8 h a 600 nm por espectrofotometría (Spectroquant ® NOVA60). Se determinaron las curvas de crecimiento de cada cultivo, empleando

5 réplicas para cada uno.

Biopelícula

Se usaron celdas de vidrio para lectura espectrofotométría (Merck), se adicionaron medio LB (2 ml) y los extractos de cada tratamiento: 10,7 mg/ml (12,5%), 5,3 mg/ml (6%), 2,6 mg/ml (3%). Se distribuyó alícuotas (100 μ l) de cultivos de *V. parahaemolyticus* ($DO_{600} = 0,1$) y se incubó por 24 h a $30\pm 1^{\circ}C$. Los tubos se lavaron dos veces con tampón de fosfato salino (PBS). Se agregó etanol (1000 μ l) por 20 min, se eliminó el etanol y se visualizó con 150 μ l de cristal violeta (1,0%) durante 15 min. Posteriormente, se eliminó el exceso de cristal violeta mediante dos lavados con PBS, se agregó etanol (1000 μ l) y se realizó la lectura a DO 440 nm (Lee, Cho, & Lee, 2011). Se emplearon 5 réplicas por tratamiento.

Análisis de toxicidad del extracto sobre postlarvas

En la evaluación de toxicidad se usaron 20 poslarvas pl8 de camarón *L. vannamei* por cada recipiente plástico (150 ml), las cuales se sometieron a 4 concentraciones de extractos que mostraron efectividad en pruebas in vitro: 0,080 mg/ml (0,09%), 0,160 mg/ml (0,18%), 0,325 mg/ml (0,37%) y 0,650 mg/ml (0,75%). Se usaron 3 réplicas. El análisis duró 24 h.

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de las varianzas de los datos a los análisis de movilidad, toxicidad y sensibilidad CMI mediante la prueba de Shapiro Wilks y Levene ($\alpha = 0,05$). Comprobada la normalidad de los datos se evaluaron las diferencias significativas a los tratamientos de cada prueba mediante análisis de varianza de una vía ($\alpha = 0,05$) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$), para la prueba de toxicidad se evaluó por Kruskal-Wallis y Mann-Whiney. El software usado para el análisis estadístico fue Infostat versión 2017.

III. RESULTADOS

Concentración Mínima Inhibitoria CMI

Se determinó que la bacteria *V. parahaemolyticus* muestra efecto significativo

($F = 8,25$; Tukey $p < 0,05$) de sensibilidad a concentraciones superiores a 43,0 mg/ml, siendo esta la CMI del extracto de *Citrus paradisi*; mientras que a las otras concentraciones no mostró sensibilidad. La CMI de 43,0 mg/ml provocó un

halo de inhibición de $33,3 \pm 2$ mm de diámetro mientras que el control con Oxitetraciclina $46,0 \pm 3$ mm. Aunque los tamaños de halo del extracto y el control difieren, son consideradas sensibles para la inhibición del creciento bacteriano (figura 1).

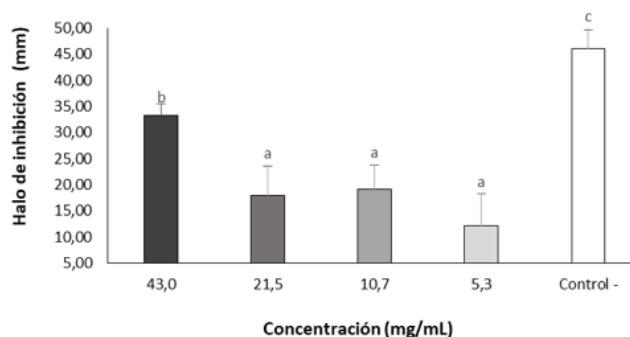


Figura 1. Análisis de Concentración mínima inhibitoria CMI de extractos de *Citrus paradisi*. Control Oxitetraciclina (30 μ g/ml), barras verticales = desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Ensayos de motilidad

El análisis del efecto del extracto mediante la movilidad de la cepa de *Vibrios parahaemolyticus*, mostró inhibición significativa ($F = 182,15$; Tukey $p < 0,05$) de movilidad de la colonia sobre el medio de cultivo LB (0,5% agar) en cada una de

las concentraciones evaluadas (10,7; 5,3 y 2,6 mg/ml) respecto al control. En el tratamiento control si presentó movilidad, formando un halo de $6,6 \pm 1,3$ mm de diámetro (ver Imagen 1). Lo que demuestra que el extracto fue clave, para evitar la movilidad de la colonia en el medio de cultivo.

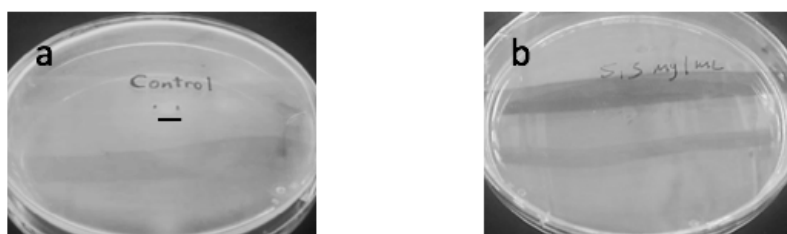


Imagen 1. Halos de movilidad de colonia de *Vibrios parahaemolyticus*, en medio de cultivo semisólido LB suplementado con 0,5% de Agar. Línea color rojo indica tamaño del halo de movilidad del tratamiento control negativo (sin extracto). a) control negativo, b) tratamiento 5,3 mg/ml de extracto de *Citrus paradisi*.

Ensayos de crecimiento bacteriano

El ensayo de crecimiento bacteriano se realizó durante 24 h de cultivo y su cuantificación fue mediante la medición de la densidad óptica por espectrofotometría, se observó que concentraciones evaluadas de *Citrus paradisi* de 10,7 y 5,3 mg/ml fueron efectivas para controlar la proliferación bacteriana durante de 24 h, mientras que concentración de 2,6 mg/ml mantuvo inhibición

bacteriana hasta las 16 h de exposición al extracto, posterior a ello (24 h) el crecimiento bacteriano incrementó significativamente ($F = 0,78$; Tukey $p < 0,05$) a una DO_{600} de 0,800. El control (sin extracto) se observó un crecimiento bacteriano normal en el transcurso del tiempo de evaluación, observándose claramente las fases de crecimiento latencia y exponencial como se muestra en la figura 2 (Fischer et al., 1995; Vivien et al., 2017).

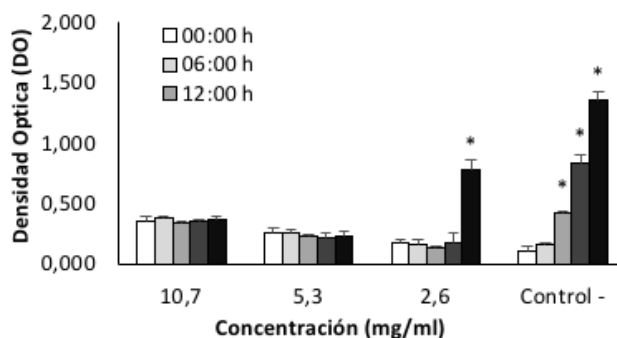


Figura 2. Análisis de crecimiento bacteriano expuestos a extractos de *Citrus paradisi*. Control negativo sin extracto (0 µg/ml), barras verticales = desviación estándar, asteriscos indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Biopelícula

Se determinó la capacidad de formación y adherencia de biopelícula bajo exposición al extracto de *Citrus paradisi* durante 24 h, encontrándose que todas las concentraciones evaluadas (10,7 y 5,3 y 2,6 mg/ml) provocaron que *V. parahaemolyticus*

disminuya significativamente ($F = 7,26$; Tukey < 0,05) la capacidad de formación de biopelícula (DO₆₀₀ promedio $0,08 \pm 0,01$) respecto al control (DO₆₀₀ = $0,16 \pm 0,09$), evidenciando la efectividad del extracto inhibir este factor de virulencia bacteriana (ver figura 3).

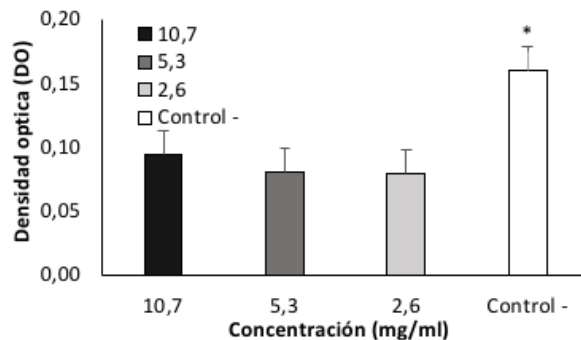


Figura 3. Análisis de la formación de biopelícula por *V. parahaemolyticus*. Control negativo sin extracto (0 µg/ml), barras verticales = desviación estándar, asteriscos indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de toxicidad y ensayo en larvas de *L. vannamei*

Al evaluar la toxicidad en el organismo de cultivo, se observó efectos tóxicos con mortalidad del 70% de las postlarvas de *L. vannamei* a concentraciones de 0,080; 0,160; 0,325 mg/ml durante 24 h de evaluación (ver figura 4), mientras

que la concentración 0,650 mg/ml se muestran altamente tóxicas, provocando la mortalidad del 60% de las larvas evaluadas. Estas presentaron daños en las branquias y disminuyendo la supervivencia de las postlarvas. Esto muestra alta toxicidad del extracto en larvas durante el desafío afectando la supervivencia de larvas de camarón, lo cual dificulta su uso en cultivos.

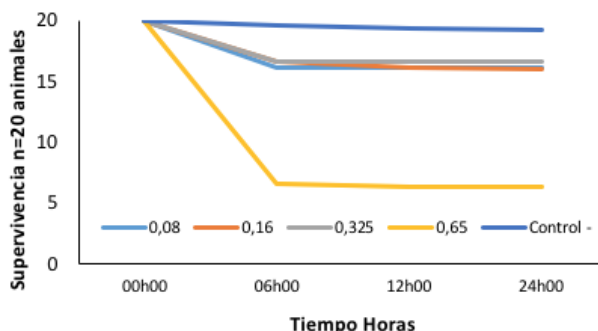


Figura 4. Análisis de toxicidad de extractos de *Citrus paradisi* sobre postlarvas p18 de *L. vannamei* durante 24 h de ensayo. Valores absolutos.

IV. DISCUSIÓN

La acuicultura de camarón es una industria de gran importancia para el Ecuador, pero una de sus etapas críticas es la larvicultura debido a problemas bacterianos durante el desarrollo del cultivo. En este estudio la sensibilidad de *V. parahaemolyticus* fue evaluada mediante la CMI del extracto etanólico de *C. paradisi* que presentó actividad antibacteriana a 43,0 mg/ml (50% de extracto) con un halo de inhibición $33,3 \pm 2$ mm de diámetro. Resultados similares han sido observados en otras bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*), pero a diferentes concentraciones de extractos (25 y 50 % respectivamente) (Maldonado, 2017). *Citrus jambhir* frente al patógeno *Pseudomona aeruginosa*, inhibe su proliferación hasta un halo de 9,66 mm de diámetro, mientras que, cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Staphylococcus saprophyticu* la inhibición del crecimiento es completamente nula frente a *Citrus jambhir* (Vasquez & Mendosa., 2018).

Estudios con aceites esenciales también muestran actividad antibacteriana como es el caso de *Citrus reticulata* (mandarina), sobre *Bacillus subtilis* a concentración de 9% y 19%, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 17% y 7% (Quispe & Zambrano, 2017). Así mismo, el aceite esencial de *Citrus sinensis* (naranja dulce) presenta actividad antibacteriana en rangos de 50% y 100% en *Staphylococcus epidermidis*.

En el ensayo de movilidad se observó una efectividad total (100%) de la inhibición a todas las concentraciones evaluadas 10,7 mg/ml (12,5%),

5.3 mg/ml (6%) y 2,6 mg/ml (3%) durante 24 h, posiblemente la célula se vio afectada en su fisiología y su capacidad de formación flagelar para poder extender la colonia en presencia de los extractos. Resultados similares se obtuvieron en el ensayo de crecimiento celular de la bacteria, excepto a la concentración de 5 mg/ml (6%), la cual solo sostuvo el crecimiento hasta las 12 h, y a partir de las 16 h presentó un incremento en la proliferación celular. Resultados que difieren con lo reportado para aceite esencial de *C. paradisi*, cuya actividad antibacteriana es nula a concentraciones bajas (0,25%, 0,50%, 0,75%) sobre patógenos como: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosas*, *Salmonella typhi* (Baquerizo., 2017). Esto podría deberse a que la composición fitoquímica del género *Citrus* son sustancias volátiles, que disminuyen su concentración en el tratamiento y da como resultado la disminución del efecto antibacteriano (Herrera., García., & Delgado., 2019), mientras que su actividad bactericida se debería a la riqueza en α -pineno, β -mirreno, limoneno, linalool (Alarcón, Pájaro, & Méndez, 2017) polifenólicos incluidos la naringina, flavanona y furanocumarinas como: bergamotina, dihidrobergamottina (Osungunna. & Onawunmi., 2016; (Salazar., 2019) Pardo. et al., 2017; (Maldonado, 2017).

En biopelícula, la efectividad inhibitoria de biopelícula durante las 24 h. Estos resultados se muestran similares a los reportados por (Fratianni et al., 2019), donde presenta la potencial capacidad inhibitoria de formación de biopelícula por parte del extracto en la testa de *Citrus bergamota*, sobre las cepas: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pectobacterium carotovorum*,

Pseudomonas aeruginosa, esto por presencia de polifenoles en la testa.

En el ensayo de toxicidad, el extracto etanólico de la testa de *C. paradisi* evaluada in vitro presentó alta supervivencia de larvas *L. vannamei* a concentraciones inferiores a 0,325 mg/ml (0,037%), por el contrario, estudio realizado por (Herrera. et al., 2019), observa supervivencia a concentración de 25% de aceites esenciales en organismos gnobióticos (nauplios de *Artemia*). Esto muestra que el extracto etanólico de la testa de *C. paradisi* es altamente antibacterial, pero su toxicidad no permite su uso en cultivos acuícolas, por lo tanto, solo sería factible como desinfectante por un lapso corto de tiempo.

V. CONCLUSIÓN

Se establece que los extractos de testa de *C. paradisi* presentan propiedades importantes en el control de vibriosis debido a su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano, requiriéndose para su aplicación una CMI de 43,0 mg/ml, siendo alternativo al empleo de Oxitetraciclina. Además, su efecto comprobado en este estudio sobre la motilidad y formación de biopelícula bacteriana.

No es factible la aplicación directa de los extractos al medio de cultivo de las postlarvas de *L. vannamei* debido a la alta toxicidad sobre éstas a concentraciones mayores de 0,325 mg/ml (0,037 %), por lo cual su empleo estaría sugerido como desinfectante de instalaciones y utensilios de cultivo.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento por el apoyo brindado en la realización de investigación que se desarrolló dentro del marco del proyecto Evaluación de principios activos de plantas superiores y algas para la inhibición de la virulencia *Vibrio parahaemolyticus* con fines acuícolas.

VI. LITERATURA CITADA

Alarcón, M., Pájaro, N., & Méndez, G. (2017). Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*, 46(2), 160-175. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v46n2/0034-7418-rccqf-46-02-00160.pdf>

Baquerizo., E. (2017). *Evaluación de las propiedades del aceite esencial de citrus paradisi l. (toronja blanca) que crece en la zona costera del ecuador*. Universidad de Guayaquil. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/21907/1/BCIEQ-T-0222 Villón Baquerizo Edward Isaac%3B Huacón López Michel Micaela.pdf>

Carchipulla, M. (2018). *Importancia del oxígeno disuelto para mejorar la calidad de agua en estanques de camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Universidad técnica de Machala. Recuperado de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12905/1/DE00006_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf

CNA. (2019). Camarón- reporte de Exportaciones Ecuatorianas Totales.

FAO. (2020). Visión general del sector acuícola nacional Ecuador. Recuperado de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_ecuador/es

Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados. vol. I. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Fратиани, F., Cozzolino, A., de Feo, V., Coppola, R., Ombra, M. N., & Nazzaro, F. (2019). Polyphenols, Antioxidant, Antibacterial, and Biofilm Inhibitory Activities of Peel and Pulp of *Citrus medica* L., *Citrus bergamia*, and *Citrus medica* cv. Salò cultivated in southern Italy. *Molecules*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244577>

Freitas, C., Glatter, T., & Ringgaard, S. (2019). The release of a distinct cell type from swarm colonies facilitates dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* in the environment. *The ISME Journal*, 8-12. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0521-x>

Gonzales, O. (2018). *Enfermedades bacterianas mas comunes en la larvicultura del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) y sus metodos*

- de control. Universidad Técnica de Machala. Recuperado de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12225/1/DE00002_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Herrera., P., Garcia., C., & Delgado., L. (2019). Eficacia disolvente y citotoxicidad del aceite de cáscara de limón (Citrus limon). *Rev Estomatol Herediana*, 29(3), 196-202. Recuperado de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/3603-Texto del artículo-10246-1-10-20191104.pdf
- Lee, J., Cho, M., & Lee, J. (2011). 3-Indolylacetonitrile Decreases Escherichia coli O157:H7 Biofilm Formation and Pseudomonas aeruginosa Virulence. *Environmental Microbiology*, 13(1), 62-73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02308.x>
- Maldonado, V. (2017). *Efecto inhibitorio del extracto de toronja (Citrus paradisi) en diferentes concentraciones sobre el Streptococcus mutans estudio in vitro*. Universidad Central Del Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13247/1/T-UCE-0015-805.pdf>
- Mejías, A. (2018). Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. *AquaTIC*, (November). Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Alexander_Mejias2/publication/329138767_Patologias_del_hepatopancreas_en_camarones_marinos_cultivados_en_America_y_su_diagnostico_diferencial_mediante_histopatologia/links/5bf75e82299bf1a0202c34d7/Patologias-del-hepato
- Ochoa, L., Campoverde, M., & Santacruz-Reyes, R. (2017). Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura Introducción Materiales y métodos. *AquaTIC*, 49, 1-7. Recuperado de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/285-765-2-PB (1).pdf
- Oroya, D. (2016). *Actividad antifúngica del Citrus paradisi “ toronja ” sobre cepas de Candida albicans aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista*. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4924/Churata_od.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Osungunna., O., & Onawunmi., O. (2016). Anti-adhesion and antibiotic modulatory evaluation of grapefruit (Citrus paradisi) juice and seed extract on bacteria isolated from urine and catheter. *Redalyc.org*, 4, 38.
- Pardo., C., Monsalve., G., Erira., A., Espinosa., Y., & Jaramillo., G. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Citrus reticulata sobre Fusobacterium nucleatum asociada a enfermedad periodontal Antimicrobial effect of essential oil of Citrus reticulata on Fusobacterium nucleatum associated with periodontal disease. *Rev. Colomb. Biotecnol*, (2), 7-14. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n2/o123-3475-biote-19-02-00007.pdf>
- Quispe, A., & Zambrano, D. (2017). *Determinación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de la cáscara de Citrus x tangelo “Naranja tangelo” en cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923*. Universidad privada Antonio Guillermo Urrelo.
- Redrován, K. (2017). *Medidas terapéuticas para el control de vibriosis en el cultivo de camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Universidad Académica De Ciencias Agropecuarias. Recuperado de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11355/1/DE00017_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Restrepo, L., Bonny, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Irma, B., Panchana, F., ... Re, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new Vibrio species (Vibrio punensis) within the commensal Orientalis clade. *Scientific Reports*, (August), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- Saavedra-Olivos, K. Y., Peralta-ortiz, T., Ordinola-zapata, A., Sandoval-ramayoni, J. E., Vieyra-peña, E. G., Zapata-cruz, M. A., ... Mendoza-dioses, M. E. (2018). Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en Litopenaeus vannamei bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. *Inv Vet Perú*, 29(1), 328-338.

- Salazar., R. (2019). *Comparación in vitro de la eficacia disolvente del aceite Citrus paradisi sobre la gutapercha endodontica*. Universidad Nacional de Trujillo. Recuperado de [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15291/Salazar Carretero Renato Rodrigo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15291/Salazar_Carretero_Renato_Rodrigo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Varela Mejías, A., & Alfaro Mora, A. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura, 29(1), 1-14. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172018000100001&script=sci_arttext
- Vasquez., J., & Mendosa., K. (2018). *Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de plantas frente a cepas multiresistentes*. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- Vivien, R., Holzmann, M., Werner, I., Pawlowski, J., Lafont, M., & Ferrari, B. J. D. (2017). Cytochrome c oxidase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database. *PeerJ*, 5, e4122. <https://doi.org/10.7717/peerj.4122>
- Wing, K., & Chik, B. K. (2018). Ácidos orgánicos en alimentos acuícolas: un potencial sustituto de los antibióticos, 1. Recuperado de <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/acidos-organicos-en-alimentos-acuicolas-un-potencial-sustituto-de-los-antibioticos/>
- Yang, Q., Julyantoro, G., Wang, Z., Lin2, B., Rubin, R., Vora, G. J., & Defoird, T. (2017). Indole signalling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental Microbiology*.