



**Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

SEDE MANABÍ  
CARRERA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

REGULACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA EN  
*Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* MEDIADOS  
POR EL 3,7-DIMENTHYL-2,6-OCTADIENA(CITRAL)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS

SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
MICROBIOLOGÍA

PREVIO AL TÍTULO DE  
BIÓLOGA

**AUTORA:**  
KATHERYN KATIUSKA MENDOZA PALMA

**DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN:**  
FRANCISCO POZO MIRANDA, M.SC

BAHÍA DE CARÁQUEZ, MANABÍ- JUNIO 2023

### **Certificación**

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo los requisitos establecidos por la Dirección de Investigación; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

---

Francisco Pozo Miranda, *Biól., M. Sc.*

Director del trabajo de titulación

CI: 0918330952

## Aprobación del tribunal

El jurado examinador, aprueba el presente manuscrito de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

---

Evelyn Arias Cedeño, *Biól., M. Sc.*

Primera Lectora

---

Ivan Kruger Loor Santana, *Biól., M. Sc.*

Segundo Lector

---

Francisco Pozo Miranda, *M. Sc.*

Tercer lector

Bahía de Caráquez, junio de 2023

### **Declaración de originalidad**

Este manuscrito no contiene ningún tipo de material que ha sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de soporte que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad de autor, quien declara bajo juramento que ninguna sección de este trabajo de integración curricular infringe los derechos de autor de nadie.

---

Katheryn Katiuska Mendoza Palma

CI: 1316853397

Teléfono: 0981809596

mendozakatheryn45@gmail.com

### **Declaración de derechos de autor**

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

---

Katheryn Katiuska Mendoza Palma

CI: 1316853397

## Dedicatoria

Durante en este camino y capítulo de mi vida del cual siento que florecí, me auto descubrí, me maraville por lo observado y aprendido de todo lo que nos rodea, el esfuerzo, sacrificio, los vaivenes de emociones encontrados, la fortaleza y aventuras, no fuera posible llegar donde estoy y vivir todas estas experiencias sin el apoyo y las personas que creyeron en mí y mi potencial, del cual hoy día y siempre tendrán mi gratitud.

A mi mamá Bella Palma Álava quien creyó en mis ideales, me impulso en este camino y me enseñó a nunca desvanecer, del cual siempre sentiré su apoyo, a mi papá Jorge Mendoza Zambrano quien se abstuvo de permitir recorrer este trayectoria sola y de desprender mis propias alas por temor que su pequeño retoño naufragué en el peligro que abunda en el mundo, a mi único hermano José Mendoza Palma, mi héroe sin capa, quien ha estado siempre conmigo, en los peores momentos de mi vida, cual hombro siempre tendré, a Liseth Barcia Miranda quien pocos años entro en nuestra familia, del cual desde entonces me ha visto crecer y ha sido de igual forma un apoyo durante este trayecto, a mis abuelos maternos Rosa Álava Palma y Sebastián Palma Vásquez, mis abuelos paternos Florentina Zambrano Mendoza y José Mendoza Cantos quienes de alguna forma, acción, palabra, gesto me hicieron sentir su apoyo y cariño incondicional en todo este tiempo. Por último, también le dedico este logro con mucho cariño y amor a la alegría de la casa, quien tengo el honor de formar siempre parte de su vida a mi pequeña sobrina y ahijada Flor Amandha Mendoza Barcia, quien aún es muy pequeña para comprender, pero de alguna forma, ocurrencia, gesto “me da luz y calor a mi vivir”. Espero que en algún momento sea su inspiración, pueda ser siempre feliz y encuentre su nicho en esta vida. *“Los quiero mucho desde lo más profundo de mi corazón, estoy muy agradecida con Dios por permitirme ser parte de sus vidas y en su día a día, aunque sea sacándoles una cana verde.”*

## Agradecimiento

Primeramente, quiero comenzar en agradecer a Dios por permitirme vivir esta aventura llamada vida y ponerme en ella personas que día a día de alguna manera me enseñan a hacer mejor persona y profesional.

Este logro y trabajo no fue posible por el cariño y apoyo incondicional por parte de mis seres queridos a mi papá Jorge Mendoza Zambrano, a mi mamá Bella Palma Álava, mi único hermano y gemelo José Mendoza Palma, mi cuñada Liseth Barcia Miranda, a mi preciosa sobrina Flor Amandha Mendoza Barcia.

A mis abuelos maternos: especialmente a mi abuelita Rosa Álava Palma y Sebastián Palma Vásquez quienes antes de cada ida y venida a mi ciudad siempre estaban pendiente de que no me faltará nada y rezaban por mi bienestar, mis abuelos paternos: Florentina Zambrano Mendoza quien paz descanse, sé que en algún lugar donde esté, siempre estará radiando luz y así mismo estaría orgullosa de mí, a mi abuelito José Mendoza Cantos por todo que ha hecho por mí, por su cuidado, cariño y preocupación.

A mis tíos paternos, especialmente a mis tíos Sonia Mendoza y Darwin Peñafiel quienes durante el inicio y final de este trayecto de mi vida me bendijeron y me mostraron su apoyo; a todos mis tíos y primos paternos de primer y segundo grado; a todos mi tíos maternos, especialmente a mi Tía Carmita Palma Álava, Oswaldo, Rosita, Daniel Palma Álava y a mi tío Edwin Quiroz quienes estuvieron siempre apoyándome, aconsejando y felicitándome; a mis primas- hermanas Mayerly y Angelys Quiroz Palma, Daniela Palma Moreira quienes me brindaron constantemente su compañía y ánimos durante esta travesía, espero que algún día puedan cumplir con todo lo que se propongan.

A mis amigos desde muchos años: Joyce Rengifo Macías, Lisette, Angie una de las personas más increíbles que he conocido, que han estado ahí apoyándome y escuchándome, así mismo a Anahís, Fabián y otros que así mismo tienen mi cariño y un lugar en mi corazón; a mis

compañeros y amigos biólogos que la Universidad y carrera me dio el gusto y placer de conocer, especialmente a Lilibeth Intriago, Gabriel Andrade, Brigitte Zambrano, Oswaldo Tejada y Marina Navarrete.

Por último, quiero agradecer a todos mis profesores de la Universidad: Evelyn Arias, Eduardo Barahona, Gabriel Durán, Juan Carlos Murillo, Iván Loor y otros, por impartirme durante la carrera todo su conocimiento y enseñanzas, por abrirme los ojos y ver de manera diferente todo ser vivo y organismos que habite, siendo lo más interesante la más mínima y sencilla cosa. También quiero agradecer infinitamente a mi profesor y tutor de tesis el Mg. Francisco Pozo Miranda por su apoyo, consejo y guía en la realización de este trabajo.

## Resumen

Este estudio mixto comprobó el efecto del citral en la reducción de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio parahaemolyticus*, cuyas bacterias han presentado resistencia a múltiples antibióticos, por lo que se busca comprobar otros compuestos antimicrobianos. Por tanto, en este estudio exploratorio desarrollado en el Campus Bahía de Caráquez de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, desde enero hasta febrero de 2023, se trabajó con las bacterias de *V. parahaemolyticus* y *P. aeruginosa*, exponiéndolas a diferentes concentraciones de citral (0.0; 0.3; 0.6 y 1.2 ppm). Se utilizó el análisis estadístico de varianza *ANOVA* ( $p \leq 0.05$ ) para evaluar los datos recolectados y el método de *Tukey* ( $p \leq 0.05$ ) para tres muestras de los factores de virulencia (crecimiento, movilidad, formación de biopelículas). Los resultados demuestran la capacidad del citral de reducir los factores de virulencia; también determinan que a concentraciones terapéuticas de 0.3 y 0.6 ppm/citral, reduce de forma significativa en el crecimiento en *V. parahaemolyticus* ( $0.146 \pm 0.077$  Abs) y *P. aeruginosa* ( $0.091 \pm 0.036$  Abs). En la movilidad, muestran que *V. parahaemolyticus* disminuye a concentraciones a 0.6 ppm/citral, mientras que para *P. aeruginosa* todas las concentraciones demuestran ser efectivas. En cuanto a la formación de biopelículas, los hallazgos comprueban que el citral reduce a distintas concentraciones aplicadas en los cultivos de *V. parahaemolyticus*, mientras que en *P. aeruginosa* no presenta efecto significativo. Se establece que el citral es eficiente para inhibir los factores de virulencia en *V. parahaemolyticus* y *P. aeruginosa* según las concentraciones aplicadas.

*Palabras clave:* *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, citral, movilidad, biopelícula.

### Abstract

This mixed research study aimed to confirm the effects of citral on lowering the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus*, whose bacteria have developed resistance to several antibiotics, so that this study seeks to prove other antimicrobial compounds. Consequently, this exploratory research study was carried out at *Bahía* Campus of Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí from January to February 2023; *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus* bacteria were exposed to different citral concentrations (0.0; 0.3; 0.6 and 1.2 ppm). Statistical analysis of variance (ANOVA) ( $p \leq 0.05$ ) was used to evaluate collected data, as well as Tukey's method to evaluate three samples of virulence factors (growth, motility and biofilm formation). The findings evidence that citral is able to reduce virulence factors; they also determine that at therapeutic concentrations of 0.3 and 0.6 ppm/citral, citral significantly reduces growth in *V. parahaemolyticus* ( $0.146 \pm 0.077$  Abs) and *P. aeruginosa* ( $0.091 \pm 0.036$  Abs). Regarding motility, the findings show that *V. parahaemolyticus* decreases at concentrations of 0.6 ppm/citral, while all concentrations have proved to be effective for *P. aeruginosa*. About biofilm formation, the findings prove that *V. parahaemolyticus* cultures have effectively decreased by citral at different concentrations, but they do not have a significant effect on *P. aeruginosa*. It is established that citral is able to inhibit the production of virulence factors in *V. parahaemolyticus* and *P. aeruginosa* depending on the different concentrations.

*Keywords:* *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, citral, motility, biofilm

## TABLA CONTENIDO

Introducción.....	13
Metodología.....	16
Obtención de cepas .....	16
Cultivo en medio líquido .....	16
Crecimiento .....	16
Ensayo de motilidad.....	16
Formación de biopelículas.....	17
Morfometría celular .....	17
Análisis estadístico.....	18
Resultados .....	19
Crecimiento .....	19
Movilidad bacteriana.....	20
Formación de biopelículas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> . .....	23
Morfometría celular .....	26
Discusión.....	29
Conclusión.....	31
Bibliografía.....	32

<b>Tabla 1:</b> Tasa de modificación morfológica establecida por enfoque bajo microscopio a lente de 100x.....	26
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

<b>Figura 1:</b> Forma de la célula expuesta a citral. a= forma de bacilo y b= forma circular.....	18
<b>Gráfico 2:</b> Influencia de las distintas concentraciones de citral en el crecimiento bacteriano para definición de concentraciones terapéuticas.....	19
<b>Gráfico 3:</b> Efectividad de las concentraciones terapéuticas de citral en reducción la movilidad bacteriana. ....	20
<b>Figura 3.1:</b> Tratamientos de diferentes concentraciones de citral en <i>vibrio parahaemolyticus</i> . a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm. ....	21
<b>Figura 3.2:</b> Tratamientos de diferentes concentraciones de citral en <i>pseudomona aeruginosa</i> . a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm. ....	22
<b>Gráfico 4:</b> Efecto de diferentes concentraciones de citral en la formación de biopelículas por <i>vibrio parahaemolyticus</i> y <i>pseudomona aeruginosa</i> .....	23
<b>Figura 4.1:</b> Formaciones de biopelículas expuestas a diferentes concentraciones de citral en <i>vibrio parahaemolyticus</i> . a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.....	24
<b>Figura 4.2:</b> Formaciones de biopelículas expuestas a diferentes concentraciones de citral en <i>pseudomona aeruginosa</i> . a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm. ....	25
<b>Figura 5.1:</b> Afectaciones en la morfología celular expuestas a diferentes concentraciones de citral en <i>pseudomona aeruginosa</i> . a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm....	27
<b>Figura 5.2:</b> Cambio en la morfometría celular expuestas a diferentes concentraciones de citral en <i>vibrio parahaemolyticus</i> . a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.	28

## Introducción

Las bacterias marinas provocan enfermedades en los organismos de cultivo mayormente en la producción de camarón. Principalmente ocasionadas por *Pseudomona aeruginosa* y *Vibrio parahaemolyticus* (Calva Pacheco Bianca Pierina, 2021; Morales et al., 2007), por lo que para su prevención o control se han usado múltiples antibióticos. Estos son compuestos sintéticos, que han mostrado afectación a la microbiota intestinal (útil para la degradación de alimentos y producción de ciertos compuestos esenciales para el organismo), del cual al no proporcionarle de manera adecuada y administrar múltiples antibióticos al tratar las enfermedades pueden desarrollar resistencia bacteriana, por lo que es necesario evaluar otros productos (Sandoval et al., 2021) como el citral.

El citral 3,7-dimethyl-2,6-octadiena, proviene de un conjunto de cítricos que se ha probado y aprovechado sus propiedades aromáticas añadidos en productos alimenticios y bebidas (Xu et al., 2022). Además, estudios comprueban su utilidad como antimicrobiano y controlador de factores de virulencia (Sun et al., 2019). Ante la interacción del citral con las bacterias, (Liu et al., 2020) expresa que el citral tiene propiedades que produce inhibición en la formación de biopelícula, además es capaz de reprimir la expresión de genes, también depende de las concentraciones administradas este compuesto puede dañar estructuras celular de las bacterias.

Las bacterias han desarrollado con el tiempo factores que les han permitido invadir y lisar a la célula huésped, obteniendo complementos nutricionales, de las cuales le han permitido sobrevivir dentro de un organismo. Según (Chávez-López, 2021) los factores de virulencia en bacterias conlleva una serie de mecanismos donde participan proteínas y enzimas que contribuyen de manera efectiva a la adherencia, en la invasión, multiplicación y creación de toxinas dentro de las células huéspedes. Menciona (Nüesch-Inderbinen et al., 2021) en su

estudio con *Escherichia coli*, establece que la virulencia proviene de la codificación genética relacionada a la patogenicidad e incluso resistencia a antibióticos.

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria que crece y se desarrolla en medio acuático, se han observado casos donde afecta principalmente en *Penaeus vannamei* (Varela & Choc-Martínez, 2020) provocando debilidad en el individuo siendo incapaz de poder alimentarse. También causa atrofia en algunos órganos y decoloración del hepatopáncreas, hasta es capaz de causar mortalidades desde los 7 días de comenzar el sembrío de camarón (Morales et al., 2007). (Li et al., 2019) menciona que los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* se debe a la producción de hemolisinas, los sistemas de secreción tipo III(T3SS) y (T6SS), factores de adherencia, lipopolisacáridos, la liberación de enzimas de proteasas, del cual, la bacteria produce para así destruir las membranas celulares, lisosomales y otras células que se encuentra en el interior del organismo.

*Pseudomona aeruginosa* es otra bacteria que afecta tanto animales como en personas y plantas, esta especie se encuentran en entornos de agua o sedimento, del cual en sistema acuícola afectan a los animales marinos mayormente peces y crustáceos. En el caso de camarones *Litopenaeus vannamei* infectados con *P. aeruginosa* presentan manchas oscuras en el exoesqueleto y apéndices, tejido muscular con inflamación y necrosis (Calva Pacheco Bianca Pierina, 2021). La efectividad de virulencia de *P. aeruginosa* se debe a los mecanismos que la bacteria ha optado para infectar a sus huéspedes, de las cuales según (Rodulfo et al., 2019) consiste la presencia del pili, flagelos, toxinas, lipopolisacáridos, enzimas proteolíticas y otros.

Estos microorganismos patógenos provocan numerosas mortalidades y al tratar de controlar con diferentes antibióticos, causa en muchos casos que las bacterias adquieren resistencia a estas moléculas antimicrobianas, de ahí la importancia de evaluar otro tipo de moléculas como 3,7-dimethyl-2,6-octadien-2-ol (citral) para atenuar la virulencia de bacterias.

Ante estos antecedentes, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el citral como antimicrobiano para reducir los factores de virulencia mediados en *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, de los cuales se quiere establecer concentraciones de citral mediante pruebas de sensibilidad que permitan identificar concentraciones terapéuticas que reducen la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*; reducir la movilidad y formación de biopelículas de las colonias de bacterias antes mencionadas en presencia de tres concentraciones terapéuticas de citral.

## **Metodología**

### **Obtención de cepas**

Se trabajó con las bacterias de *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales se encuentran en el laboratorio de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Campus Bahía, en el laboratorio de microbiología. Las bacterias se activaron en medio de cultivo Luria-Bertani LB agar (2% NaCl), mediante siembra por estrías, la incubación se efectuó a 30 °C por 24 horas.

### **Cultivo en medio líquido**

Una vez activada la cepa, se procedió a seleccionar una de las colonias para inocular en 20 ml de medio de cultivo líquido fresco de LB al 2% NaCl. La incubación se desarrolló en un baño maría a 30 °C durante 24 horas (Sun et al., 2019).

### **Crecimiento**

Para establecer la capacidad de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa* ante el citral. Se preparó una suspensión bacteriana a densidad óptima (DO) de 1,0 y se inoculó en medio de cultivo LB con distintas concentraciones de citral (0.0, 0.3, 0.6, 1.2 ppm) con 2% de NaCl, luego se incubó 30°C durante 24h (Wang et al., 2021). La unidad de medición fue en absorbancia (Abs) en nm mediante espectrofotometría.

### **Ensayo de motilidad**

Para establecer la movilidad de las colonias de las bacterias, se preparó LB al 0,4 % de agar y 2 % NaCl, se añadió el citral acorde a cada tratamiento (0.0, 0.3, 0.6, 1.2 ppm). Una vez preparado el medio de cultivo se inoculó en el centro de la caja Petri, 3 µl, de suspensión bacteriana a densidad óptica de 1,0. Se incubó a 30 °C durante 24 horas. La movilidad se cuantificó por la medición del halo de crecimiento en mm. Se utilizó 5 réplicas por cada tratamiento.

### **Formación de biopelículas**

Una vez activadas las cepas bacterias, se procedió a realizar la suspensión de cada cepa en un medio líquido, para obtener biomasa celular mediante incubación a 30 °C durante 24 horas a 100 rpm, hasta obtener una D.O. de 1,0. Luego se tomó una alícuota de la suspensión bacteriana y se inoculó en un matraz que contiene 100 ml de medio LB fresco suplementado con 2% NaCl, hasta obtener una densidad celular de 0,1 D.O.

Una vez preparado el medio y la bacteria para evaluar, se añadió a cada tratamiento las concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6, 1.2 ppm/citral. Se dejó en incubación por 24 horas a 30 °C. A continuación, mediante el uso de una aguja de 1 cm<sup>3</sup> se eliminó el medio de cultivo, manteniendo la biopelícula en el tubo, luego los tubos se secaron para teñirlos con cristal violeta (CV) al 0,1% durante 15 min.

Posteriormente, se usó un flujo continuo de agua para eliminar el exceso de cristal violeta y se dejó secar al aire. A continuación, se añadió etanol para solubilizar el CV, finalmente se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría a 620 nm utilizando el espectrofotómetro *YSI 9300*. Cada tratamiento se evaluó con 5 réplicas (Awuor et al., 2022).

### **Morfometría celular**

Se tomó una alícuota de 10 µl de un cultivo *in vitro* expuestas a concentraciones de citral para establecer el efecto en la morfología microbiana. Se colocó sobre un portaobjeto de vidrio, se realizó la tinción con cristal violeta y su visualización se hizo mediante el uso de un microscopio de luz a lente de 80x y 100x, la descripción se hizo como porcentaje % de células en forma de bacilo (alargados) y porcentaje de células en forma circular (esféricas) (figura. 1).

**Figura 1**

*Forma de la célula expuesta a citral. A= forma de bacilo y B= forma circular*

**Análisis estadístico**

A todos los datos se realizó el análisis de normalidad según ShapiroWilk ( $p < 0.05$ ) y homocedasticidad mediante Levene ( $p < 0.05$ ). Una vez cumplido el supuesto de los datos se procedió a realizar en ANOVA ( $p < 0.05$ ) para analizar los datos dependientes de sensibilidad de crecimiento, nivel de formación de biopelícula y movilidad.

Una vez determinado las diferencias significativas se procedió a realizar una prueba de post hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos de cada ensayo serán evaluados mediante SPSS versión 25.

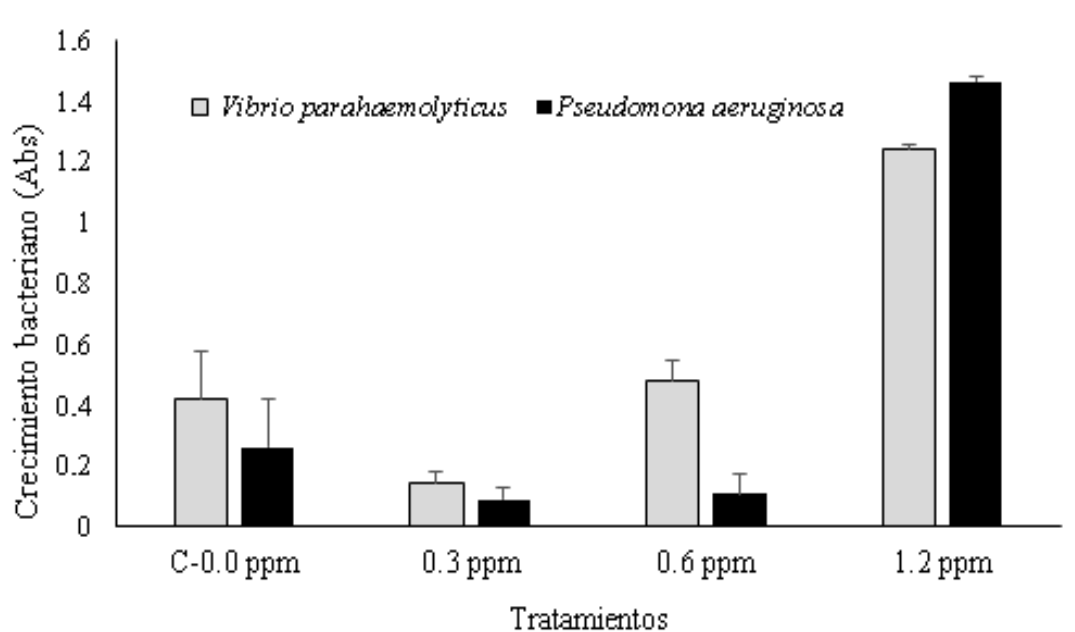
## Resultados

### Crecimiento

Los resultados mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de citral mediante el análisis de ANOVA ( $F=804.68$ ). Mediante el análisis de Tukey ( $p<0.05$ ), se comprobó que existe una reducción significativa en el crecimiento en *Vibrio parahaemolyticus* ( $0.146\pm 0.077$  Abs) y *Pseudomonas aeruginosa* ( $0.091\pm 0.036$  Abs) a 0.3 ppm y 0.6 ppm de citral (*Vibrio parahaemolyticus*  $0.479\pm 0.043$  Abs y *Pseudomonas aeruginosa*  $0.107\pm 0.067$  Abs). Mientras que, a concentración de 1.2 ppm elevó el crecimiento bacteriano de forma significativa ( $p<0.05$ ). Así *Vibrio parahaemolyticus* incrementó hasta  $1.24\pm 0.015$  Abs y *Pseudomonas aeruginosa*  $1.464\pm 0.02$  Abs como se muestra en la gráfico 2.

### Gráfico 2

*Influencia de las distintas concentraciones de citral en el crecimiento bacteriano para definición de concentraciones terapéuticas.*



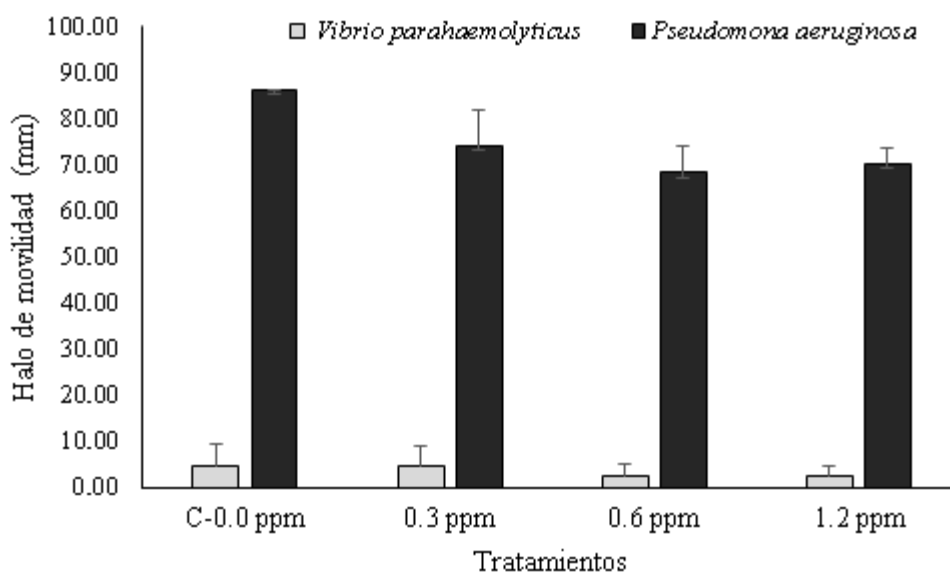
## Movilidad bacteriana

Los datos de movilidad evaluados mediante el análisis estadístico de ANOVA ( $F= 33.27$ ) mostraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en las bacterias de ensayo. En *Vibrio parahaemolyticus* se pudo establecer que concentraciones de 1.2 ppm logró reducir significativamente (Tukey  $p \leq 0.05$ ) la movilidad microbiana a  $2.31 \pm 2.31$  mm comparado con el control  $4.62 \pm 4.62$  mm.

Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* presentó niveles bajos de movilidad en todas las concentraciones evaluadas respecto al control ( $86.0 \pm 0.00$  mm) (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (gráfico 3). En consecuencia, a concentraciones medias (0.6 ppm/citral) se observa reducción de la movilidad bacteriana en *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* todas las concentraciones fueron efectivas (gráfico 3) y (figura 1.1 y 1.2).

### Gráfico 3

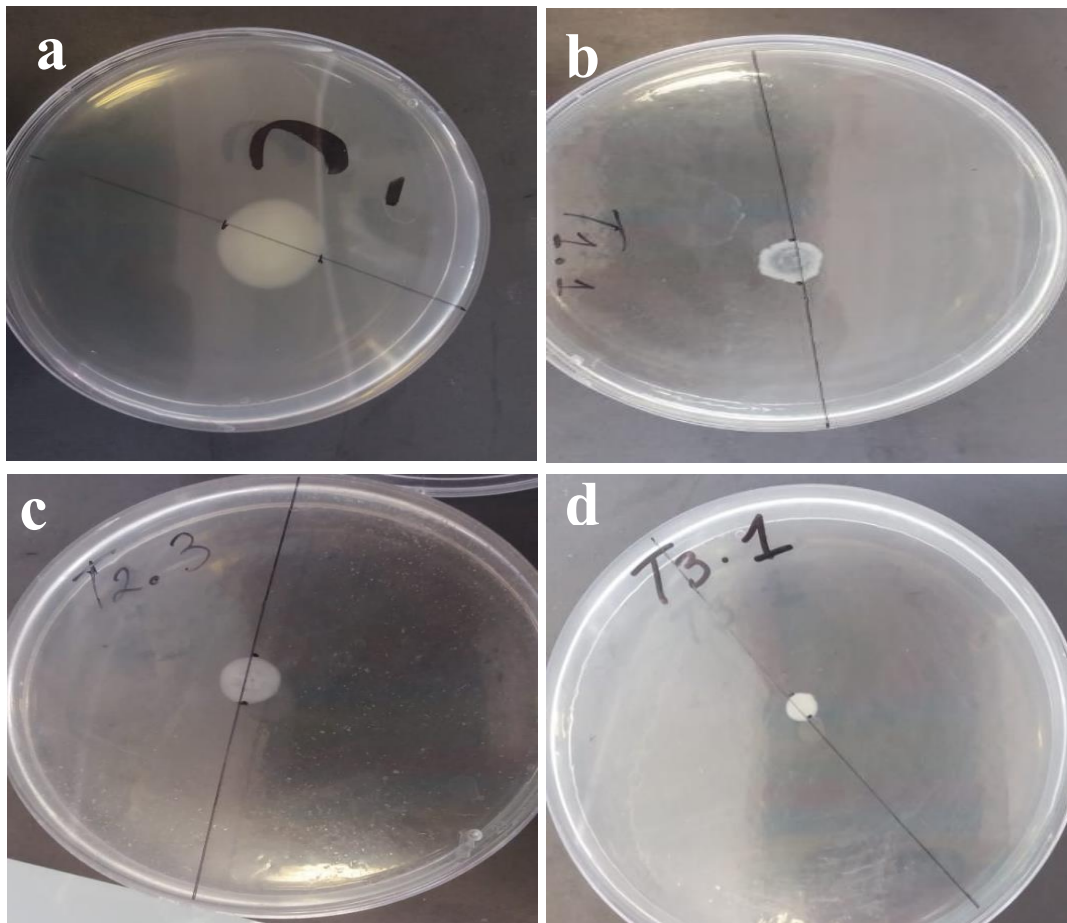
*Efectividad de las concentraciones terapéuticas de citral en reducción la movilidad bacteriana.*



**Figura 3.1**

*Tratamientos de diferentes concentraciones de citral en Vibrio parahaemolyticus.*

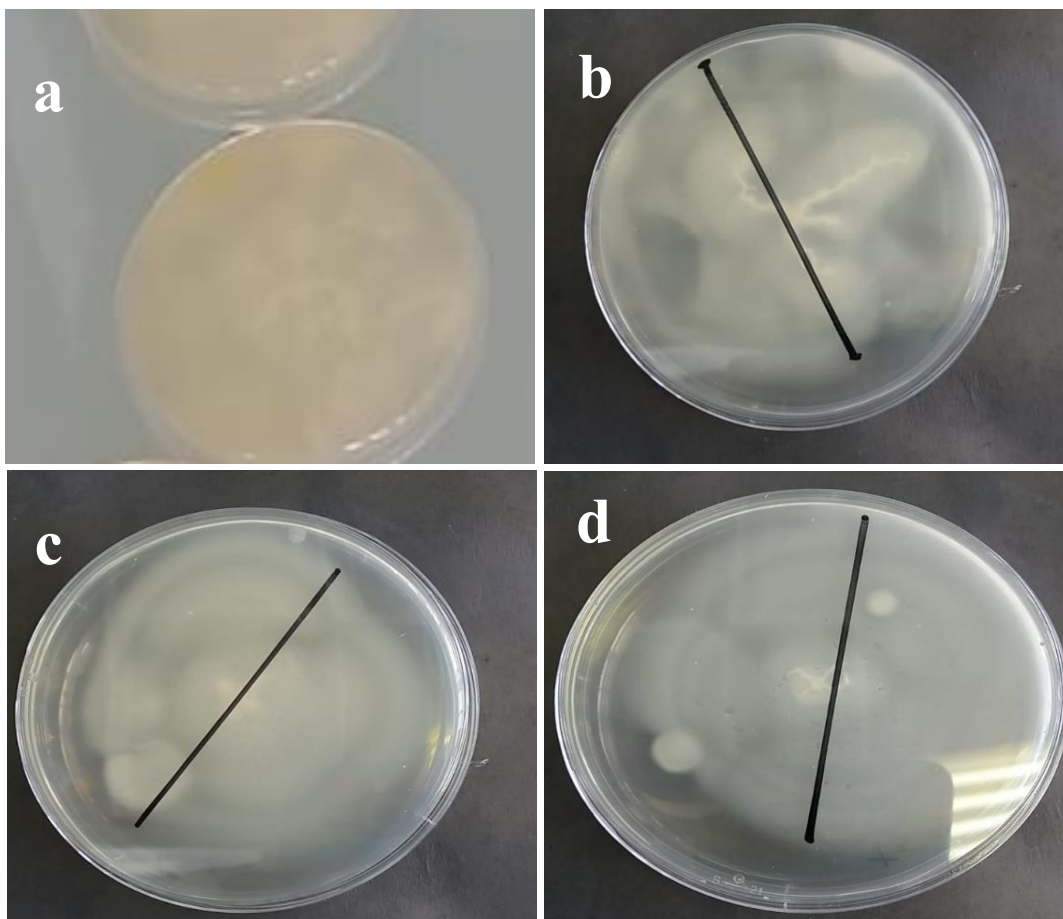
*a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.*



**Figura 3.2**

*Tratamientos de diferentes concentraciones de citral en Pseudomona aeruginosa.*

*a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.*

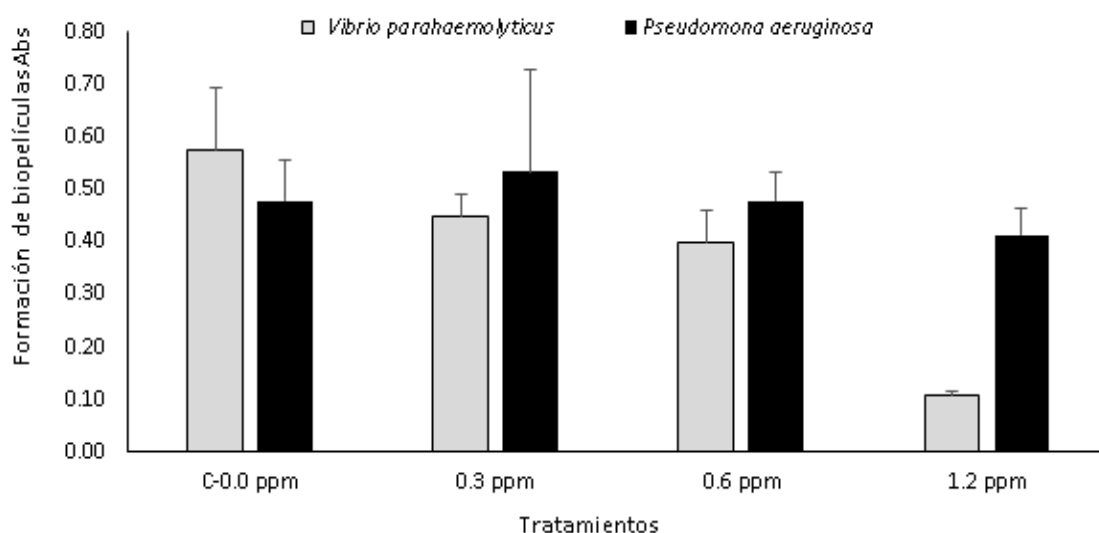


### Formación de biopelículas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En la comprobación del citral como reductor en la formación de biopelículas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, según el análisis de ANOVA ( $F=44.94$ ) se demostró que el citral provoca la reducción significativa en la formación de biopelículas a distintas concentraciones aplicadas en cultivos de *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* no presentó efecto significativo en la reducción de biopelículas (gráfico 4) y (figura 4.1 y 4.2). Así, *Vibrio parahaemolyticus* disminuye la formación de biopelículas a concentración de 1.2 ppm ( $0.11 \pm 0.01$  Abs) siendo significativamente diferente a los otros tratamientos (Tukey  $p < 0.05$ ).

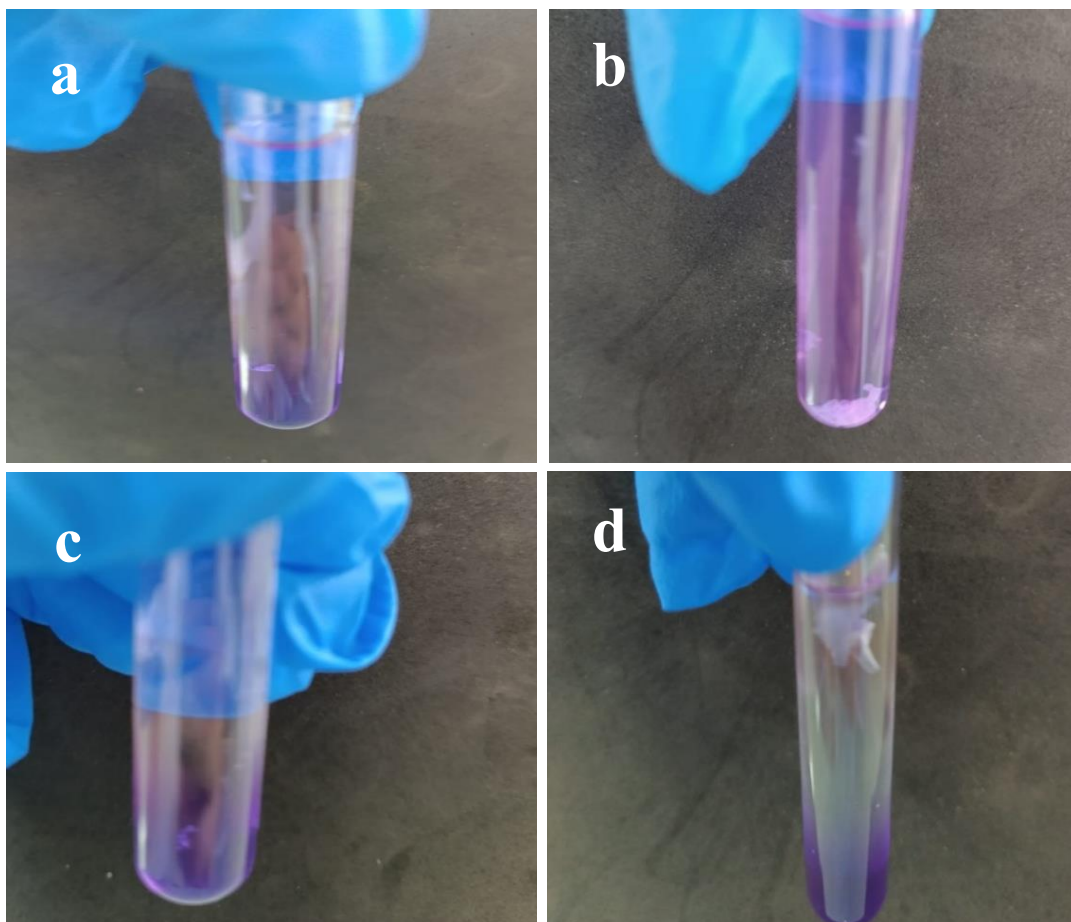
#### Gráfico 4

Efecto de diferentes concentraciones de citral en la formación de biopelículas por *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*.



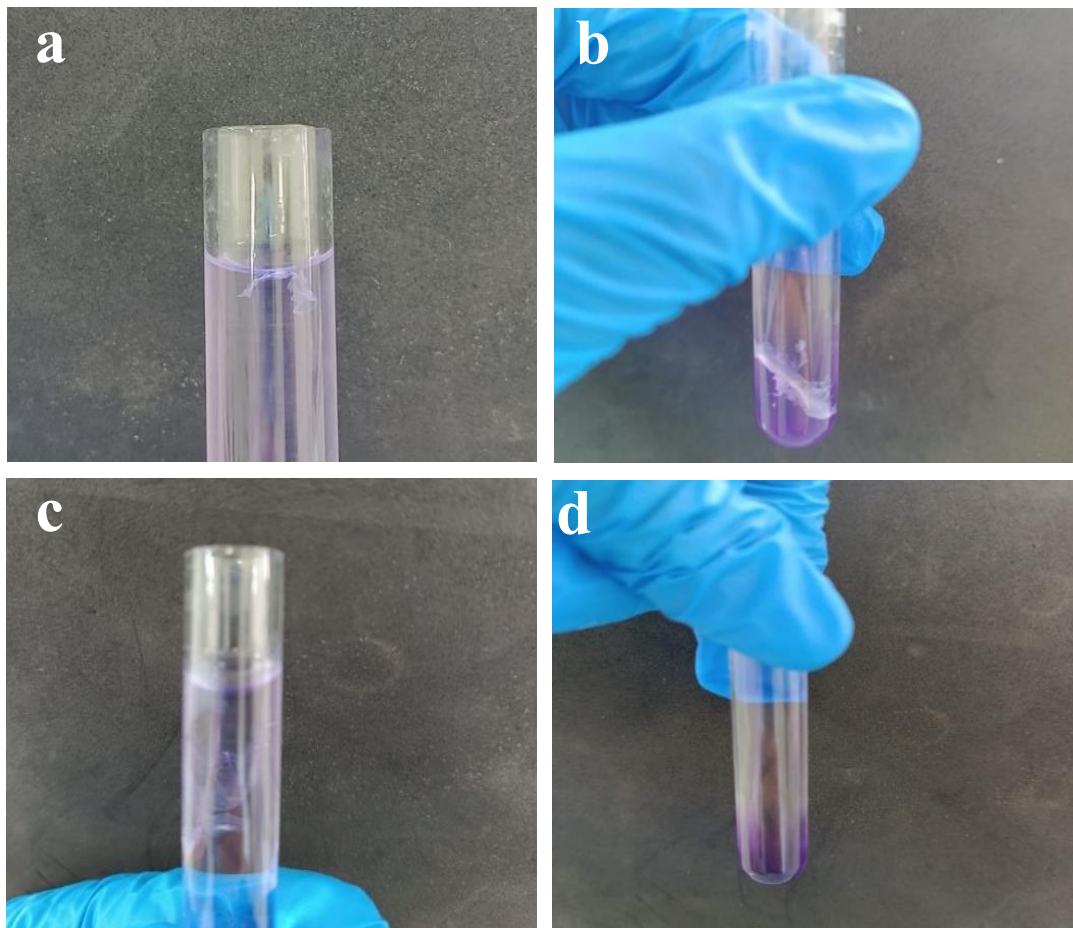
**Figura 4.1**

*Formaciones de biopelículas expuestas a diferentes concentraciones de citral en Vibrio parahaemolyticus. a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.*



**Figura 4.2**

*Formaciones de biopelículas expuestas a diferentes concentraciones de citral en Pseudomonas aeruginosa. a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.*



### Morfometría celular

La evaluación de cultivos realizado a 24 h de *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomona aeruginosa*, se observó mediante microscopia el efecto en la morfología microbiana que fueron expuestas citral. *Pseudomona aeruginosa* presentó un mayor cambio en su estructura a concentraciones de 0.6 ppm, se observó que el 70% de la población de células perdieron la forma de bacilos, cambiando a una estructura semicircular (figura 5.1). Sin embargo, en *Vibrio parahaemolyticus* existió modificación de bacilo a semicircular a 0.3 y 0.6 ppm de ppm (tabla 1) y (figura 5.2).

**Tabla 1**

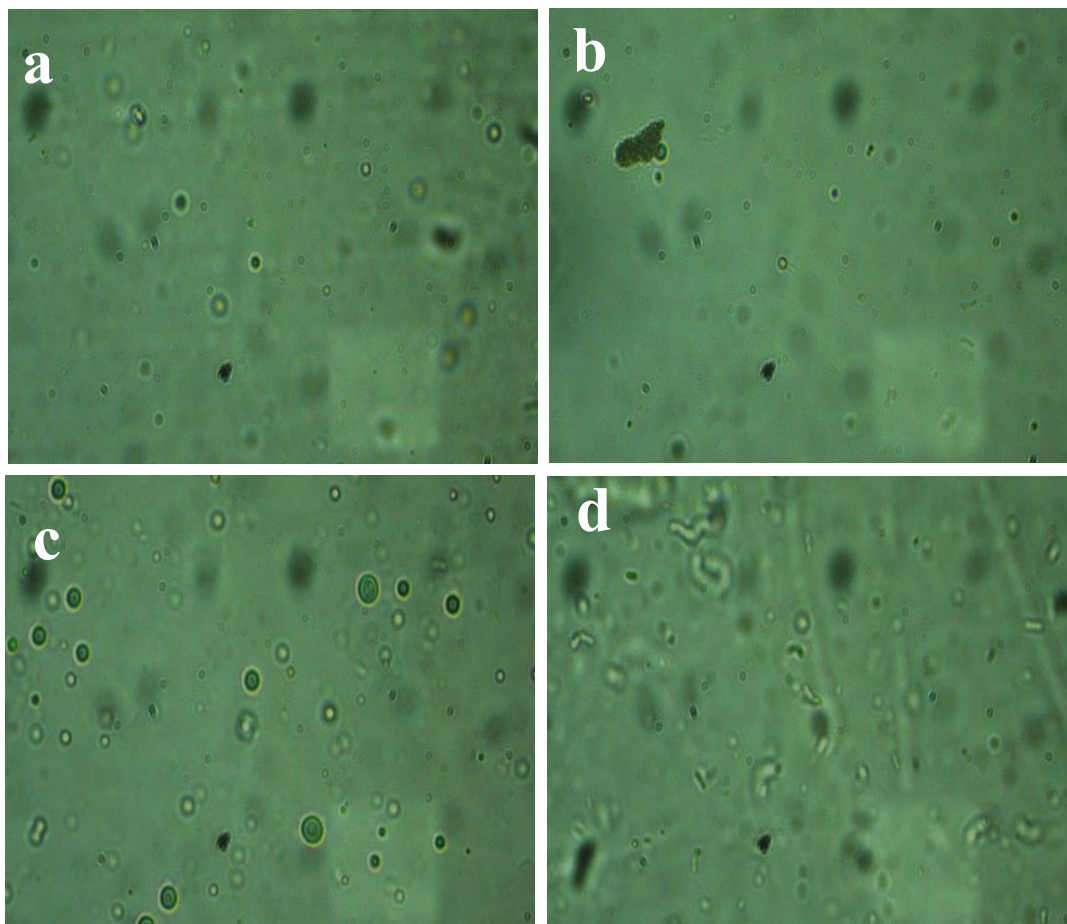
*Tasa de modificación morfológica establecida por enfoque bajo microscopio a lente de 100x.*

	<i>Pseudomona aeruginosa</i> %	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> %
Control	50	50
0.0 ppm		
0.3 ppm	40	80
0.6 ppm	70	90
1.2 ppm	40	70

**Figura 5.1**

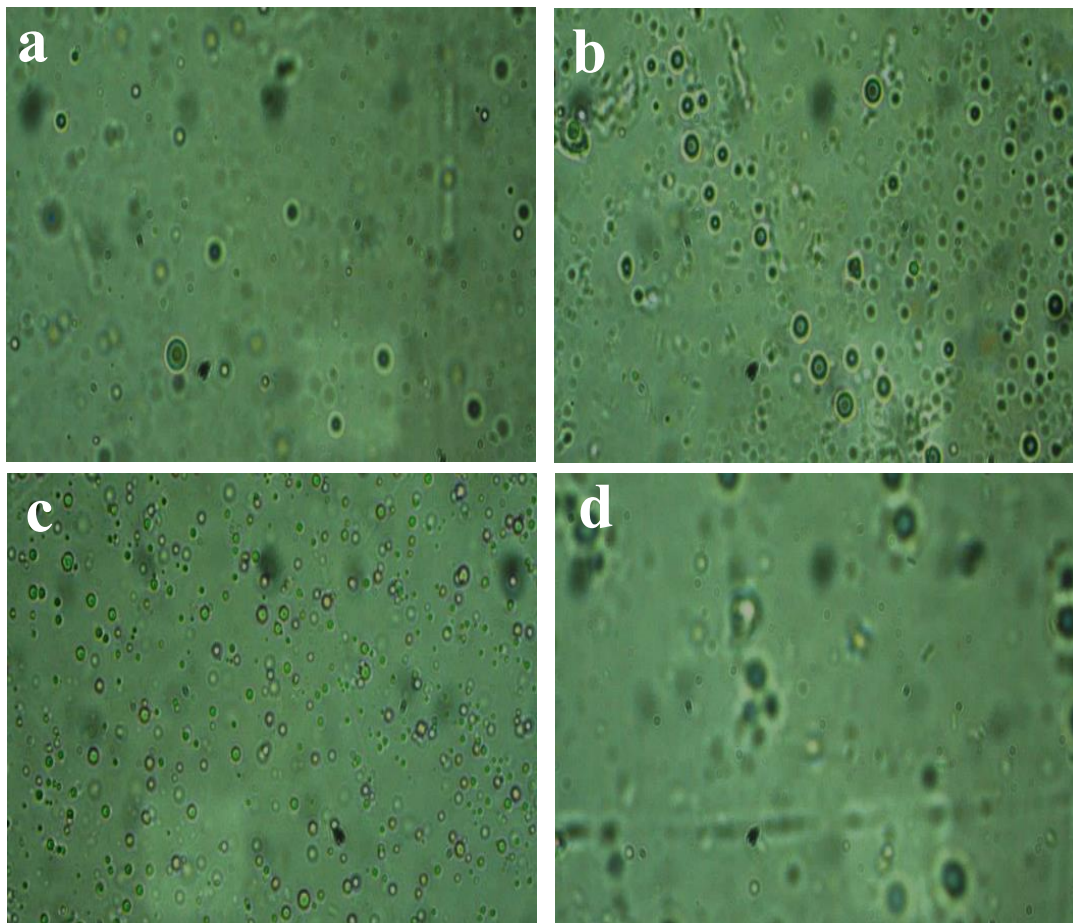
Afectaciones en la morfología celular expuestas a diferentes concentraciones de citral en

*Pseudomonas aeruginosa*. a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.



**Figura 5.2**

Cambio en la morfometría celular expuestas a diferentes concentraciones de citral en *Vibrio parahaemolyticus*. *a=control 0.0 ppm, b= 0.3 ppm, c=0.6 ppm, d=1.2 ppm.*



## Discusión

*Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomona aeruginosa* son bacterias que han generado brotes de enfermedades en cultivo de camarón de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus vannamei* de lo que ha causado numerosas pérdidas económica en la producción, de allí se es necesario tratamientos que permitan reducir la problemática.

Actualmente se ha trabajado con moléculas que no matan la bacteria pero que permiten reducir la virulencia. Estudios han comprobado la efectividad del citral en la reducción de los factores de virulencias y antimicrobiano en bacterias (Sun et al., 2019).

El presente estudio demostró que concentraciones bajas de citral inhiben el crecimiento bacteriano principalmente en *Pseudomona aeruginosa*, esta actividad fue confirmada por (Tetard et al., 2021) quien detalla que concentraciones de citral de 4 a 2mg/ml detiene la multiplicación bacteriana. Así, ensayos con citral derivado de aceites de limón evaluados en *Vibrio parahaemolyticus*, ha funcionado en la reducción de biopelícula, además de minimizar la movilidad, la natación de la bacteria (Sun et al., 2019) y la actividad microbiana (Zheng et al., 2020).

(Luciardi et al., 2021), expresa que la efectividad en la reducción de la formación de biopelículas expuestos a compuestos de aceite de limón genera inhibición de más del 50% de la movilidad bacteriana. Indicando que la pureza del aceite de limón potenciaba la efectividad de inhibir algunas actividades de la célula, como lo confirmó (Utcharykiat et al., 2016) en ensayos con aceite de limoncillo y limón, actividad similar se observa en combinación citral/CINa (Lu et al., 2023) y citral/borneol (Wang et al., 2022).

La capacidad antibacterial y/o reducción de movilidad ocasionada por el citral se debería al deterioro de la pared y membrana celular, así como la reducción de polisacáridos extracelulares y hemolisinas, mediante la disminución de la transcripción de los sistemas de secreción tipo III y VI dependiente de la detección quorum sensing (Cao et al., 2021).

Sin embargo, cuando incremento la concentración de citral notamos también un incremento en el número de células. Posiblemente la fisiología bacteriana ante el estrés por la presencia alta de citral activa la capacidad de la bomba de expulsión y enzimas complementarias al sistema de salida en el operón de la bomba de flujo multidrogas AB ligado a la enzima 12-oxo-phytodienoic acid reductase (MexAB) de la proteína de la membrana externa (OprM). Del cual, le permite resistencia bacteriana al expulsar al exterior sustancias extrañas (Andrés Gómez Álvarez et al., 2005; Pesingi et al., 2019), cuya regulación es solo controlada por represores transcripcionales (MExR, NalD y NalC) que contiene el antirrepresor gen MexR para reducir la expresión de la bomba de salida (Aguilar-Rodea et al., 2022). Por otro lado, se ha reportado que bacterias como *Pseudomona aeruginosa* poseen la propiedad de degradación de compuestos derivados de citral (isoprenoides acíclicos) como fuente de energía (Cantwell et al., 1978). Así, tanto el control de la bomba de flujo o el uso de citral como fuente de energía podría explicar el crecimiento bacteriano y la poca efectividad sobre la virulencia a concentraciones altas de citral.

En cuanto a la modificación morfológica de las bacterias, se conoce que *Pseudomona aeruginosa* y *Vibrio parahaemolyticus* son en formas de bacilos rectos o ligeramente curvados, pero al observarlos se notó el cambio de bacilos alargados o curvos a una forma circular; posiblemente sería la reacción de las bacterias ante el estrés celular frente a las concentraciones elevadas de citral. Según (Shi et al., 2016), indican que el citral es capaz de dañar la membrana celular, reducir la pili y provocar hiperpolarización (cambio de la membrana) de la bacteria, esto provocaría modificación de la morfología celular lo cual podría reducir su capacidad de formar biopelícula y disminuir la virulencia.

### Conclusión

Las bacterias *Pseudomona aeruginosa* y *Vibrio parahaemolyticus* provocan enfermedades que reducen la supervivencia en la producción de camarones, por lo cual se comprobó la eficiencia del citral como agente terapéutico, así se concluyó que;

-El citral es útil y eficiente para inhibir los factores de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomona aeruginosa*, por lo cual se estableció concentraciones terapéuticas a 0.3 ppm; 0.6 ppm y 1.2 ppm.

-Se determinó que a concentraciones de 0.6 ppm citral reduce la movilidad bacteriana en *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que para *Pseudomona aeruginosa* todas las concentraciones tuvo efectividad.

-Finalmente, se demostró mayor efectividad en la disminución de la formación de biopelículas en *Vibrio parahaemolyticus* a concentraciones de 1.2 ppm que en *Pseudomona aeruginosa*.

### Bibliografía

- Aguilar-Rodea, P., Zúñiga, G., Cerritos, R., Rodríguez-Espino, B. A., Gomez-Ramirez, U., Nolasco-Romero, C. G., López-Marceliano, B., Rodea, G. E., Mendoza-Elizalde, S., Reyes-López, A., Clavijo, H. O., Galindo, J. C. V., Velázquez-Guadarrama, N., & Rosas-Pérez, I. (2022). Nucleotide substitutions in the mexR, nalC and nalD regulator genes of the MexAB-OprM efflux pump are maintained in *Pseudomonas aeruginosa* genetic lineages. *PLoS ONE*, *17*(5).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0266742>
- Andrés Gómez Álvarez, C., Lucía, A., Castro, L., De Jesús Pérez De Gonzalez, M., Lucía, M., & Jiménez, N. (2005). MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ENTENDIENDO A UN PELIGROSO ENEMIGO. *Revista de La Facultad de Medicina*, *53*(1), 27–34.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-00112005000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Awuor, S. O., Omwenga, E. O., Mariita, R. M., & Daud, I. I. (2022). Cholera outbreak: antibiofilm activity, profiling of antibiotic-resistant genes and virulence factors of toxigenic *Vibrio cholerae* isolates reveals concerning traits. *Access Microbiology*, *4*(3). <https://doi.org/10.1099/ACMI.0.000324>
- Calva Pacheco Bianca Pierina. (2021). *Universidad Central Del Ecuador Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia Carrera De Medicina Veterinaria y Zootecnia*.  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25038/1/UCE-FMVZ-SUB-MORENO JONATHAN.pdf>
- Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S., & Fall, R. R. (1978). Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology*, *135*(2), 324.  
<https://doi.org/10.1128/JB.135.2.324-333.1978>

- Cao, J., Liu, H., Wang, Y., He, X., Jiang, H., Yao, J., Xia, F., Zhao, Y., & Chen, X. (2021). Antimicrobial and antivirulence efficacies of citral against foodborne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633. *Food Control*, 120. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107507>
- Chávez-López, C. (2021). Factores de Virulencia. *News Medical*, August. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35321.13927>
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., & Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 222, 43–51. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2019.03.003>
- 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, 734578. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734578>
- Lu, H., Sun, Y., Wang, X., Lu, Z., & Zhu, J. (2023). Transcriptomics reveal the antibiofilm mechanism of NaCl combined with citral against *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(1), 313–326. <https://doi.org/10.1007/S00253-022-12286-2>
- Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Alberto, M. R., Cartagena, E., & Arena, M. E. (2021). Lemon Oils Attenuate the Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by Quorum Sensing Inhibition. *Molecules*, 26(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26102863>
- Morales, V., Cuéllar-Anjel, Q. J., Cuéllar-Anjel, J., Pantoja, C., Lightner, D. V, Moura, A., Pereira, L., Mendes, E. S., Cristina, T., Gesteira, V., Arns, V., Silva, D., Benedita, A., María, P., Morales-Covarrubias, S., Gómez, B., Margherita, G. R., Luciane, A. B.,

- Perazzolo, M., ... Suárez, G. (2007). *Guía Técnica Patología e Inmunología De Camarones Penaideos*.
- Nüesch-Inderbinen, M., Stevens, M. J. A., Cernela, N., Müller, A., Biggel, M., & Stephan, R. (2021). Distribution of virulence factors, antimicrobial resistance genes and phylogenetic relatedness among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O91 from human infections. *International Journal of Medical Microbiology*, *311*(8), 151541. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2021.151541>
- Pesingi, P. V., Singh, B. R., Pesingi, P. K., Bhardwaj, M., Singh, S. V., Kumawat, M., Sinha, D. K., & Gandham, R. K. (2019). MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Offers Resistance to Carvacrol: A Herbal Antimicrobial Agent. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02664/FULL>
- Rodulfo, H., Arcia, A., Hernández, A., Michelli, E., Del Valle Martínez, D., Guzman, M., Sharma, A., & De Donato, M. (2019). Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDRphenotypes in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a Venezuelan university hospital. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *61*. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961020>
- Sandoval, R., de Lourdes Patricia, M., Pérez, L., Ramírez, V., & Adriana, M. (2021). Antibióticos y disbiosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, *41*(3), 118–122.
- Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., Jia, Z., Sun, H., Sun, Z., & Xia, X. X. (2016). Antimicrobial Activity and Possible Mechanism of Action of Citral against *Cronobacter sakazakii*. *PloS One*, *11*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0159006>
- Sun, Y., Guo, D., Hua, Z., Sun, H., Zheng, Z., Xia, X., & Shi, C. (2019). Attenuation of Multiple *Vibrio parahaemolyticus* Virulence Factors by Citral. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR), 894. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00894>

- Tetard, A., Foley, S., Mislin, G. L. A., Brunel, J. M., Oliva, E., Torrealba Anzola, F., Zedet, A., Cardey, B., Pellequer, Y., Ramseyer, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2021). Negative Impact of Citral on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.709838/FULL>
- Utcharykiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P., & Chomnawang, M. T. (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S12906-016-1134-9>
- Varela, A., & Choc-Martínez, L. F. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *31*(3), e18165. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>
- Wang, W., Bao, X., Bové, M., Rigole, P., Meng, X., Su, J., & Coenye, T. (2022). Antibiofilm Activities of Borneol-Citral-Loaded Pickering Emulsions against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Physiologically Relevant Chronic Infection Models. *Microbiology Spectrum*, *10*(5). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01696-22>
- Wang, W., Ren, Z., Wang, L., Cai, Y., Ma, H., Fang, L., & Su, J. (2021). Nanoparticle-stabilized encapsulation of borneol and citral: Physicochemical characteristics, storage stability, and enhanced antibacterial activities. *Journal of Food Science*, *86*(10), 4554–4565. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15910>
- Xu, R., Deng, W., Dai, Y., & Hu, J. (2022). pH-responsive citral microcapsules with tannic acid-FeIII coordination complexes. *Food Chemistry*, *397*, 133715. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133715>

Zheng, X., Feyaerts, A. F., Dijck, P. Van, & Bossier, P. (2020). Inhibitory Activity of Essential Oils against *Vibrio campbellii* and *Vibrio parahaemolyticus*.

*Microorganisms*, 8(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8121946>