

## Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*

### Antibacterial effect of essential oregano oil (*Lippia berlandieri*) on pathogenic bacteria of shrimp *Litopenaeus vannamei*

Martina Hilda Gracia-Valenzuela,<sup>1</sup> César Orozco-Medina<sup>2</sup> y Carmen Molina-Maldonado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui, A. P. 797, Block 611, Valle del Yaqui, Mpio. de Bácum, Sonora. 85276. México

<sup>2</sup>Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, Carretera a Huatabampo Km 6.5 y Periférico, Col. Juárez. Navojoa, Sonora. 85800. México  
e-mail: hgracia@itvalledelyaqui.edu.mx

---

Gracia-Valenzuela, M. H., C. Orozco-Medina y C. Molina-Maldonado. 2012. Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica* 22 (3): 201-206.

#### RESUMEN

Una alternativa al uso de antibióticos comerciales son los extractos de aceites vegetales con actividad antimicrobiana no específica. En el presente estudio, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) así como la capacidad de inhibición en placa del aceite esencial de orégano *Lippia verlandieri*, con fracción alta en timol (FT) y fracción alta en carvacrol (FC), comparados con antibióticos comerciales, para las bacterias *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*, aisladas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Además, se determinó la supervivencia de camarones infectados con *V. alginolyticus* tratados con las fracciones FT, FC y Enrofloxacina. Las CMI de las FT y FC fueron de 50 a 100 µg/mL, mientras que el antibiótico comercial presentó una CMI de 10 a 50 µg/mL. La bacteria *V. alginolyticus* presentó el más alto ( $p \geq 0.05$ ) grado de sensibilidad (50 a 56 mm de halo de inhibición) con FC y Enrofloxacina. Por otro lado, la supervivencia de camarón fue de 70, 50 y 50% con la aplicación de FC, FT y Enrofloxacina, respectivamente. Ambas fracciones del extracto de aceite esencial de orégano tienen la capacidad de controlar el crecimiento *in vitro* de bacterias patógenas en camarón. Se concluye, que la fracción alta en carvacrol de aceite esencial de orégano es una alternativa viable o un complemento a los antibióticos comerciales para el control de *Vibrio* spp., patógenos en camarones peneidos.

**Palabras clave:** Aceite esencial de orégano, camaronicultura, sustitución de antibióticos, *Vibrio*.

#### ABSTRACT

An alternative for antibiotics use is the employment of vegetal oil extracts with unspecific antagonistic activity. In the present study, two fractions of essential oil from the oregano *Lippia verlandieri*, fraction high in thymol (FT) and fraction high in carvacrol (FC) were evaluated and compared to commercial antibiotics for the bacteria *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Vibrio mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus*, isolated from shrimp *Litopenaeus vannamei*. The minimal inhibitory concentration (MIC) as well as the inhibition capacity in agar plates of these antimicrobials were evaluated and compared to commercial antibiotics. The survival of shrimp infected with *V. alginolyticus* and treated with the antimicrobials FT, FC and the antibiotic Enrofloxacin was also tested. The MIC of the FT and FC were from 50 to 100 µg/mL, the commercial antibiotic showed a MIC from 10 to 50 µg/mL. *V. alginolyticus* had the highest ( $p \geq 0.05$ ) sensitivity level (50 to 56 mm of inhibitory halo) with FC and Enrofloxacin. Shrimp survival was 70, 50 y 50% with application of FC, FT and Enrofloxacin, respectively. Both FT and FC fractions are able to control *in vitro* growth of pathogenic bacteria in shrimp. It was concluded that the fraction high in carvacrol from

essential oregano oil, could be a viable alternative or a supplement to commercial antibiotics for the control of *Vibrio* spp. pathogens in penaeid shrimps.

**Key words:** Antibiotics substitution, essential oregano oil, shrimp culture, *Vibrio*.

## INTRODUCCIÓN

La incidencia de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias es uno de los principales problemas en la producción acuícola de camarones peneidos (Hettiarachchi et al., 2005; Gracia-Valenzuela et al., 2011). Un método de control para enfermedades infecciosas en organismos acuícolas ha sido la aplicación de antibióticos como la Enrofloxacin, Florfenicol y Oxitetraciclina entre otros (Roque et al., 2001; Xu et al., 2006; Santiago et al., 2009).

Algunos compuestos fenólicos obtenidos de extractos vegetales, se han reportado como alternativas viables a los antibióticos para el tratamiento de agentes infecciosos en la acuicultura (Citarasu, 2010). En este contexto, componentes químicos del aceite esencial de orégano (AEO), han mostrado capacidad antibiótica sobre bacterias patógenas que afectan a peces (Paredes-Aguilar et al., 2007; Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010). Bajo condiciones de cultivo, las bacterias del género *Vibrio* y *Pseudomonas* son los principales agentes infecciosos en camarones peneidos (Hettiarachchi et al., 2005; Citarasu, 2010). Es posible que estas bacterias patógenas para el camarón también sean susceptibles a los compuestos antimicrobianos del aceite esencial de orégano.

El objetivo del presente estudio, fue comparar la capacidad antibiótica de dos fracciones de aceites esenciales de orégano (AEO), una fracción con alto contenido de carvacrol (FC) y la otra de timol (FT), en condiciones *in vitro* ante algunas especies de bacterias patógenas de camarón. Además, evaluar la capacidad anti-infectiva *in vivo* en el camarón, comparada con un antibiótico comercial de uso común en la acuicultura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Extracto de aceite esencial de orégano.** Los extractos de aceite esencial de orégano *Lippia verlandieri* Schauer fueron facilitados por el Centro de Investigación de los Recursos Naturales (CIRENA), en Salaiques, Chihuahua, México. Se evaluaron dos fracciones, la fracción alta en timol (FT), que contiene 23% de carvacrol y 48% de timol; y la fracción alta en carvacrol (FC), con 40% carvacrol y 25% de timol.

**Concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos en bacterias.** Se determinó la CMI para los antibióticos naturales FT y FC, y los antibióticos comerciales Enrofloxacin, Florfenicol, Fosfomicina Cálcica y Oxitetraciclina (Avimex™), a concentraciones de 2.5, 5, 10, 50 y 100 µg/mL (en medio Mueller-Hinton, DI-

FCO™ con 2.5% de NaCl), rango comúnmente usado para probar actividad antibacteriana (Roque et al., 2001; Paredes-Aguilar et al., 2007). Las especies de bacterias evaluadas fueron: *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) Stanier, 1943; *A. salmonicida* (Lehmann & Neumann, 1896) Griffin et al., 1953; *Pseudomonas putida* (Trevisan, 1889) Migula, 1895; *P. fluorescens* (Migula, 1895); *Vibrio mimicus* Davis et al., 1982; *V. alginolyticus* (Miyamoto et al., 1961) Sakazaki, 1968; *V. fluvialis* Lee et al., 1981 y *V. vulnificus* (Reichelt et al., 1979) Farmer, 1980; aisladas de camarones blancos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). La identificación de las bacterias se llevó a cabo mediante determinaciones fenotípicas con el kit comercial API20E y API20NE (BioMérieux) (Gómez-Gil et al., 2003); los resultados de identificación bacteriana no son mostrados en el presente trabajo. Los medios de cultivo en tubo de Mueller-Hinton se incubaron durante 24 h a 30 °C. Posteriormente, se observó la turbidez en cada tratamiento para todas las réplicas. La CMI se definió como la concentración más baja del antibiótico que inhibió el crecimiento visible de la bacteria después de su incubación (Andrews, 2001).

**Grado de inhibición de bacterias en placas con aceites esenciales de orégano (AEO).** Los antibióticos naturales de AEO en sus fracciones FT y FC, y el antibiótico comercial Enrofloxacin fueron utilizados para evaluar el grado de inhibición de crecimiento de las colonias de bacterias en las especies mencionadas. Con base a resultados del presente estudio de CMI, se utilizó la Enrofloxacin por mostrar valores similares de CMI en las especies de bacterias evaluadas, al compararse con las fracciones FT y FC; además de ser un antibiótico efectivo en bacterias patógenas en cultivos de camarón (Roque et al., 2001; Santiago et al., 2009).

Placas de medio con agar Mueller-Hinton y 2.5% de NaCl, fueron previamente inoculadas por dispersión en toda la superficie con 100 µL de suspensión bacteriana. Posteriormente, se colocaron discos de papel estéril con diámetro de 5 mm (Oxoid™), embebidos con 20 µL de los extractos de orégano FT, FC y Enrofloxacin a una concentración de 50 µg/mL, respectivamente. Como control negativo, se utilizó solución salina al 2.5% de NaCl. Los ensayos en placas se realizaron por triplicado e incubaron durante 24 h a 30 °C. Finalmente, se midió el diámetro en mm del halo de inhibición generado por los antibióticos sobre el medio de cultivo (Roque et al., 2001).

**Supervivencia de camarones infectados y tratados con AEO.** La capacidad anti-infectiva del extracto de AEO fue evaluado *in vivo* con pruebas de supervivencia de camarón blanco (*L. vannamei*) con un peso de 15-18 g, cultivados en un sistema estático con 20 camarones por acuario de 50 L. Las condiciones de cultivo

se mantuvieron bajo los siguientes valores: temperatura de 23 a 25 °C, salinidad de 34 a 36 UPS, concentración de oxígeno disuelto de 4.5 a 5.5 mg/L y pH de 7.5 a 8. La infección en los camarones se realizó con la bacteria *Vibrio alginolyticus*, para lo cual, el agua de cultivo fue inoculada con la bacteria en fase de crecimiento exponencial a fin de obtener una concentración final de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL). Posteriormente, los camarones fueron alimentados con base en 5 tratamientos (20 camarones por cada tratamiento). En todos los tratamientos se utilizó el mismo tipo de alimento; así como igual volumen (5 mL) y concentración de antibiótico o fracción, los cuales fueron previamente mezclados con lecitina de soya como agente disolvente a una proporción 1:1. Tratamiento FT: alimento comercial para camarón (Purina 35™, México) impregnado por aspersión con 5 mL de fracción de timol (a concentración de 50 µg/mL/g de alimento). Tratamiento FC: alimento con fracción de carvacrol. Tratamiento EN: alimento con Enrofloxacin. Tratamiento CP (control positivo): alimento comercial con agente disolvente sin antibiótico y sin inóculo de *V. alginolyticus*. Tratamiento CN (control negativo): alimento con agente disolvente sin antibiótico, con inóculo de *V. alginolyticus*. La sobrevivencia se registró diariamente hasta el décimo día de cultivo.

**Análisis estadístico.** Los resultados de los grados de inhibición de bacterias en placas entre los distintos tratamientos, fueron analizados mediante una prueba de distribución de Kruskal-Wallis, con el programa Statistica Versión 6.

## RESULTADOS

**Concentración mínima inhibitoria de antibióticos en bacterias.** La Fracción FC de AEO mostró una CMI de 50 µg/mL en todas las especies de bacterias evaluadas. La CMI para la FT presentó valores en el rango de 50 a 100 µg/mL en todas las especies. El antibiótico comercial Enrofloxacin presentó una CMI entre 10 a 50 µg/mL, mientras que la Fosfomicina Cálcica y el Florfenicol mostraron las menores CMI con 5 a 50 µg/mL en las 8 especies

de bacterias evaluadas (Tabla 1). La Oxitetraciclina exhibió una CMI de 100 µg/mL en cada cepa evaluada, siendo este el más alto valor detectado para todos los antibióticos probados.

**Grado de inhibición de bacterias en placas con AEO.** En cuanto a la inhibición en placas, la FC y Enrofloxacin fueron estadísticamente similares ( $p \geq 0.05$ ) en todas las especies excepto con *Aeromonas hydrophila*, en donde la Enrofloxacin mostró una mayor inhibición en el crecimiento, con un halo de 36.7 a 37.3 mm. En las especies de *Aeromonas*, la FT mostró una menor capacidad inhibitoria con respecto a FC y EN ( $p \leq 0.05$ ), en contraste, la FT inhibió significativamente solo sobre *P. fluorescens* con 24.9 a 25.1 mm de halo ( $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, la Enrofloxacin en reto con *V. mimicus* mostró una inhibición menor a las FT y FC, esto es 17 a 24 mm de halo ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 1). De acuerdo a la clasificación de los grados de sensibilidad bacteriana a los antibióticos, en relación al diámetro de inhibición en placas ( $\leq 8$  mm no sensible, 9-14 mm sensible, 15-19 mm muy sensible,  $\geq 20$  mm extremadamente sensible) propuesto por Celikel & Kavas (2008), todas las especies de *Vibrio* evaluadas fueron sensibles ante los extractos de FT, FC y Enrofloxacin; además, el grado de sensibilidad fue diferente según la especie de bacteria y el tipo de antibiótico aplicado.

La respuesta de inhibición de FC y Enrofloxacin en *V. alginolyticus* resultó "extremadamente sensible" y significativamente mayor comparada al resto de los tratamientos en todas las especies ( $p \leq 0.05$ ), con halos de inhibición de 50 a 56 mm de diámetro; excepto para *A. salmonicida* con FC (Fig. 1). Los tratamientos evaluados (FT, FC y EN), al ser comparados dentro de cada una de las especies: *P. putida*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus* (Fig. 1), resultaron estadísticamente similares ( $p \geq 0.05$ ) y estuvieron acorde a lo observado en la evaluación de las CMI.

**Sobrevivencia de camarones infectados y tratados con AEO.** La sobrevivencia de camarones en cultivo con 10 días de tratamiento con FC fue del 70%, significativamente mayor a la obtenida con FT (50%), Enrofloxacin (50%) y el tratamiento con-

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de fracciones de aceite esencial de orégano con alto contenido de timol (FT), de carvacrol (FC) y antibióticos comerciales a diferentes concentraciones (µg/mL); en el crecimiento en bacterias patógenas aisladas de camarón. n = 3 tubos de crecimiento. Los datos son el número modal de tres réplicas en cada grado de dilución.

Bacteria	FT	FC	Enrofloxacin	Florfenicol	Fosfomicina cálcica	Oxitetraciclina
<i>Aeromonas hydrophila</i>	50	50	50	10	5	100
<i>A. salmonicida</i>	100	50	10	5	5	100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50	50	10	10	5	100
<i>P. putida</i>	50	50	10	10	5	100
<i>Vibrio alginolyticus</i>	100	50	50	50	10	100
<i>V. fluvialis</i>	50	50	50	50	10	100
<i>V. mimicus</i>	50	50	10	50	5	100
<i>V. vulnificus</i>	50	50	50	10	5	100

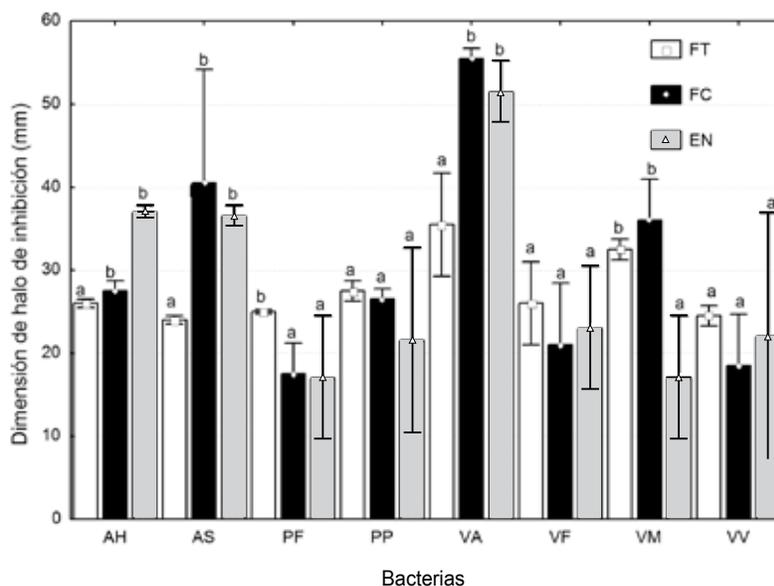


Figura 1. Inhibición de crecimiento colonial de bacterias aisladas de camarón *Litopenaeus vannamei*, evaluada mediante la difusión en placa y la medición (en mm) del halo de inhibición, en comparación con los antibióticos naturales de distintas fracciones del aceite esencial de orégano: fracción con alto contenido de timol (FT), fracción con alto contenido de carvacrol (FC) y el antibiótico comercial Enrofloxacin (EN). Bacterias *Aeromonas hydrophila* = AH, *A. salmonicida* = AS, *Pseudomonas fluorescens* = PF, *P. putida* = PP, *Vibrio alginolyticus* = VA, *Vibrio fluvialis* = VF, *Vibrio mimicus* = VM, *Vibrio vulnificus* = VV. Comparación estadística entre tratamientos con similar especie bacteriana, por análisis de distribución no paramétrica de Kruskal-Wallis. N = 6 colonias por tratamiento en cada especie de bacteria.

trol negativo (45%). Los camarones no infectados presentaron el 100% de sobrevivencia (Fig. 2). En el tratamiento FC, el 100% de los camarones se mantuvieron vivos hasta el día cinco, en contraste con los tratamientos FT y EN donde sobrevivieron hasta el día dos y en el tratamiento CN solo durante el primer día (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

Los resultados de la CMI en las bacterias evaluadas frente a los antibióticos comerciales Florfenicol y Enrofloxacin, 5 a 50 µg/mL y 10 a 50 µg/mL respectivamente, mostraron concentraciones superiores a las reportadas por Roque *et al.* (2001) para bacterias del género *Vibrio*, aisladas de camarones enfermos cultivados en el noroeste del Pacífico mexicano, con valores de 1.79 y 0.45 µg/mL. Por otro lado, la Oxitetraciclina presentó menor CMI con 100 µg/mL en el presente estudio comparado con los 304 µg/mL reportado por los mismos autores. Los resultados mostrados anteriormente con valores variables de CMI ante los antibióticos, pueden ser considerados como una propiedad de amplia variabilidad sensitiva en las bacterias del género *Vibrio* (Santiago *et al.*, 2009).

La aplicación de las dos fracciones de aceite esencial de orégano fue efectiva en la inhibición de *Vibrio mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. vulnificus* a una concentración mínima

de 50 mg/L. Paredes-Aguilar *et al.* (2007), estudiaron el efecto antimicrobiano de cinco fracciones de AEO (con diferentes proporciones de carvacrol-timol), sobre las especies de *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae* No-01, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, utilizando concentraciones de 50 a 600 mg/L; sus resultados mostraron efecto antibacteriano en todas las fracciones, sin encontrar diferencias entre las CMI de las especies de *Vibrio* evaluadas, con concentraciones de 100-200 mg/L. Dichos resultados de CMI fueron mayores a los obtenidos en este estudio. La diferencia en los valores de las CMI entre ambos, pudo ser causada por el manejo distinto en las variables experimentales como la concentración bacteriana del inóculo y la concentración del inhibidor (Lambert, 2000). En este contexto, se ha reportado que el efecto antibacteriano en la fracción con alto contenido de timol (26% carvacrol, 54% timol) es mayor comparado con la fracción con alto contenido de carvacrol (81% carvacrol, 3% timol) (Paredes-Aguilar *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente estudio, los resultados indicaron un mayor efecto antibacteriano en la fracción con alto contenido de carvacrol (FC, 40% carvacrol, 25% timol) que en la fracción de bajo contenido (FT, 23% carvacrol, 48% timol).

Según Lambert *et al.* (2001) existe un efecto de inhibición aditivo de la mezcla de carvacrol y timol, pero no un efecto sinérgico ni antagónico. Además de los dos principales antibacterianos, puede existir una sinergia con otros compuestos me-

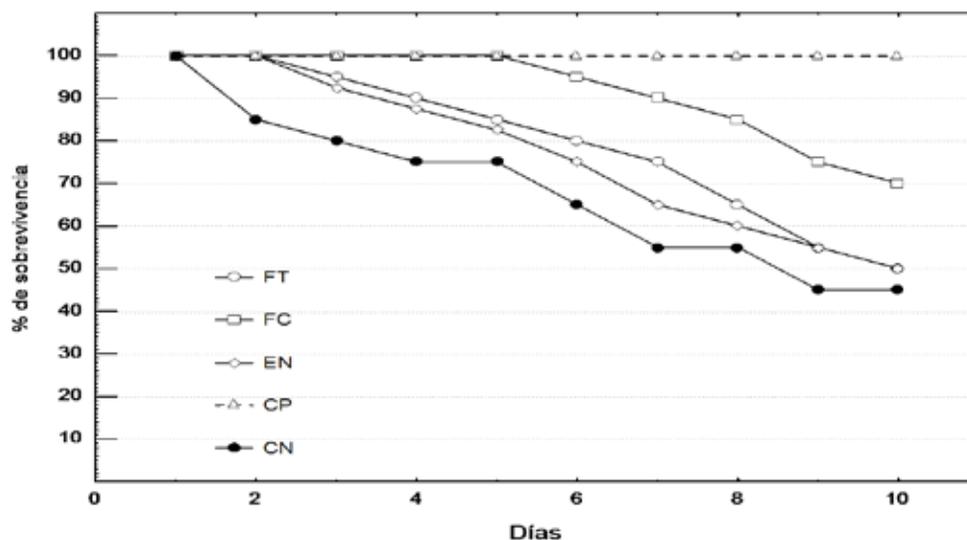


Figura 2. Porcentaje de supervivencia acumulativa de camarones *L. vannamei* pre-infectados con *Vibrio alginolyticus* y expuestos a antibióticos adicionados en el alimento peletizado. Tratamientos: (FT) = Alimento impregnado con aceite esencial de orégano de alto contenido en timol, (FC) = Alimento con aceite esencial de alto contenido en carvacrol, (EN) = Alimento con antibiótico comercial Enrofloxacin, (CP) = Control positivo, alimento sin antibióticos y camarones no pre-infectados con *V. alginolyticus*, (CN) = Control negativo, alimento sin antibióticos y pre-infectados con *V. alginolyticus*. N = 20 camarones por tratamiento.

nores (en cuanto a concentración) como el cimeno, otro de los componentes principales del orégano y que puede potenciar la actividad antibacteriana del carvacrol en patógenos acuícolas (Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010).

Los resultados de CMI y la capacidad anti-infectiva de AEO ante patógenos de camarón, evaluados con base en la supervivencia, también sugieren una capacidad inhibitoria efectiva de este aceite esencial. No obstante, se desconocen los mecanismos específicos por los cuales se lleva a cabo el efecto inhibitorio. La respuesta de inhibición de crecimiento o efecto bactericida por diferentes fracciones de AEO está relacionada con la forma de acción química de los compuestos carvacrol y timol ante las células bacterianas; toda vez que la composición, la estructura, así como el grupo funcional de los aceites juegan un papel importante en la determinación de su actividad antimicrobiana (Celikel & Kavas, 2008). El carvacrol y el timol actúan en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, provocando su desestabilización e incrementando su permeabilidad (Ultee *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2001). La actividad antibiótica de fracciones de AEO está influida además, por la temperatura (Paredes-Aguilar *et al.*, 2007; Burt, 2004), el pH (Juven *et al.*, 1994), la concentración de oxígeno disuelto, el sinergismo entre los componentes antibióticos presentes en la fracción de aceite esencial (Burt, 2004) y la complejidad de las poblaciones bacterianas en donde actúan (Ortega-Morente *et al.*, 2010).

En éste estudio, se encontraron diferencias entre los experimentos *in vitro* e *in vivo*. *In vivo* la supervivencia fue mayor

en la fracción alta en carvacrol mientras que la fracción alta en timol se comportó de manera similar al antibiótico sintético y sin mucha ventaja sobre el control negativo. Adicionalmente, se observó un efecto de la solubilidad tanto del carvacrol como del timol en los diferentes medios. De esta manera dado que el carvacrol es ligeramente más soluble en agua que el timol (Lide, 1998), por ello puede difundirse más rápidamente en el medio de cultivo y por tanto una mayor área de exposición para el contacto con las bacterias. Esta cualidad puede coadyuvar en el mayor efecto antibacteriano observado de la fracción rica en carvacrol (FC) comparado con los resultados de la fracción rica en timol (FT) en las pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se considera necesario realizar otros estudios sobre el mecanismo de acción de los componentes antibacterianos presentes en los extractos naturales y su respuesta específica ante las comunidades bacterianas potencialmente patógenas en ambientes de cultivo, con el fin de conocer su efectividad y alcance como aditivo en alimentos, para la sanidad acuícola. En conclusión, ambas fracciones del extracto de aceite esencial de orégano tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias patógenas del camarón. Además, se corroboró que el extracto esencial de orégano con alto contenido de carvacrol, es una alternativa profiláctica o complemento viable a los antibióticos comerciales, para el tratamiento de camarones en cultivo contra bacterias patógenas u oportunistas principalmente del género *Vibrio*.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por el proyecto SEP-DGEST con clave 3417.10-P. Los autores agradecen al M.C. Ramón Silva Vázquez del Centro de Investigación de los Recursos Naturales por facilitar las fracciones del aceite esencial de orégano.

## REFERENCIAS

- ANDREWS, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (Suppl. 1): 5-16.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (3): 223-253.
- CELIKEL, N. & G. KAVAS. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science* 26 (3): 174-181.
- CITARASU, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18 (3): 403-414.
- GRACIA-VALENZUELA, M. H., L. A. ÁVILA-VILLA, G. YEPÍZ-PLASCENCIA, J. HERNÁNDEZ-LÓPEZ, F. MENDOZA-CANO, G. GARCÍA-SÁNCHEZ & T. GOLLAS-GALVÁN. 2011. Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for use in forced-feeding infection of *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 311 (1-4): 105-109.
- GÓMEZ-GIL, B., F. L. THOMPSON, C. C. THOMPSON & J. SWINGS. 2003. *Vibrio parvulus* sp. nov., from cultured aquatic organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (5): 1569-1573.
- HETTIARACHCHI, M., S. G. PATHIRAGE & D. C. HETTIARACHCHI. 2005. Isolation of bacterium *Vibrio harveyi* from cultured shrimp *Penaeus monodon* and production of vaccines against the bacterium. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 33 (4): 257-263.
- JUVEN, B., J. KANNER, F. SCHVED & H. WEISSLOWICZ. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology* 76 (6): 626-631.
- LAMBERT, R. J. W. 2000. Susceptibility testing: inoculum size dependency of inhibition using the Colworth MIC technique. *Journal of Applied Microbiology* 89 (2): 275-279.
- LAMBERT, R. J. W., P. N. SKANDAMIS, P. J. COOTE & G.-J. E. NYCHAS. 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.
- LIDE, D. R. 1998. *Handbook of Chemistry and Physics*, 87th Edition. CRC Press, Boca Raton, FL. 2608 p.
- ORTEGA-MORENTE, E., H. ABRIQUEL, R. LUCAS-LÓPEZ, N. BEN-OMAR & A. GÁLVEZ. 2010. Antibacterial activity of carvacrol and 2-nitro-1-propanol against single and mixed populations of foodborne pathogenic bacteria in corn flour dough. *Food Microbiology* 27 (2): 274-279.
- PAREDES-AGUILAR, M. C., M. G. GASTÉLUM-FRANCO, R. SILVA-VÁZQUEZ & G. V. NEVÁREZ-MOORILLÓN. 2007. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30 (3): 261-267.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P. & P. PHUMKHACHORN. 2010. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Science* 76 (2): 287-293.
- ROQUE, A., A. MOLINA-AJA, C. BOLÁN-MEJÍA & B. GÓMEZ-GIL. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 383-387.
- SANTIAGO H., M. L., A. ESPINOSA P. & M. DEL C. BERMÚDEZ A. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 4 (3): 22-32.
- ULTEE, A., M. H. J. BENNIK & R. MOEZELAAR. 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.
- XU, W., X. ZHU, X. WANG, L. DENG & G. ZHANG. 2006. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 254 (1-4): 1-8.

Recibido: 14 de septiembre del 2011.

Aceptado: 18 de julio de 2012.