

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL
MAR



Efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*

TESIS

Para obtener el título profesional de Ingeniero Pesquero

Br. Gianmarco David Mendoza Noblecilla

Tumbes, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL
MAR



**Efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo*
de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei***

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

PRESIDENTE

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

SECRETARIO

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila

VOCAL

Tumbes, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL
MAR



**Efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo*
de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei***

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y
forma

Br. Gianmarco David Mendoza Noblecilla

AUTOR

Dr. Alberto Ordinola Zapata

ASESOR

Tumbes, 2023



“Año de la Unidad, la Paz y el Desarrollo”

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los veinte días del mes abril del dos mil veintitrés, siendo las diez horas, en la modalidad virtual, a través de la plataforma Google meet, cuyo link es <http://meet.google.com/ptz-apkh-sgy>, se reunieron el Jurado Calificador de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, designado por **Resolución N° 008-2023/UNTUMBES-FIPC-D**, Dr. **OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA (Presidente)**, Dr. **AUBERTO HIDALGO MOGOLLON (Secretario)** y Dr. **DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA (Vocal)**, reconociendo en la misma resolución al **Dr. Alberto Ordinola Zapata** como asesor (CODIGO ORCID N° 0000-0002-9644-0531), luego de la presentación, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: “Efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento in vitro e in vivo de *Vibrio sp.* en *Litopenaeus vannamei*”, para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO, presentado por el:

Br. GIANMARCO DAVID MENDOZA NOBLECILLA

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al Bachiller **GIANMARCO DAVID MENDOZA NOBLECILLA**, **APROBADO** con calificativo **BUENO**

Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el Jurado le indica.

En consecuencia, queda **APTO** para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Pesquero, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las once horas y cuatro minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica en forma virtual, procediendo a firmar el acta de sustentación.

Tumbes, 20 de abril del 2023

Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA
CODIGO ORCID N° 0000-0002-9637-6250
DNI. N° 00201986
Presidente

Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON
CODIGO DE ORCID N° 0000-0003-2921-4523
DNI. N° 00250460
Secretario

Dr. DAVID E. SALDARRIAGA YACILA
CODIGO ORCID N° 0000-0002-4919-8607
DNI. N° 00320699
Vocal

C.C.:

- Jurado (03)
- Interesado

- Asesor: Dr. A. Ordinola Z.
- Archivo Decanato.

INFORME RESUMIDO DE TURNITIN

Tesis Gianmarco David Mendoza Noblecilla

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%	14%	6%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE


FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	7%
2	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	repositorio.ucss.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	zagan.unizar.es Fuente de Internet	1%
5	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	<1%



Dr. Alberto Ordinala Zamata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

10	www.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
11	repositorio.uma.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
13	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	repositorio.uoosevelt.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1 %
17	Mohsen Soleimani, Ahmad Arzani, Vida Arzani, Thomas H. Roberts. "Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme", Journal of Herbal Medicine, 2022 Publicación	<1 %
18	Diana Rosabel Mogrovejo-Durán, Darwin Gabriel García-Herrera. "Efecto de la edad relativa en el Judo", Revista Arbitrada Interdisciplinaria Koinonía, 2021 Publicación	<1 %


Dr. Alberto Ordinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

19 Meza Martínez Leonardo Ali. "Cinética de degradación del aceite esencial de menta y jengibre nanoencapsulado en la pasteurización UV-C de jugo de uva verde", TESIUNAM, 2022
Publicación <1 %

20 acikbilim.yok.gov.tr
Fuente de Internet <1 %

21 www.dspace.uce.edu.ec
Fuente de Internet <1 %

22 www.mir.es
Fuente de Internet <1 %

23 core.ac.uk
Fuente de Internet <1 %

24 García Gasca Héctor Adrián. "Características fisicoquímicas de membranas en un modelo de tumor renal de ratas Wistar diabéticas", TESIUNAM, 2021
Publicación <1 %

25 Revilla Nava Sandra Selene. "Fitoterapia como una alternativa en odontopediatría", TESIUNAM, 2005
Publicación <1 %

26 repositorio.unesp.br
Fuente de Internet <1 %

repositorio.upct.es


Dr. Alberto Ordóñez Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

27	Fuente de Internet	<1 %
28	Kit Shing Liew, Annita Seok Kian Yong, Leong-Seng Lim, Gunzo Kawamura. " Dietary sugarcane juice as a feeding stimulant for the purple mud crab ", Aquaculture Research, 2020 Publicación	<1 %
29	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
30	pucedspace.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
31	Montiel Cervantes Karen Lizbeth. "Revisión química y farmacológica de la especie medicinal Justicia Spicigera Schltl : una aproximación a su revalorización en la medicina tradicional de México", TESIUNAM, 2022 Publicación	<1 %
32	ciad.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %
33	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
34	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %


 Dr. Alberto Ardínola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
 Docente Asesor

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 15 words



Dr. Alberto Cardinola Zapata
<https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>
Docente Asesor

DEDICATORIA

A mi familia que unida me apoyo en todo y de la que estoy seguro, siempre contaré con su protección y ayuda,

A mi madre, Sra. Ana María Noblecilla Castro, quien me brindó su esfuerzo y sacrificio toda la vida.

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a:

La Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES, a través de sus docentes, quienes compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia durante el transcurso de mis estudios profesionales.

A mi asesor Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su amistad y por brindarme la confianza para poder acceder a sus conocimientos y su experiencia científica, así como por sus aportes y sugerencias que resultaron fundamentales para la culminación de esta tesis.

A los docentes integrantes de mi Jurado de tesis: Dr. Oscar A. Mendoza Neyra, Dr. Leocadio Malca Acuña y Dr. David E. Saldarriaga Yacila, así como al ex presidente de mi Jurado Dr. Adán Alvarado Bernuy (Q.E.P.D.) por sus valiosas recomendaciones para mejorar esta tesis.

Así mismo agradezco a mis amistades por el permanente apoyo y sus palabras de aliento, durante todo el lapso de mis estudios superiores.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	xvi
Abstract.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	18
II. REVISIÓN DE LITERATURA	20
2.1. Enfermedades en la acuicultura	20
2.2. Utilización de antibióticos en cultivos de langostino.....	20
2.3. Bacterias del género <i>Vibrio</i>	21
2.4. Resistencia antibiótica de <i>Vibrio</i> spp.	22
2.5. Fitobióticos como alternativa a los antibióticos	23
2.6. Aceites esenciales.....	23
2.7. Aceite esencial de menta	24
2.8. Propiedades inmunoestimulantes del aceite esencial de menta	25
2.9. Investigaciones relacionadas al uso de aceite esencial de menta y otras plantas como antibacterianos	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. Métodos	30
3.1.1 Ubicación del lugar de ejecución.....	30
3.1.2. Extracción de la esencia de <i>Mentha piperita</i>	31
A. Extracción en baño maría	31
B. Extracción por maceración	31
3.1.3 Preparación de medios de cultivo y materiales	31
3.1.4 Obtención de langostinos.....	32
3.1.5 Obtención de muestras para el cultivo bacteriano.....	32
3.1.6 Purificación de cepas bacterianas.....	33

3.1.7	Preparación de discos de papel filtro impregnados en esencia de <i>Mentha piperita</i>	33
3.1.8	Preparación de las cepas de <i>Vibrio</i> spp.	34
3.1.9	Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Vibrio</i> spp. con esencia de <i>Mentha piperita</i>	34
3.1.10	Ensayo de inhibición de <i>Vibrio</i> spp. <i>in vivo</i>	35
3.1.11	Aplicación de la esencia de <i>Mentha piperita</i> y de la oxitetraciclina al alimento balanceado	36
3.1.12	Alimentación de los langostinos	36
3.1.13	Registro del crecimiento del langostino	36
3.1.14	Recuento de colonias de <i>Vibrio</i> spp.	37
3.1.15	Análisis estadístico	37
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1.	Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Vibrio</i> spp. usando esencia de menta	39
4.2.	Supervivencia de langostinos infectados con <i>Vibrio</i> spp. <i>in vivo</i> y tratados con esencia de menta.....	43
4.3.	Crecimiento de langostinos infectados experimentalmente con <i>Vibrio</i> spp. y tratados con esencia de menta	45
4.4.	Número de colonias de <i>Vibrio</i> spp. en hepatopáncreas de langostinos infectados experimentalmente	47
V.	CONCLUSIONES	50
VI.	RECOMENDACIONES.....	51
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diámetro (mm) de los halos de inhibición en <i>Vibrio</i> spp. producidos por la esencia de menta obtenido por maceración en aceite de oliva	39
Tabla 2. Diámetro (mm) de los halos de inhibición en <i>Vibrio</i> spp. producidos por la esencia obtenida con extracción etanólica de menta procesada en baño maría.....	40
Tabla 3. Diámetro (mm) de los halos de inhibición de <i>Vibrio</i> spp. producidos por la esencia de menta obtenida como extracto de menta en aceite de oliva procesada en baño maría.....	41
Tabla 4. Supervivencia (%) de langostinos durante el ensayo <i>in vivo</i>	44
Tabla 5. Crecimiento en peso (g) de los langostinos durante el ensayo <i>in vivo</i>	46
Tabla 6. Registro de supervivencia de langostino infectado experimentalmente con <i>Vibrio</i> spp. según tratamiento y repetición	65
Tabla 7. Peso promedio (g) de langostinos infectados experimentalmente con <i>Vibrio</i> spp. por tiempo de cultivo y según tratamiento y repetición.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Lugar de ejecución de la investigación (Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES)	30
Figura 2. Diámetro promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por los diferentes tipos y dosis de esencia de menta en <i>Vibrio</i> spp.	42
Figura 3. Número de colonias de <i>Vibrio</i> spp. no fermentadores de sucrosa (colonias verdes) según tratamiento durante el ensayo <i>in vivo</i> .	47
Figura 4. Número de colonias de <i>Vibrio</i> spp. totales según tratamiento durante el ensayo <i>in vivo</i>	48

Efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*.

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*. Se prepararon tres esencias con hojas secas de menta, las dos primeras procesadas como extracto etanólico y de aceite de oliva en baño maría; la última macerándolas en aceite de oliva; se aislaron cepas de *Vibrio* spp. de langostinos con vibriosis. En el ensayo *in vitro* se evaluó los halos de inhibición producidos en *Vibrio* spp. por los tres tipos de esencias, en dosis de 10, 15 y 20 μ l, con control positivo de oxitetraciclina. El ensayo *in vivo* se hizo en 9 acuarios sembrados cada uno con 20 langostinos infectados con *Vibrio* spp.; los tratamientos aplicados fueron: alimento balanceado con 15‰ (v/w) de esencia de menta (extracto etanólico procesado en baño maría); con 3‰ (w/w) de oxitetraciclina y control negativo (sin medicación); se evaluó el crecimiento, la supervivencia y el número de colonias de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos. *In vitro* las tres dosis de las esencias tuvieron efecto inhibitor del crecimiento de *Vibrio* spp., siendo las dosis de 15 μ l y 20 μ l de extracto etanólico en baño maría las que mayor efecto tuvieron ($p < 0,005$), siendo equivalentes a aproximadamente la mitad del diámetro producido por la oxitetraciclina. *In vivo*, la supervivencia y el crecimiento de los langostinos que recibieron alimento balanceado con esencia de menta fueron estadísticamente similares a las de los tratados con oxitetraciclina y superiores a las de los que no recibieron ninguna medicación ($p < 0,005$), mientras que el número de colonias de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas (totales y no fermentadoras de sacarosa) fue estadísticamente menor en el tratamiento con oxitetraciclina, seguido del de esencia de menta y finalmente del control ($p < 0,005$).

Palabras clave: *Mentha piperita*, langostino, esencia de menta, crecimiento, *Vibrio* spp.

Effect of the essence of *Mentha piperita* on the growth *in vitro* and *in vivo* of *Vibrio* spp. in *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The aim of the research was to determine the effect of the essence of *Mentha piperita* on the *in vitro* and *in vivo* growth of *Vibrio* spp. in *Litopenaeus vannamei*. Three essences were prepared with dried mint leaves, the first two processed as ethanolic or olive oil extract in a bain-marie; the last macerating them in olive oil; strains of *Vibrio* spp. were isolated from shrimps with vibriosis. In the *in vitro* assay, the inhibition halos produced in *Vibrio* spp. by the three types of essences, in doses of 10, 15 and 20 μ l, with a positive control of oxytetracycline were evaluated. The *in vivo* test was carried out in 9 aquariums stocked each with 20 shrimps infected with *Vibrio* spp.; The treatments applied were: balanced food with 15‰ (v/w) of mint essence (ethanolic extract processed in a water bath); with 3‰ (w/w) of oxytetracycline and negative control (without medication); the growth, survival and number of colonies of *Vibrio* spp. in the hepatopancreas of shrimp were evaluated. *In vitro*, the three doses of the essences had an inhibitory effect on the growth of *Vibrio* spp., with the doses of 15 μ l and 20 μ l of ethanolic extract in a water bath having the greatest effect ($p < 0.005$), being equivalent to approximately half of diameter produced by oxytetracycline. *In vivo*, the survival and growth of the shrimps that received balanced food with mint essence were statistically similar to those treated with oxytetracycline and higher than those that did not receive any medication ($p < 0.005$), while the number of colonies of *Vibrio* spp. in the hepatopancreas (total and non-sucrose fermenters) it was statistically lower in the treatment with oxytetracycline, followed by that of mint essence and finally in the control ($p < 0.005$).

Keywords: *Mentha piperita*, shrimp, mint essence, growth, *Vibrio* spp.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es en la actualidad la principal fuente de proteína de origen acuático destinada al consumo humano directo, en 2018, el 52% de la producción mundial, que se estimó en 156×10^6 t, correspondió a la acuicultura. Los crustáceos representan el tercer grupo taxonómico (detrás de peces y moluscos), con mayor volumen de producción en los cultivos acuícolas a nivel mundial ($9,4 \times 10^6$ t), sin embargo, son mucho más rentables que aquellos (FAO, 2020).

El cultivo de langostinos peneidos es uno de los más importantes a nivel mundial pues, genera el mayor volumen de producción entre los cultivos de crustáceos, con más de 7×10^6 t, que representan alrededor de US\$ 10 000 millones (Jamal et al., 2019).

A nivel local, el cultivo del langostino (*Litopenaeus vannamei*) es la acuicultura más importante del departamento de Tumbes, sin embargo y como ocurre a nivel global, los langostinos en cultivo sufren de enfermedades, siendo las que más perjudican a la producción, las originadas por bacterias del género *Vibrio* spp. (Rosado, 2018).

Para tratar tales enfermedades se emplea con frecuencia antibióticos como oxitetraciclina, enrofloxacina o florfenicol, aplicándolos de manera indiscriminada y sin control, lo que origina resistencia antibiótica en las cepas bacterianas responsables de las enfermedades; de igual manera los residuos de los antibióticos utilizados se acumulan con facilidad en los tejidos de los langostinos constituyendo una amenaza a la salud de los consumidores (Bermúdez-Almada et al., 2014; Rosado, 2018; Talpur, 2014).

Es necesario, por tanto, encontrar productos alternativos a los antibióticos que permitan el tratamiento de estas enfermedades; algunos de ellos, que provienen de plantas, frutos o tallos han demostrado actividad bactericida o bacteriostática, y son denominados fitobióticos (Talpur, 2014).

Una de las plantas con potencial fitobiótico poco estudiado en el cultivo de langostino es la menta (*Mentha* spp.), la cual se ha demostrado que posee actividad

contra multitud de bacterias patógenas en humanos, tanto gram-negativas como gram-positivas (Desam et al., 2019), así también siendo capaz de eliminar bacterias patógenas en peces (Adel et al., 2016), en el cangrejo *Portunus pelagicus* (Roslan et al., 2016) e incluso contra bacterias del género *Vibrio* (Snoussi et al., 2015; Talpur, 2014); sin embargo no se ha ensayado su poder en el tratamiento de vibriosis en langostinos.

Por ello, esta investigación tiene como objetivo determinar el efecto de la esencia de *Mentha piperita* sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ENFERMEDADES EN LA ACUICULTURA

Una de las limitaciones al realizar un cultivo acuícola son las enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, parásitos y otros patógenos emergentes. El aumento de las enfermedades en los cultivos se atribuye a una variedad de factores, como son la comercialización de reproductores y larvas, interacciones negativas entre poblaciones silvestres y cultivadas, pocas medidas de bioseguridad implementadas en cultivos, cambio climático entre otros factores (Bondad-Reantaso et al., 2005).

Las enfermedades infecto contagiosas son responsables de fuertes pérdidas económicas en la acuicultura (Santiago et al., 2009), que según se ha estimado para el 2014, fueron cerca de US\$ 6000 millones (World Bank, 2014); las pérdidas para los cultivos de langostino, son también muy considerables, así Flegel (2008) han reportado pérdidas de alrededor de US\$ 1000 millones en el año 2001.

Entre las enfermedades que producen las mayores pérdidas económicas en la acuicultura, destacan las bacterianas, las que a menudo son originadas por la flora bacteriana autóctona de los organismos en cultivo, que se constituyen en patógenas oportunistas, como por ejemplo, las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de los langostinos correspondientes a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, siendo las más patógenas, las primeras (Cao et al., 2015; Flegel, 2012; Zheng et al., 2016).

2.2. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CULTIVOS DE LANGOSTINO

Vibrio spp. son algunas de las bacterias que más problemas originan en el cultivo de langostino, debido a ello, los acuicultores no dudan en aplicar antibióticos para eliminarlas y tratar las enfermedades que producen. Los antibióticos son compuestos producidos naturalmente por microorganismos, o los mismos compuestos que se modifican a través de procesos químicos e incluso compuestos

sintetizados artificialmente basados en la estructura química de antibióticos naturales; que pueden impedir la multiplicación de las bacterias, ya sea al detener su reproducción, pero sin matarlas, en cuyo caso se denomina bacteriostático o matándolas, siendo denominados bactericidas (Acosta, 2014; Santiago et al., 2009).

Los antibióticos se distinguen de otras sustancias que también pueden detener la proliferación de bacterias, como por ejemplo los desinfectantes, en que los antibióticos tienen en general una toxicidad muy baja para el huésped por lo que pueden ser empleados para detener la multiplicación bacteriana en el interior del cuerpo del huésped, sin originar mayores problemas a su salud (Martínez, 2018).

El tratamiento de la vibriosis en langostinos se ha realizado de manera rutinaria empleando antibióticos como oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol (Bermúdez-Almada et al., 2014; Rosado, 2018; Talpur, 2014).

2.3. BACTERIAS DEL GÉNERO *Vibrio*

El género *Vibrio* comprende más de 110 especies bacterianas que se encuentran frecuentemente en el agua tanto como en aguas continentales y oceánicas (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014).

Estas bacterias son gram-negativas aeróbicas o anaeróbicas facultativas, presentan forma de bastones (bacilos), con una longitud de 1,4 a 2,6 μm y un ancho de 0,5 a 0,8 μm ; poseen un solo flagelo monotrico, aunque en el medio acuático es multitrico, además requieren para su crecimiento de sodio. Muchas de sus cepas son catalasa y oxidasa positivas, fermentan la glucosa, pero sin producir gas, son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono, entre ellas la quitina del exoesqueleto de los langostinos (Aguilera-Rivera et al., 2019; Lin et al., 2018; Serrano, 2014; Williams et al., 2017).

Al menos 12 especies de *Vibrio* son patógenas al ser humano, y un número mayor lo son para especies acuícolas, entre estas últimas se tienen a *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. fischeri* y *V. parahaemolyticus*. En particular *V. parahaemolyticus* es uno de los principales agentes patógenos en cultivos de langostinos, pues algunas de sus cepas originan la enfermedad de la hepatopancreatitis necrotizante aguda (AHPND) (Silvester et al., 2017; Williams et al., 2017).

Las enfermedades producidas por las cepas de *Vibrio* spp. son algunas de las más desafiantes para el cultivo del langostino, pudiendo matar a la totalidad de individuos en cultivo (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014).

Uno de los criterios para determinar la severidad de la infección por vibriosis es a través del número de colonias que se pueden hallar en el hepatopáncreas de los langostinos infectados, así un langostino tiene vibriosis si presenta más de 10^6 UFC/g de vibrios totales (Gómez-Gil, 2005), o si tiene más de 10^5 UFC/g de vibrios totales con baja diversidad de colonias (Gómez-Gil et al., 2015); por otra una vibriosis se considera severa si las colonias aisladas del hepatopáncreas más del 50% son verdes (no fermentadoras de sucrosa) así en el caso antes señalado, cuando un langostino tiene vibriosis y presenta más de 10^6 UFC/g de vibrios totales, considerando al menos 50% de colonias verdes, se infiere que tiene una vibriosis severa si cuenta con al menos 5×10^5 UFC/g de vibrios no fermentadores de sucrosa (colonias verdes)(Gómez-Gil, 2005).

2.4. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE *Vibrio* spp.

A lo largo del tiempo y por todo el mundo se ha observado que cepas de *Vibrio* spp. han mostrado progresivamente resistencia antibiótica, debido a la cada vez mayor utilización de antibióticos para tratar enfermedades en humanos y animales (terrestres e incluso acuáticos). La resistencia antibiótica en *Vibrio* spp. se ha incrementado contra los antibióticos más usados en acuicultura entre ellas las tetraciclinas (oxitetraciclina y tetraciclina), así como contra las quinolonas, sulfonamidas y trimetoprim (Tan et al., 2020; Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

En el cultivo de langostino existen ya varios reportes de cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. campbelli* y *V. fluvialis* multirresistentes a antibióticos (Stalin & Srinivasan, 2016).

La resistencia antibiótica de bacterias aisladas de organismos acuáticos se evalúa *in vitro* de acuerdo a los estándares establecidos por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2020) el cual precisa que en el caso de las tetraciclinas se use discos antibióticos comerciales con una dosis de 30 µg, esta misma dosis también ha sido establecida por la Unión Europea, mediante el Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (Eucast, 2022), siendo

prácticamente un estándar en la investigación de la susceptibilidad a tetraciclinas *in vitro*.

2.5. FITOBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA A LOS ANTIBIÓTICOS

El uso de Fitobióticos es una herramienta alternativa para prevenir las enfermedades bacterianas en cultivos, son compuestos elaborados, bien sean a partir de plantas o extractos de éstas, han demostrado ser potenciales agentes antimicrobianos, antioxidantes y algunas plantas poseen la capacidad de bloquear la transcripción de ciertos patógenos. (González, 2004; Yábar & Baca, 2016)

Todo indica que la aplicación de productos procedentes de plantas utilizados en el control de enfermedades en acuicultura contribuye al fortalecimiento del sistema inmunitario, permitiendo a los animales poseer mayor resistencia frente a infecciones provocadas por agentes patógenos (Tan et al., 2020; Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018).

2.6. ACEITES ESENCIALES

Son una mezcla de sustancias aceitosas volátiles, que se producen en algunos tipos de células especializadas como las de tipo glandular, que se ubican en diversas partes de las plantas aromáticas, los aceites esenciales tienen un alto índice de refracción asimismo debido a su naturaleza oleosa, su densidad es menor a la del agua (1 g/ml) (González, 2004; Yábar & Baca, 2016).

Químicamente los aceites esenciales están constituidos por moléculas variadas como: alcoholes, aldehídos, éteres, ésteres, cetonas, fenoles e hidrocarburos. Los aceites se extraen convencionalmente por métodos físicos tales como destilación, arrastre de vapor, extracción con disolventes y procesos mecánicos (Yábar & Baca, 2016).

Los aceites esenciales tienen diversas propiedades, sin embargo, una de las más investigadas son las antibacterianas. Los aceites esenciales, se encuentran en muchas especies aromáticas como: anís, apio, clavel, comino, eucalipto, lavanda, lima, limón, mandarina, matico, menta, muña, naranja, orégano, perejil, pimienta, romero, timol, entre otros (Yábar & Baca, 2016; Zelada, 2019).

2.7. ACEITE ESENCIAL DE MENTA

Las plantas denominadas comúnmente menta, corresponden a 25 a 30 especies de plantas aromáticas del género *Mentha* que son propias de climas templados y tropicales, algunas de las especies representativas de dicho género son *M. arvensis* (menta del maíz), *M. piperita* (menta pimienta), *M. citrata* (menta bergamota), *M. longifolia* (menta silvestre), y *M. spicata* (menta verde) (Snoussi et al., 2015).

El aceite esencial de menta se obtiene principalmente de sus hojas y ramas; y está constituido principalmente por mentol (45 a 70%) y en menor proporción por mentona, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lactonas tri terpénicas; el mentol es la sustancia que le da su aroma característico, le proporciona sus propiedades astringentes, antiflatulentas, antisépticas, estimulantes, analgésicas, antiespasmódicas, anti inflamatorias y antimicrobianas (Maraví, 2012).

Las propiedades antimicrobianas de la menta incluyen sus propiedades para eliminar virus, hongos y bacterias; particularmente respecto a esta última propiedad, la esencia de menta se ha probado ser eficaz en eliminar bacterias que origina enfermedades en humanos, en animales e incluso en plantas (Afridi et al., 2016; Klūga et al., 2017).

Se ha atribuido a ciertos compuestos bioactivos la capacidad antibacteriana del aceite esencial de menta, estos compuestos incluyen los flavonoides, mentona, mentol, isomentona, geraniol, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, bornil acetato, borneol, canfor, eugenol, carvacrol, limoneno, α -pineno, β -pineno, piperitona, cinnamaldehido, p-cimeno y linalool; varios de estos compuestos están involucrados en la disrupción de las paredes y membranas bacterianas; así como en la desestabilización del citoplasma y la destrucción de las membranas intracelulares (Soleimani et al., 2022).

Por otro lado el aceite esencial de menta contiene abundantes compuestos fenólicos tales como tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos; así como carotenoides, entre ellos la luteína, licopeno y caroteno; todos éstos son capaces de eliminar ciertos radicales libres que se acumulan en las células como consecuencia del estrés o el envejecimiento, por lo cual pueden actuar como estimuladores del crecimiento, dado que al reducir el gasto energético empleado

para lidiar con el estrés, éste puede ser empleado en el crecimiento (Akbari et al., 2017; Iqbal et al., 2013).

2.8. PROPIEDADES INMUNOESTIMULANTES DEL ACEITE ESENCIAL DE MENTA

Las plantas han demostrado poseer sustancias que sin tener propiedades nutricionales son capaces de modular la respuesta inmune de peces y crustáceos (langostinos), incrementándola con lo que se mejora su respuesta frente a enfermedades (Trichet, 2010).

El sistema inmune de invertebrados y vertebrados es diferente puesto que el primero es menos desarrollado basándose solo en la respuesta inmune innata (inespecífica), mientras que el segundo es más desarrollado contando además de la innata con la adaptativa (Low & Chong, 2020).

Los aceites esenciales de ciertas plantas, por ejemplo la menta, presentan entre sus componentes al timol, el mentol y el paracimón, los cuales han mostrado ser potentes estimuladores del sistema inmune actuando a nivel de ciertas funciones del sistemas inmune como son la producción de radicales libres de oxígeno, óxido nítrico, fenoloxidasas, entre otras (Eftekhari et al., 2021; He et al., 2017; Tomazelli et al., 2018).

El aceite esencial de menta, ha sido capaz de estimular el sistema inmune de peces, especialmente respecto a ciertos mecanismos del sistema innato, así por ejemplo Adel et al. (2016) encontraron que la actividad de lisozima, el estallido respiratorio, el contenido de peróxidos en el suero y el nivel de anticuerpos (este último un componente del sistema adaptativo) se incrementaron en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada con la bacteria *Yersinia ruckeri* cuando fueron alimentadas con una dieta suplementada con menta (*M. piperita*).

De igual manera Adel et al. (2015) encontraron que el alimento suplementado con *M. piperita* incrementó la actividad de la enzima alcalino fosfatasa en el pez blanco del Caspio (*Rutilus frisii kutum*), una enzima que está presente en el mucus del pez forma parte del sistema inmune innato y posee propiedades bactericidas.

Los aceites esenciales también han mostrado poder estimular el sistema inmune de invertebrados, entre ellos los langostinos, así el extracto de la planta *Cyanodon*

dactylon fue capaz de mejorar el recuento de hemocitos totales, el tiempo de coagulación, la producción de fenoloxidasa, óxido nítrico y el anión superóxido en langostinos *Penaeus monodon* desafiados con *white spot syndrome virus* (Balasubramanian et al., 2008)

Por otra parte, He et al. (2017) ensayaron una mezcla de ácidos orgánicos (ácido cítrico y sórbico) y aceites esenciales (timol y vainillina) aplicados al alimento del langostino blanco (*L. vannamei*), obteniendo un incremento en los niveles en el suero de fosfatasa alcalina y la actividad de la fenoloxidasa y de la glutatión peroxidasa, todos ellos indicadores de estimulación del sistema inmune.

Por otra parte, Tomazelli et al. (2018) encontraron que al aplicar microencapsulados de aceite esencial de tomillo en el alimento balanceado de langostinos infectados experimentalmente con *white spot syndrome virus* (WSSV) se logró incrementar la actividad de la fenoloxidasa e incluso se logró controlar los síntomas de la infección viral, mostrando que el aceite esencial de tomillo fue efectivo para estimular el sistema inmune del langostino.

Las investigaciones antes indicadas muestran que los aceites esenciales incluidos los de *M. piperita* son capaces de estimular el sistema inmune de organismos acuáticos.

2.9. INVESTIGACIONES RELACIONADAS AL USO DE ACEITE ESENCIAL DE MENTA Y OTRAS PLANTAS COMO ANTIBACTERIANOS

Existen varios reportes que indican que el aceite esencial de menta así como de otras plantas es eficaz como antibacteriano frente a patógenos de diversos organismos, algunos de ellos son:

Ngo et al., (2020) evaluaron el efecto del extracto de *Phyllanthus amaratus*, una especie del mismo género que la chancapiedra (*P. niruri*) en la supervivencia de *L. vannamei* infectado experimentalmente con *V. parahaemolyticus*. El ensayo se realizó con langostinos de alrededor de 4 g infectados con *V. parahaemolyticus*, los que fueron alimentados con alimento balanceado con 0‰, 10‰, 20‰ o 40‰ del aceite esencial; luego de 56 días de cultivo se encontró que la dieta con 20‰ de aceite esencial de *P. amaratus* incrementó significativamente la supervivencia de *L. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*.

Dewi et al. (2021), investigaron qué dosis de extracto de hoja de guava (*Psidium guajava*) (0‰, 1‰, 5‰ o 10‰) aplicadas al alimento balanceado incrementan la inmunidad, crecimiento y resistencia contra *V. parahaemolyticus* en *L. vannamei*. Los langostinos con peso de alrededor de 5 g fueron infectados con *V. parahaemolyticus* y alimentados con los alimentos formulados con las diferentes dosis del extracto de hoja de guava, luego de 28 días de experimentación, encontraron que el alimento con 5‰ de extracto de hoja de guava mejoraron los parámetros de inmunidad (recuento de hemocitos, actividad de la fenoloxidasa, fagocítica, producción del anión superóxido entre otros), el crecimiento y la resistencia contra *V. parahaemolyticus* en *L. vannamei*

Snoussi et al. (2015), evaluaron la eficacia de la esencia de *Mentha spicata* en la inhibición de cepas de *Vibrio* spp. en un ensayo *in vitro*, en el cual emplearon discos de papel filtro con 10,4 µl de la esencia, los que fueron colocados en placas con cultivos de *Vibrio* spp., encontrando que la esencia de menta fue capaz de inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. originando halos con diámetros entre 7,00 ± 0,00 mm y 21,33 ± 0,58 mm, demostrando la eficacia de la dosis de 10,4 µl/disco en la inhibición de *Vibrio* spp. Si bien los halos estuvieron en el rango antes indicado, más del 75% de los mismos tuvieron diámetros que fueron menores a 15 mm.

Maraví (2012) determinó el efecto de la esencia de menta *M. piperita* contra cepas bacterianas patógenas de *Streptococcus mutans* y probióticas de *Lactobacillus acidophilus* encontrando que en el ensayo en placas, la dosis de 10 µl de esencia de menta fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* produciendo halos con diámetros entre 10 y 13,4 mm, indicando que discos con 10 µl de esencia de menta pudieron inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *S. mutans*.

Zelada (2019) utilizó discos con 25 µl de solución al 45% de esencia de menta (*M. piperita*) diluido con dimetilsulfóxido (DMSO) (equivalente a 11,25 µl de esencia pura), así como con 25 µl de solución al 75% de esencia de menta diluido con DMSO (equivalente a 18,75 µl de esencia pura), encontrando que ambos tuvieron efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* siendo mayor el efecto con la concentración más alta de esencia de menta (25 µl de solución al 75% de esencia de menta).

Boukhebti et al. (2011), evaluaron la actividad antibacteriana de aceites esenciales hidrodestilados de dos especies de menta (*Mentha spicata* y *Mentha pulagium*)

contra algunas bacterias patógenas a humanos. Ambos aceites esenciales inhibieron el crecimiento de la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes* cuando se aplicaron en dosis de 10 µl/disco, lo que se evidenció por que los halos de inhibición que generaron estuvieron entre 13 y 20 mm para las diluciones de la esencia 1/1 y 1/2 (v/v de dimetilsulfóxido).

Zuni (2017), evaluó el efecto del aceite esencial de menta *M. spicata*, en la inhibición *in vitro* de *Escherichia coli* enteropatógena. Como primer paso, preparó aceite esencial con hojas de la planta a las cuales realizó una extracción por arrastre de vapor, a continuación determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad inhibitoria del aceite esencial contra cepas de *E. coli* enteropatógena, usando como control tetraciclina. Los resultados indicaron que la CMI fue de 2,5% y que con una dosis de 30 µl del aceite esencial de menta, se logró obtener halos de inhibición equivalentes al 54,20% de los obtenidos con el control de tetraciclina. Demostrándose que el aceite esencial de *M. spicata* pudo inhibir efectivamente a *E. coli* en ensayo *in vitro*.

Shahbazi (2015), determinó la actividad inhibitoria *in vitro* de aceite esencial de *M. spicata* contra cepas patógenas tales como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. El aceite esencial de *M. spicata* demostró inhibir en una forma moderada el crecimiento de todas las cepas ensayadas, siendo mayor su efectividad contra las cepas de bacterias gram positivas.

La actividad inhibitoria de extractos de menta, no es exclusiva de *M. spicata*, también *M. piperita*, ha demostrado su potencial en varias investigaciones como, por ejemplo:

Afridi et al. (2016), ensayaron en levaduras y hongos (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus* y *Candida albicans*) así como en bacterias patógenas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*) el poder inhibitorio de extractos de *M. piperita* en ensayos en pozo de agar, encontrando que los extractos produjeron una alta inhibición en todas las cepas ensayadas, evidenciando una fuerte actividad antimicrobiana.

Choi et al. (2016), utilizaron los componentes del aceite esencial de *M. piperita*

(mentol, neomentol, isopulegon y 1,8-cineol) en la inhibición de la bacteria *Acidovorax citrulli*, en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Encontrando que cada componente bioactivo pudo detener el crecimiento bacteriano en bajas concentraciones (0,2%), evidenciando que *A. citrulli* es susceptible de ser inhibida por el extracto de *M. piperita*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MÉTODOS

3.1.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE EJECUCIÓN

Se desarrolló en la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, específicamente en el Laboratorio de Biología Molecular y también en el Laboratorio de Acuicultura II de (Figura 1), que se hallan localizados en Villa Puerto Pizarro (Tumbes, Perú); siendo sus coordenadas geográficas: 03°30'18,45" S y 80°23'35,81" W.

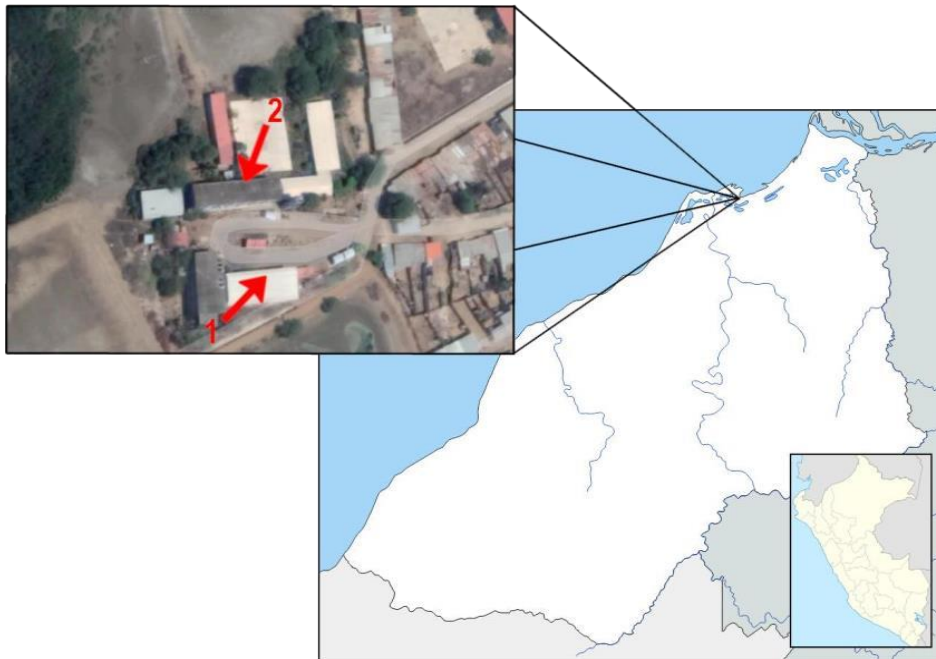


Figura 1. Lugar de ejecución de la investigación (Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES). Las flechas rojas, indican la localización de los laboratorios: 1) de Biología Molecular, 2) de Acuicultura II.

3.1.2. EXTRACCIÓN DE LA ESENCIA DE *Mentha piperita*

Para la extracción de la esencia de *Mentha piperita*, se utilizó dos métodos uno por baño maría (usando alcohol etílico al 96% y aceite de oliva) y el otro por el método de maceración.

A) EXTRACCIÓN EN BAÑO MARÍA

Previamente, por un periodo de 10 días se dejó secar las hojas de *Mentha piperita* a la sombra. Se pesó 300 g de hojas, estas se despedazaron mano y se colocaron 150 g en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, en ambos se añadió alcohol etílico al 96%, hasta alcanzar el 80% de la capacidad del Erlenmeyer. Los dos recipientes se colocaron en baño maría a una temperatura de 70 °C por 3 horas, luego se retiraron del baño maría, se dejaron enfriar al ambiente y se filtraron con una malla tupida; el líquido que quedó libre de impurezas se colocó en un nuevo matraz Erlenmeyer de 250 ml.

El mismo procedimiento se repitió para obtener la esencia, mediante baño maría utilizando aceite de oliva, con las mismas cantidades que se utilizaron para la extracción con alcohol etílico.

B) EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

Se pesó 250 gramos de hojas secas de *Mentha piperita*, éstas fueron destrozadas manualmente, y se introdujeron en una botella de 500 ml con aceite de oliva hasta ocupar un 75% del volumen del envase (botella). Se mantuvo protegido del sol durante un mes en un lugar fresco y seco. Pasado el mes se procedió a filtrar con una tela tupida, el líquido libre de impurezas se almacenó en un recipiente Erlenmeyer de 250 ml y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

3.1.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIALES

Se preparó los medios de cultivos y los materiales necesarios para el experimento, así como citrato de sodio al 10%, el que se mantuvo en la refrigeradora hasta su utilización.

La desinfección del material de vidrio (tubos de ensayo, matraces, probetas, placas petri) se hizo sumergiéndolos en una solución de 50 ppm de hipoclorito de sodio por un periodo de 10 minutos, luego fueron enjuagados y dejados secar a temperatura ambiente, posteriormente se envolvieron en papel kraft y se colocaron en la estufa a 180 °C por 2 horas.

Se preparó los medios de cultivo tripticasa soya (TSA) así como de tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) ambos suplementados con 2,5 % de NaCl, así como los caldos de cultivo Luria Bertani (LB) y caldo tripticasa soya (TSB).

3.1.4. OBTENCIÓN DE LANGOSTINOS

Los langostinos se adquirieron de la Empresa Langostinera Celimar S.A. ubicada en Villa Puerto Pizarro en la región Tumbes (Perú); éstos fueron extraídos de un estanque de cultivo que presentaba problemas por infección con *Vibrio* spp., se seleccionó langostinos con signos externos de vibriosis, los que fueron colocados en baldes con agua del propio estanque y trasladados rápidamente a la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar en Puerto Pizarro.

3.1.5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL CULTIVO BACTERIANO

En el Laboratorio de Acuicultura II, se registró el peso y características externas de los langostinos, se observó si presentaban heridas, coloraciones anormales, erosiones, entre otros. Se realizó la disección del langostino y se extrajo hepatopáncreas e intestino, ambos se colocaron por separado en microtubos de centrífuga de 1,5 ml previamente tarados.

En ambos microtubos de centrífuga que contenían los fragmentos de hepatopáncreas y del intestino del langostino se añadió 900 µl de solución fisiológica (solución salina al 0,85%), a continuación se trituró los tejidos utilizando maceradores de acero inoxidable. Se realizaron diluciones sucesivas, hasta la concentración 10^{-3} ; de esta última dilución se tomó 100 µl y se sembró en las placas petri conteniendo medio TCBS. La muestra fue extendida en toda la superficie de la placa con un asa de barrido. Luego las placas petri fueron selladas con parafilm y dejadas incubar en posición invertida por 24 h a 37 °C.

3.1.6. PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Para la purificación de las bacterias, se observó las colonias más representativas que crecieron en las placas petri con medio TCBS; estas colonias fueron subcultivadas en medio TSA, para lo cual se transfirió cada una de las seleccionadas a una nueva placa petri conteniendo TSA, sembrándolas de una forma similar al anterior método del cultivo, con un asa de siembra se tomó una colonia de la placa que contenía TCBS del anterior proceso, la misma que fue extendida en toda la superficie de la nueva placa con TSA. Las placas petri que contenían TSA fueron selladas con parafilm y se dejaron incubar por 24 h a 37 °C, luego del tiempo de incubación se observó si las colonias que fueron sembradas tuvieron similitud, para determinar si eran un monocultivo bacteriano.

Para la conservación del monocultivo bacteriano, se tomó una colonia bacteriana de las cepas purificadas se colocó en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml conteniendo 1 ml de caldo Luria Bertani (LB), dejándose incubar por 24 h a 37 °C. También se realizó al menos dos réplicas de respaldo para cada una de estas colonias para lo cual se tomó 10 µl de la suspensión bacteriana del primer microtubo y se colocó en otro microtubo conteniendo también 1 ml de caldo LB, se incubó nuevamente por 24 h a 37 °C y luego se le adicionó glicerol helado hasta alcanzar una concentración de 15%. Los microtubos conteniendo las cepas se conservaron a -20 °C, hasta su uso.

3.1.7. PREPARACIÓN DE DISCOS DE PAPEL FILTRO IMPREGNADOS EN ESENCIA DE *Mentha piperita*

Con un perforador, se fabricaron discos de 6 mm en un papel filtro whatmann 42, éstos se colocaron en un tubo falcón de 15 ml y se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 15 minutos, luego se aplicó a cada disco de papel filtro, 10, 15 y 20 µl de la esencia de *Mentha piperita* (preparados como se indicó en los ítems 3.1.2. secciones A y B) y se dejaron secar a temperatura ambiente dentro de una placa Petri estéril cerrada.

3.1.8. PREPARACIÓN DE LAS CEPAS DE *Vibrio* spp.

Con un asa de siembra se transfirió una colonia de *Vibrio* spp. a un microtubo de centrífuga de 1,5 ml con 1 ml de caldo TSB, se dejó reposar por 24 horas hasta que alcanzó un nivel de turbidez que superó al estándar de McFarland 0,5.

Después de las 24 horas, se llevó la muestra a una centrifuga, en la cual se centrifugó a 10 000 xg por 3 min, para separar el *pellet* bacteriano del medio TSB, éste fue resuspendido en un micro tubo de 1,5 ml con solución salina al 2,5% y se trató de igualar su turbidez (por inspección visual) con la que tiene el estándar de McFarland 0,5 (equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ cél./ml) para lo cual en caso fue necesario se diluyó la solución bacteriana con la solución salina al 2,5%.

La muestra bacteriana estandarizada se usó para la siembra en placas petri conteniendo medio Müller- Hinton. Con un asa de siembra se transfirió la colonia de *Vibrio* spp. al microtubo de centrífuga de 1,5 ml con 1 ml de caldo TSB, luego se dejó por 24 horas hasta que alcanzó un nivel de turbidez que superó al estándar de McFarland 0,5.

Después del tiempo transcurrido de 24 horas, se llevó la muestra a una centrifuga, se centrifugó a 10 000 xg por 3 min, para separar el *pellet* bacteriano del medio TSB, luego el *pellet* fue resuspendido en un microtubo de 1,5 ml con solución salina al 2,5 % y se trató de igualar su turbidez (por inspección visual) con la que tiene el estándar de McFarland 0,5 (equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ cél./ml) para lo cual en caso fue necesario se diluyó la solución bacteriana con la solución salina al 2,5 %.

La muestra bacteriana estandarizada se usó para la siembra en placas petri conteniendo medio Müller-Hinton (preparado disolviendo 38 g en agua destilada hasta alcanzar 1 litro de solución).

3.1.9. ENSAYO DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE *Vibrio* spp. CON ESENCIA DE *Mentha piperita*

De cada cepa de *Vibrio* spp. aisladas, se tomó 100 µl de su cultivo y se sembró con un asa de barrido sobre toda una placa Petri que contenía agar TCBS.

Con un plumón indeleble se trazó dos líneas perpendiculares entre sí, cruzándose

en el centro de la placa Petri sembrada con la cepa de *Vibrio* spp., para formar cuatro cuadrantes, en cada uno de ellos se colocó los discos de papel filtro con las esencias de *Mentha piperita* en sus diversas cantidades (10, 15 y 20 µl) (fijadas en base a las investigaciones realizadas por Boukhebt et al. (2011), Maraví (2012), Snoussi et al.(2015), Zelada (2019) y Zuni (2017)--así también se usó como control positivo discos comerciales de 30 µg de oxitetraciclina, que es el estándar para este tipo de antibiogramas según indica CLSI(2020).

Se dejó las placas petri en la incubadora por 24 h a 37 °C, luego de lo cual se procedió a observar los halos de inhibición y a medirlos utilizando una regla. Este proceso se realizó en las 20 placas Petri del ensayo.

3.1.10. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE *Vibrio* spp. *IN VIVO*

Se utilizaron 180 juveniles de *L. vannamei* obtenidos de la Empresa langostinera Celimar S.A. Los langostinos fueron aclimatados en tres acuarios de 60 litros del Laboratorio de Acuicultura II de la Universidad Nacional de Tumbes durante dos días antes de iniciar el experimento, la temperatura y salinidad del agua de los acuarios de aclimatación se mantuvo alrededor de 29 °C y en 28 ‰ respectivamente. Los langostinos fueron alimentados dos veces al día a las 9:30 am y 3:00 pm con un alimento comercial para langostino con 35 % de proteína.

Luego de la aclimatación, se distribuyó en nueve acuarios de vidrio de 40 litros con agua de mar filtrada, 20 langostinos/acuario, cada ejemplar tuvo un peso promedio de $4,5 \pm 0,5$ gramos. Antes de realizar la infección experimental de los langostinos, se tomó una muestra de langostinos, los mismos que fueron sacrificados para determinar la concentración inicial de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos antes de ser infectados.

Se infectó a los langostinos por el método de inmersión, para lo cual se colocó en cada acuario 20 ml del cultivo de la cepa de *Vibrio* spp. cuya concentración fue ajustada a 2×10^8 UFC/ml. Las cepas de *Vibrio* spp. empleadas fueron las mismas que se utilizaron en el ensayo *in vitro*, las cuales fueron aplicadas hasta obtener una concentración de 10^5 UFC/ml en cada acuario.

3.1.11. APLICACIÓN DE LA ESENCIA DE *Mentha piperita* Y DE LA OXITETRACICLINA AL ALIMENTO BALANCEADO

Se añadió esencia de *Mentha piperita* (obtenida mediante el método de extracción usando alcohol etílico en baño maría), en un 15 ‰ (v/w) al alimento balanceado a utilizar (esta dosis se fijó en base a las dosis de extractos de plantas aplicados al alimento que mejores resultados dieron al controlar vibriosis en langostinos según las investigaciones de Ngo et al. (2020) y Dewi et al. (2021)) . Se colocó primero el alimento en un recipiente de plástico, luego se agregó la esencia de *Mentha piperita*, se mezcló manualmente en un recipiente de plástico hasta lograr su homogenización completamente.

Por otro lado, se tomó oxitetraciclina comercial, y se aplicó al alimento balanceado en cantidad equivalente a 3‰ (w/w), valor que se halla dentro del rango de dosis de antibióticos que se aplican habitualmente en alimentos balanceado medicados para el tratamiento de *Vibrio* spp. en langostinos que reportan Bermúdez-Almada et al. (2014) . La oxitetraciclina fue diluida en agua destilada, en un vaso de precipitados utilizando una varilla de vidrio; luego se mezcló con el alimento balanceado en un recipiente de plástico y se homogenizó manualmente.

3.1.12. ALIMENTACIÓN DE LOS LANGOSTINOS

Los langostinos fueron alimentados de acuerdo al tratamiento asignado con alimento no medicado, con alimento con oxitetraciclina o con esencia de menta. La alimentación se hizo dos veces al día (a las 9:30 am y 3:00 pm) empezando con una cantidad de alimento equivalente al 10% de la biomasa total de los langostinos, esta cantidad fue posteriormente ajustada en función al consumo diario, de forma que siempre hubiera un excedente.

3.1.13. REGISTRO DEL CRECIMIENTO DEL LANGOSTINO

Se registró el peso de los langostinos cada 4 días desde el inicio del experimento, se tomó cinco langostinos por acuario, y se pesaron por separado utilizando una balanza analítica con precisión de 0,01 g.

3.1.14. RECUENTO DE COLONIAS DE *Vibrio* spp.

Se realizó en los mismos días en que se controló el peso de los langostinos, se tomó dos langostinos que fueron sacrificados se les extrajo el hepatopáncreas, que fue pesado y colocado en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml previamente tarado. Se le añadió a cada microtubo 900 µl de solución fisiológica (solución salina al 0,85%) para facilitar la trituración del hepatopáncreas utilizando maceradores de acero inoxidable.

Se realizaron diluciones sucesivas, de la solución madre hasta la concentración 10^{-3} ; de esta última dilución se tomó 100 µl y se sembró en su respectiva placa petri conteniendo medio TCBS, las placas petri fueron selladas con parafilm y dejadas incubar en posición invertida por 24 h a 37 °C, luego se contaron las colonias de *Vibrio* spp. crecidas, según su coloración: amarillas o verdes, correspondientes a cepas sucrosa positivas o negativas respectivamente.

3.1.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El experimento *in vitro* se realizó con 10 tratamientos:

T0: tratamiento control (30 µg de oxitetraciclina comercial).

T1: 10 µl de esencia de menta extraída con alcohol etílico al 96% en baño maría.

T2: 15 µl de esencia de menta extraída con alcohol etílico al 96% en baño maría.

T3: 20 µl de esencia de menta extraída con alcohol etílico al 96% en baño maría.

T4: 10 µl de esencia de menta extraída con aceite de oliva en baño maría.

T5: 15 µl de esencia de menta extraída con aceite de oliva en baño maría.

T6: 20 µl de esencia de menta extraída con aceite de oliva en baño maría.

T7: 10 µl de esencia de menta extraída por maceración con aceite de oliva.

T8: 15 µl de esencia de menta extraída por maceración con aceite de oliva.

T9: 20 µl de esencia de menta extraída por maceración con aceite de oliva.

Cada tratamiento se aplicó con 20 repeticiones, siendo cada una de ellas, una placa petri en la cual se hizo crecer *Vibrio* spp.

Debido a que las placas petri en que se realizó el ensayo fueron de 10 cm de diámetro, no tuvieron el espacio suficiente para colocar los discos con los diferentes tipos y dosis de esencia de menta, que correspondieron a los tratamientos, se tuvo que colocar en cada placa petri solo 4 tratamientos: 3 correspondientes a la esencia obtenida mediante un mismo proceso de extracción en las dosis de 10, 15 y 20 µl

adicionalmente con un disco cargado con 30 µg de oxitetraciclina (control). Para abarcar todos los tratamientos se tuvo que utilizar 3 placas petri (4 tratamientos/placa), esto se repitió en 20 placas, con lo que el experimento completo *in vitro* requirió de 60 placas petri.

En el ensayo *in vitro* se evaluó los diámetros de los halos de inhibición generados por la esencia de menta o por la oxitetraciclina. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianza, así como el test de Tukey, todos con un nivel de significancia de 5%.

El experimento *in vivo*, se realizó también con DCA, siendo los tratamientos:

T0: tratamiento control (alimento balanceado sin ningún medicamento)

T1: alimento balanceado con 3‰ (w/w) de oxitetraciclina

T2: alimento balanceado con 15‰ (v/w) de esencia de menta.

Cada tratamiento se aplicó con tres repeticiones, siendo cada una de ellas un acuario de 40 litros en el que se colocó 20 langostinos infectados con *Vibrio* spp.

En el ensayo *in vivo* se evaluó el crecimiento y supervivencia, así como el recuento de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos infectados experimentalmente. Para el análisis estadístico se utilizó análisis de varianza, así como el test de Tukey, todos con un nivel de significancia de 5%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Vibrio* spp. USANDO ESENCIA DE MENTA.

En las tablas 1, 2 y 3, se observan los resultados de la inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. *in vitro* por los tres tipos de esencia de menta utilizados.

En el caso de la esencia de menta obtenida por maceración en aceite de oliva (tabla 1), se obtuvieron halos de inhibición con diámetros promedio de $10,5 \pm 1,9$ mm; $12,3 \pm 2,6$ mm y $15,1 \pm 3,1$ mm cuando se emplearon 10, 15 y 20 μ l de esencia respectivamente, mientras que cuando se utilizó 30 μ g de oxitetraciclina se obtuvo halos con diámetros de $38,2 \pm 5,8$ mm.

Tabla 1. Diámetro (mm) de los halos de inhibición en *Vibrio* spp. producidos por la esencia de menta obtenida por maceración en aceite de oliva.

Número de placa Petri	Dosis de esencia de menta			Control positivo OTC (30 μ g)
	10 μ l	15 μ l	20 μ l	
1	11	14	15	40
2	10	15	16	50
3	13	12	11	35
4	9	14	18	42
5	12	9	20	35
6	13	13	13	28
7	8	12	14	31
8	10	12	18	34
9	10	16	17	35
10	12	9	12	38
11	13	8	12	39
12	13	11	15	40
13	8	13	13	41
14	10	15	9	42
15	11	16	17	46
16	12	9	18	41
17	8	12	12	42
18	10	16	17	44
19	8	9	14	31
20	8	11	20	29
Promedio \pm desviación estándar	$10,5 \pm 1,9$	$12,3 \pm 2,6$	$15,1 \pm 3,1$	$38,2 \pm 5,8$

Los diámetros de los halos de inhibición fueron mayores cuando se empleó la esencia obtenida del extracto etanólico de menta procesada en baño maría (tabla 2), siendo de $15,1 \pm 1,5$ mm para la dosis de 10 μ l, de $18,6 \pm 1,9$ mm para la dosis de 15 μ l y de $21,7 \pm 2,3$ mm para la dosis de 20 μ l, como se observa los halos se muestran progresivamente mayores al incrementarse la dosis de esencia, sin embargo todos éstos fueron menores a los obtenidos con el control (30 μ g de oxitetraciclina) que fueron de $37,2 \pm 5,0$ mm.

Tabla 2. Diámetro (mm) de los halos de inhibición en *Vibrio* spp. producidos por la esencia obtenida con extracción etanólica de menta procesada en baño maría.

Número de placa Petri	Dosis de esencia de menta			Control positivo OTC (30 μ g)
	10 μ l	15 μ l	20 μ l	
1	15	18	22	42
2	14	21	23	41
3	18	17	18	36
4	14	19	19	41
5	14	21	21	32
6	17	18	23	27
7	17	19	25	29
8	15	21	24	31
9	13	17	19	36
10	15	18	19	37
11	18	19	18	38
12	14	15	21	42
13	14	18	23	39
14	14	15	25	40
15	13	17	19	42
16	14	19	23	43
17	15	19	24	38
18	15	18	24	44
19	17	22	21	31
20	15	21	22	34
Promedio \pm desviación estándar	$15,1 \pm 1,5$	$18,6 \pm 1,9$	$21,7 \pm 2,3$	$37,2 \pm 5,0$

Por otra parte, cuando se empleó la esencia de menta obtenida como extracto de menta en aceite de oliva procesada en baño maría (tabla 3); los resultados fueron similares a los obtenidos con la esencia por maceración en aceite de oliva, pero menores que los obtenidos con la esencia obtenida por extracción etanólica en baño maría; así cuando se empleó 10 μ l de esencia de menta se obtuvo halos con diámetros de $10,7 \pm 1,5$ mm; cuando se utilizó 15 μ l se tuvo $13,1 \pm 1,8$ mm y para la dosis de 20 μ l se tuvo halos con diámetros de $16,9 \pm 1,8$ mm; en comparación el

control (30 µg de oxitetraciclina) obtuvo halos de inhibición con diámetros de 38,6 ± 3,1 mm.

Tabla 3. Diámetro (mm) de los halos de inhibición de *Vibrio* spp. producidos por la esencia de menta obtenida como extracto de menta en aceite de oliva procesada en baño maría.

Número de placa Petri	Dosis de esencia de menta			Control positivo OTC (30 µg)
	10 µl	15 µl	20 µl	
1	14	15	14	38
2	8	14	13	45
3	9	13	16	41
4	11	15	17	39
5	11	11	19	39
6	12	12	18	31
7	11	16	19	38
8	12	14	17	39
9	12	15	17	34
10	11	12	18	37
11	10	9	16	38
12	12	11	14	41
13	9	12	18	38
14	11	14	15	42
15	12	14	16	41
16	11	13	18	42
17	9	14	17	38
18	9	15	19	39
19	11	11	18	38
20	9	12	19	34
Promedio ± desviación estándar	10,7 ± 1,5	13,1 ± 1,8	16,9 ± 1,8	38,6 ± 3,1

Al comparar los diámetros de los halos de inhibición producidos por los diferentes tipos de esencia de menta en sus tres dosis (10, 15 y 20 µl) con los controles de oxitetraciclina (figura 2), se observó de manera general que fueron significativamente menores (test de Tukey, $p < 0,05$) que los obtenidos con el control (30 µg de oxitetraciclina).

También se apreció que a medida que se incrementó las dosis de esencia de menta, se obtuvieron halos de inhibición con diámetros significativamente mayores (test de Tukey, $p < 0,05$). Entre las dosis de esencia de menta ensayadas, la correspondiente a la dosis de 20 µl de esencia de menta obtenida como extracto etanólico procesada en baño maría fue la que obtuvo los mayores diámetros con 21,7 ± 2,3 mm. Las pruebas estadísticas realizadas (ANVA y test de Tukey) se

observan en el anexo 1.

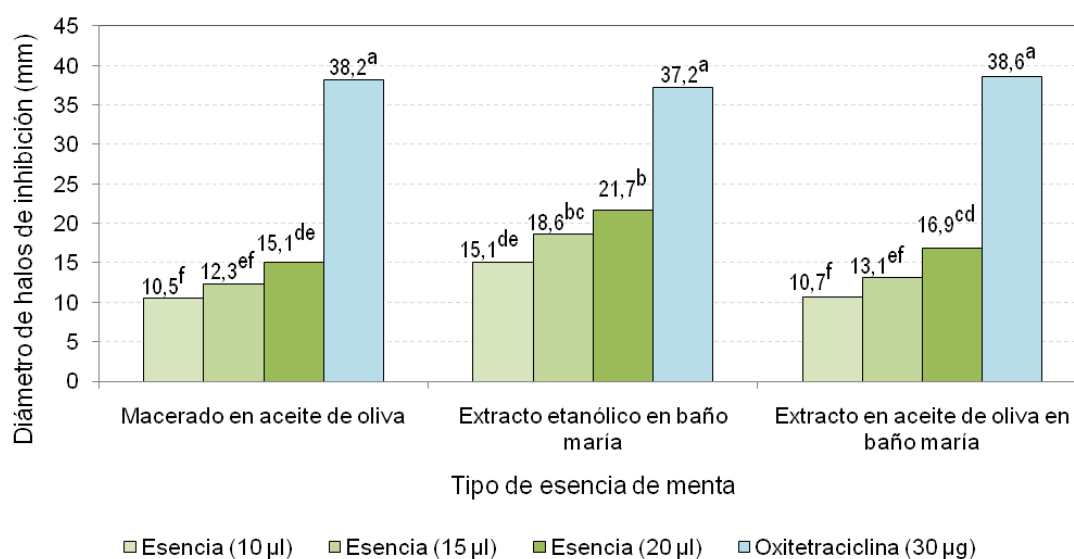


Figura 2. Diámetro promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por los diferentes tipos y dosis de esencia de menta en *Vibrio* spp. Las letras que acompañan a los valores de las columnas representan los resultados del test de Tukey.

Los diámetros de los halos de inhibición registrados que fueron producidos por la esencia de menta (*M. piperita*) preparada con extracto de etanol en baño maría fueron de al menos $15,1 \pm 1,5$ mm, siendo superiores al 75% de los diámetros de los halos de inhibición que reportaron Snoussi et al. (2015) cuando evaluaron el efecto del extracto *M. spicata* en 30 cepas de *Vibrio* spp.

En el caso de los halos de inhibición producidos por la dosis de 20 µl ($21,7 \pm 2,3$ mm), éstos fue superiores a todos los diámetros de los halos de inhibición reportados por Afridi et al. (2016) al determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. piperita* contra siete cepas de bacterias gram positivas y gram negativas, cuyos halos de inhibición tuvieron diámetros que no excedieron de $17,00 \pm 0,87$ mm.

Los mayores halos de inhibición producidos por la dosis de 20 µl del extracto etanólico de menta procesado en baño maría tuvieron como diámetro $21,7 \pm 2,3$ mm, siendo superiores al 50% del diámetro de los halos de inhibición producidos

por el control de oxitetraciclina correspondiente ($37,2 \pm 5,0$ mm), por lo que podría pensarse que su actividad antibacteriana no es tan prometedora. Sin embargo es necesario precisar que la esencia de menta ensayada es un producto artesanal que está aún lejos de la pureza de un producto comercial; en otras investigaciones, como se mencionan a continuación, extractos vegetales con resultados más modestos que los hallados en la presente investigación han sido declarados con un promisorio poder antibacteriano, así:

Shahbazi (2015), reportaron una notable actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. spicata* aun cuando algunos de los diámetros de sus halos de inhibición fueron equivalentes al 33% de los diámetros producidos por el control de tetraciclina (para *Staphylococcus aureus*: 8 mm con aceite esencial de *M. spicata* frente a 24 mm de tetraciclina);

Por otro lado en la investigación de Radaelli et al. (2016), evaluaron la actividad antibacteriana (medida como actividad mínima bactericida) del aceite esencial de *M. piperita* en 7 cepas bacterianas de diferentes especies, y declararon que el aceite esencial tuvo poder antibacteriano incluso cuando su poder fue equivalente al 1% del antibiótico control, que fue el cloranfenicol (concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de *Thymus vulgaris*: 1,25 mg/ml versus 0,003125 mg/ml en el control de cloranfenicol).

Por todo lo antes indicado, se puede afirmar que la esencia de menta obtenida como extracto etanólico en baño maría demuestra un prometedor poder antibacteriano contra *Vibrio* spp.

4.2 SUPERVIVENCIA DE LANGOSTINOS INFECTADOS CON *Vibrio* spp. *IN VIVO*, TRATADOS CON ESENCIA DE MENTA

En la tabla 4 se observa que la supervivencia del langostino en el ensayo *in vivo*, se redujo progresivamente del día 1 al 16. En este momento la supervivencia de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. que recibieron alimento con oxitetraciclina o con la esencia de menta (específicamente como extracto etanólico procesado en baño maría) mostraron la máxima supervivencia, siendo estadísticamente superiores (Test de Tukey, $p < 0,05$) a la lograda por los langostinos que sólo recibieron alimento balanceado sin medicar.

El detalle de la supervivencia registrada en cada repetición (acuario) de cada tratamiento ensayado se observa en la tabla 6 del anexo 2.

Tabla 4. Supervivencia (%) de langostinos durante el ensayo *in vivo*

Día	Tratamiento (Promedio \pm Desviación estándar)		
	Esencia de menta	Control negativo	Oxitetraciclina
1	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
4	91,67 \pm 2,89	88,33 \pm 2,89	93,33 \pm 7,64
8	80,00 \pm 8,66	75,00 \pm 0,00	85,00 \pm 10,00
12	65,00 \pm 5,00	58,33 \pm 5,77	78,33 \pm 14,43
16	56,67 \pm 10,41 ^{a*}	46,67 \pm 5,77 ^b	70,00 \pm 13,23 ^a

* Las letras que acompañan a las cantidades numéricas, representan en caso de ser diferentes la existencia de diferencia estadística significativa según el test de Tukey.

El poder demostrado por la esencia de menta para evitar la mortalidad de langostinos infectados con *Vibrio* spp. en el ensayo *in vivo* fue equivalente al obtenido por la oxitetraciclina (al observarse supervivencias estadísticamente similares para ambas; test de Tukey; $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos son congruente con los reportados para la supervivencia de *L. vannamei* infectado con *Vibrio* spp. *in vivo* usando extractos de otras plantas, como por ejemplo con la cebolla tiwai (Azis & Cahyadi, 2020) en el que se observó que langostinos *Penaeus monodon* infectados con *V. harveyi* y tratados con extracto de cebolla tiwai tuvieron una supervivencia superior (supervivencia: 31,62-43,34%) a la de langostinos infectados pero que no recibieron ningún tratamiento (supervivencia: 0%), aunque fue menor que la registrada en langostinos infectados tratados con cloranfenicol (supervivencia: 61,67%).

De igual manera en la investigación realizada por Domínguez-Borbor et al. (2020), utilizando extractos del árbol de té y el orégano se observó que los langostinos que recibieron estos extractos tuvieron supervivencias superiores a la de aquellos del control en el que no se aplicaron éstos (87,1 a 92,2% en el caso de los tratados con extractos y 72% en el control), sin embargo no fue posible comparar su efecto contra el de un antibiótico de referencia pues éste no fue incluido en su

experimento.

Por otro lado Adel et al. (2016) encontraron que la supervivencia de truchas infectadas con la bacteria *Yersinia ruckeri* a las que se administró esencia de *Mentha piperita* en la dieta, fue significativamente mayor que la de aquellas que no la recibieron (Supervivencia con la administración de la esencia: 54,4% a 75,2%; $p < 0,05$), aunque no fue posible comparar tales supervivencias con las de un antibiótico de elección, pues estos investigadores no lo incluyeron.

De lo antes señalado, se aprecia que los extractos de plantas ensayados pudieron reducir la mortalidad en organismos acuáticos infectados con bacterias patógenas; en esta investigación se ha observado que los langostinos que recibieron esencia de menta en el ensayo *in vivo* tuvieron una mortalidad estadísticamente similar a los que tuvieron los tratados con oxitetraciclina

El efecto antes indicado fue comparativamente mayor al que se pudo haber pronosticado en base a los resultados observados en el ensayo *in vitro* en el cual la esencia de menta mostró solo inhibir a *Vibrio* spp. a un nivel cercano al 50% del observado para la oxitetraciclina.

Es posible que la administración de esencia de menta en el alimento, durante el ensayo *in vivo* haya favorecido una mayor supervivencia, equivalente a la lograda con la oxitetraciclina, porque aparte de poseer poder antibacteriano también tiene poder inmunoestimulante, pues contiene timol, mentol y paracimón que actúan estimulando el sistema inmune respecto a producir radicales libres de oxígeno, óxido nítrico, fenoloxidasas, entre otras; tal como lo han precisado Adel et al., (2015), Eftekhari et al. (2021), He et al. (2017) y Tomazelli et al. (2018), por lo que es posible que la esencia de menta al estimular el sistema inmunitario del langostino haya logrado disminuir la mortalidad de los mismos originada por la infección por *Vibrio* spp.

4.3 CRECIMIENTO DE LANGOSTINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Vibrio* spp. Y TRATADOS CON ESENCIA DE MENTA

En la tabla 5, se observa el crecimiento de los langostinos en el lapso de 16 días en que se desarrolló el ensayo *in vivo*; los datos detallados del crecimiento en peso de los langostinos según día, tratamiento y acuario (repetición) se muestran en la

tabla 7 del anexo 3.

Tabla 5. Crecimiento en peso (g) de los langostinos durante el ensayo *in vivo*.

Día	Esencia de menta	Control negativo	Oxitetraciclina
1	4,8	4,7	4,8
4	4,9	4,8	4,9
8	5,2	5,0	5,2
12	5,4	5,2	5,5
16	5,9 ^a	5,7 ^b	6,0 ^a

Al inicio los pesos promedio de los langostinos fueron similares, pero al finalizar el ensayo los langostinos que fueron tratados con esencia de menta obtuvieron un peso promedio de 5,9 g, que no fue estadísticamente diferente del peso promedio de los langostinos tratados con oxitetraciclina que fue de 6,0 g (test de Tukey, $p < 0,05$); ambos fueron estadísticamente superiores al peso de los langostinos en el control negativo que fue de 5,7 g (test de Tukey, $p < 0,05$). Los resultados del análisis de varianza y el test de Tukey para el crecimiento en peso en el ensayo *in vivo* se observan en el anexo 4.

Los resultados observados respecto al crecimiento de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. indican una modesta diferencia en el peso a favor de los langostinos tratados con esencia de menta así como los tratados con oxitetraciclina, lo cual podría justificarse porque la esencia de menta contiene fenoles y carotenoides que destruyen radicales libres acumulados en las células del huésped por el estrés; así que al reducir el gasto energético ocasionado por el estrés, la energía es utilizada para crecer (Akbari et al., 2017; Iqbal et al., 2013). Además Akbari et al. (2017), han precisado que la menta puede estimular la producción de enzimas digestivas: proteasas, amilasas y lipasas, en el langostino lo que ayudar en su crecimiento; aunque en tal investigación las diferencias de peso observados no fueron tan modestos como el de la presente investigación, lo cual probablemente se deba a que los langostinos en los que los autores referidos realizaron su investigación estuvieron sanos y no infectados con *Vibrio* spp.

4.4 NÚMERO DE COLONIAS DE *Vibrio* spp. EN HEPATOPÁNCREAS DE LANGOSTINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

En la figura 3, se observa el número de colonias de *Vibrio* spp. no fermentadores de sucrosa (colonias verdes), en el hepatopáncreas del langostino en el ensayo *in vivo*.

Del inicio del experimento hasta el cuarto día el recuento de *Vibrio* spp. no fermentadores de sucrosa fue similar en todos los tratamientos pero desde el día 8 en adelante, fue mayor para el tratamiento testigo y menor para la oxitetraciclina y la esencia de menta ($1,0 \times 10^6$ UFC/g para el control, $3,4 \times 10^5$ UFC/g para la oxitetraciclina y $5,4 \times 10^5$ UFC/g para la esencia de menta). Al final del experimento, en el día 16, el recuento de *Vibrio* spp. no fermentadores de sucrosa mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los tres tratamientos, siendo el tratamiento con oxitetraciclina el que menor recuento tuvo, seguido del tratamiento con esencia de menta y finalmente del tratamiento testigo que mostró el mayor recuento.

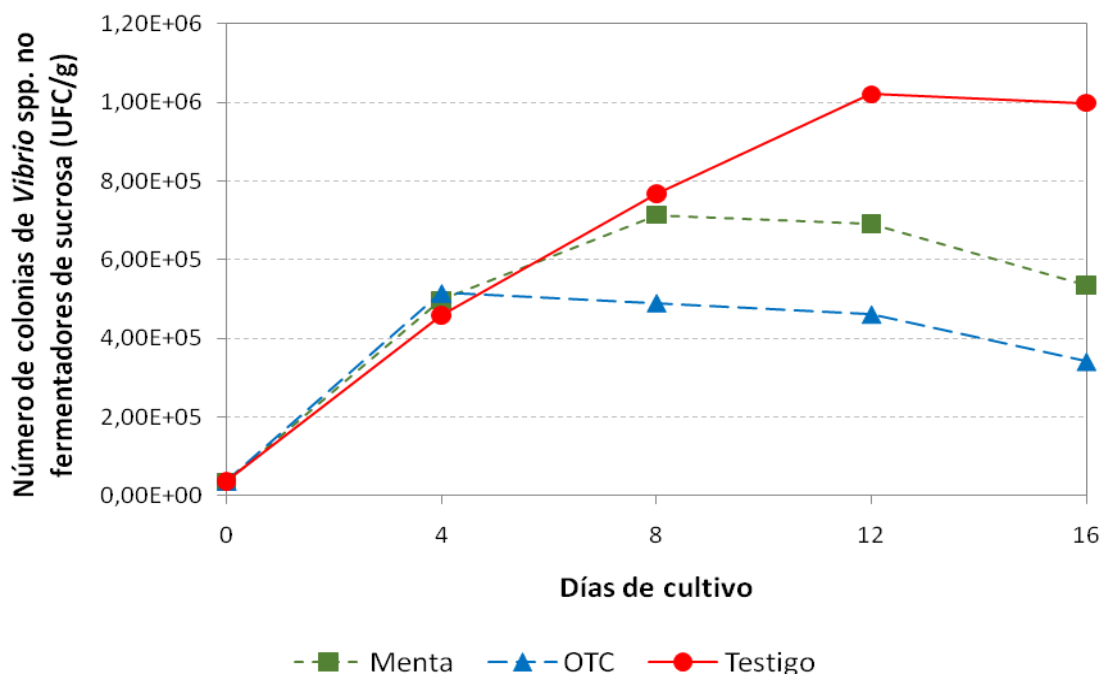


Figura 3. Número de colonias de *Vibrio* spp. no fermentadores de sucrosa (colonias verdes) según tratamiento durante el ensayo *in vivo*.

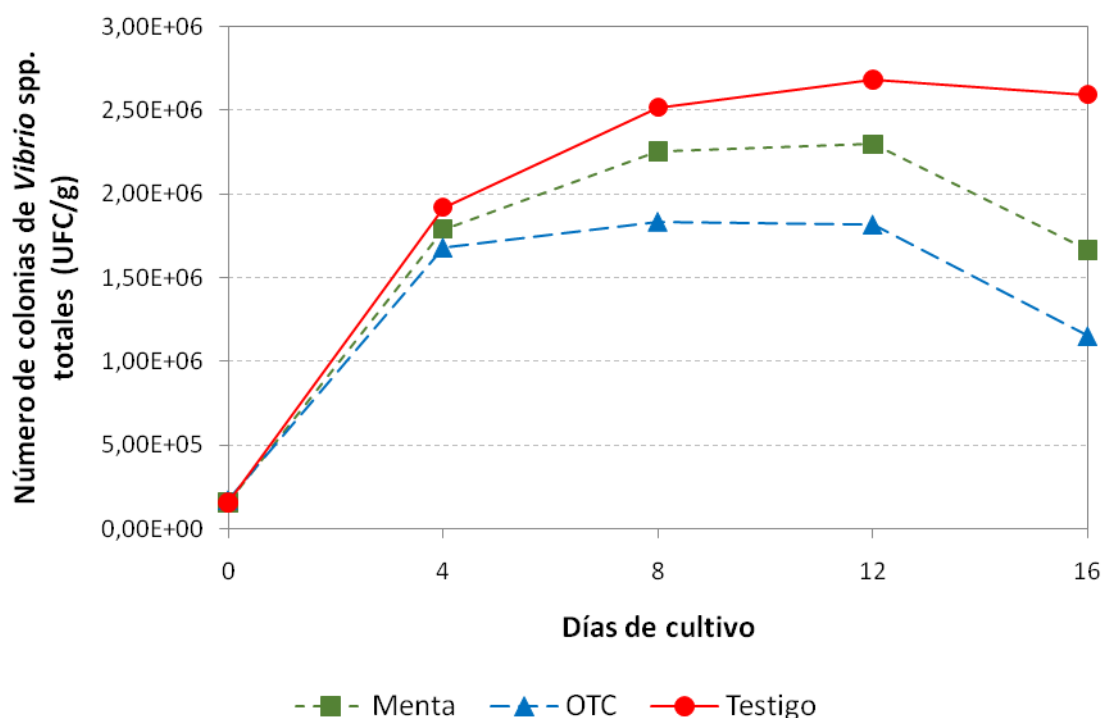


Figura 4. Número de colonias de *Vibrio* spp. totales según tratamiento durante el ensayo *in vivo*.

El número de colonias totales de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos mostró el éxito de la infección experimental al observarse un elevado número de colonias totales de *Vibrio* spp. según el criterio de Gómez-Gil (2005), por otra parte dado que el número de colonias de *Vibrio* spp. no fermentadores de sucrosa en el tratamiento control superó 10^6 UFC/g, es compatible con una vibriosis en los langostinos de acuerdo a los rangos de recuento de *Vibrio* spp. señalado por Gómez-Gil et al. (2015).

El tratamiento con esencia de menta mostró que pudo reducir el conteo de *Vibrio* spp. en el hepatopáncreas de los langostinos infectados experimentalmente, esto debido a que la menta tiene una probada actividad antibacteriana por los compuestos bioactivos que contiene: flavonoides, mentona, mentol, isomentona, geraniol, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, bornil acetato, borneol, canfor, eugenol, carvacrol, limoneno, α -pineno, β -pineno, piperitona, cinnamaldehido, p-cimeno y linalool, los cuales pueden destruir las paredes y membranas de las bacterias, desestabilizar su citoplasma y destruir las membranas internas de la célula

bacteriana como lo señalan (Soleimani et al., 2022)

A pesar de que el tratamiento con esencia de menta no pudo reducir el número de colonias de *Vibrio* spp. a niveles similares a los logrados con la oxitetraciclina, si obtuvo supervivencias y crecimientos en peso de los langostinos similares a los obtenidos por la oxitetraciclina, esto podría explicarse probablemente porque además de su poder antibacteriano la esencia de menta tendría un poder estimulante del sistema inmune, así como attractante y estimulante del apetito como lo han reportado Kawamura et al. (2019).

V. CONCLUSIONES

1. Los tres tipos de esencia de *Mentha piperita* ensayados: como macerado en aceite de oliva, como extracto etanólico en baño maría y como extracto en aceite de oliva en baño maría, en sus 3 dosis: 10, 15 y 20 µl, lograron inhibir el crecimiento *in vitro* de *Vibrio* spp. siendo el extracto etanólico en baño maría en dosis de 15 y 20 µl los que mayor inhibición produjeron, esta misma esencia aplicada al alimento balanceado en dosis de 15‰ inhibió *in vivo* el crecimiento de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*.
2. En el ensayo *in vitro*, los tratamientos basados en esencia de menta que mayor poder antibacteriano mostraron contra *Vibrio* spp. fueron los correspondientes a 15 y 20 µl de la esencia producida como etanólico en baño maría, con un poder inhibidor equivalente a aproximadamente el 50% de la oxitetraciclina comercial.
3. La supervivencia de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. que recibieron alimento balanceado con esencia de menta (producida como extracto etanólico en baño maría) en el ensayo *in vivo*, fue estadísticamente similar a la de los langostinos tratados con la oxitetraciclina y superior a la de los langostinos que no recibieron ninguna medicación.
4. El crecimiento de los langostinos infectados con *Vibrio* spp. en el ensayo *in vivo* que recibieron alimento balanceado con esencia de menta fue estadísticamente similar al logrado con la oxitetraciclina y superior al de los langostinos que no recibieron ninguna medicación, aunque la diferencia de peso entre los langostinos tratados (con esencia de menta y oxitetraciclina) y los no tratados fue muy reducida.
5. Se observó al final del ensayo *in vivo*, que el número de colonias de *Vibrio* spp. no fermentadoras de sucrosa y totales en el hepatopáncreas de los langostinos infectados mostraron diferencia estadística significativa entre los tres tratamientos, siendo menor para el tratamiento con oxitetraciclina, seguido del tratamiento con esencia de menta y finalmente por el tratamiento control.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto inhibitor de la esencia de *M. piperita* en mayor número de cepas de *Vibrio* spp. en *Litopenaeus vannamei*
2. Evaluar el efecto de la esencia de *M. piperita* en la respuesta inmunitaria del *Litopenaeus vannamei*.
3. Seguir con investigaciones relacionadas con la *M. piperita*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, L. S. (2014). *Determinar la resistencia antimicrobiana de las enterobacterias y el uso de antibióticos en pacientes de UCI de la Clínica D.A.M.E. 2014* [Tesis de Bioquímico, Universidad Superior Politécnica del Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3890/1/56T00499%20UDCTFC.pdf>
- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Ghiasi, M. (2016). Hemato – Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.040>
- Adel, M., Safari, R., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Esteban, M. Á. (2015). Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1), 623-629. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.005>
- Afridi, M. S., Ali, J., Abbas, S., Rehman, S. U., Khan, F. A., Khan, M. A., & Shahid, M. (2016). Essential oil composition of *Mentha piperita* L. and its antimicrobial effects against common human pathogenic bacterial and fungal strains. *Pharmacol Online*, 3, 90-97.
- Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Rodríguez-Fuentes, G., Escalante-Herrera, K. S., & Gaxiola, G. (2019). A vibriosis outbreak in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc and clear seawater. *Journal of Invertebrate Pathology*, 167, 107246. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107246>
- Akbary, P., Shoghi, M., & Fereidouni, M. S. (2017). Growth performance and digestive enzymes activities of Pacific white leg shrimp (*Litopenaus*

- vannamei*) juveniles fed dietary mixtures of four medicinal plants. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(4), 1157-1163.
- Azis, A., & Cahyadi, J. (2020). Benefits of tiwai onion (*Eleutherine americana*) extract as phytopharmaceutical plant to inhibit the growth of *Vibrio harveyi* through *in-vitro* and *in-vivo*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 12(1), 105-112. <https://doi.org/10.20473/jipk.v12i1.12826>
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J., & Sahul, A. S. (2008). Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.002>
- Bermúdez-Almada, M. D. C., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-Hernández, M. L., Barajas-Borgo, C. J., & Acedo-Félix, E. (2014). Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Biotecnia*, 16(3), 29-37. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.138>
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., & Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3-4), 249-272. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>
- Boukhebti, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4), 267-275.
- Cao, H., An, J., Zheng, W., & He, S. (2015). *Vibrio cholerae* pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* and control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.002>
- Choi, O., Cho, S. K., Kim, J., Park, C. G., & Kim, J. (2016). Antibacterial properties and major bioactive components of *Mentha piperita* essential oils against bacterial fruit blotch of watermelon. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(13-14), 325-334.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. CLSI supplement vet04* (3rd edition). CLSI. https://clsi.org/media/3646/vet04ed3_sample.pdf
- Desam, N. R., Al-Rajab, A. J., Sharma, M., Mylabathula, M. M., Gowkanapalli, R. R., & Albratty, M. (2019). Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 528-533. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.013>
- Dewi, N. R., Huang, H.-T., Wu, Y.-S., Liao, Z.-H., Lin, Y.-J., Lee, P.-T., & Nan, F.-H. (2021). Guava (*Psidium guajava*) leaf extract enhances immunity, growth, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 118, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.017>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Eftekhari, A., Khusro, A., Ahmadian, E., Dizaj, S. M., Hasanzadeh, A., & Cucchiarini, M. (2021). Phytochemical and nutra-pharmaceutical attributes of *Mentha* spp.: A comprehensive review. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(5), 103106. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103106>
- Eucast (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2022). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12*. Eucast. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020: La sostenibilidad en acción*. FAO. <http://www.fao.org/3/ca9229es/CA9229ES.pdf>
- Flegel, T. W. (2008). Confirmation of the right to refuse revision in the genus *Penaeus*. *Aquaculture*, 280(1–4), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.029>

- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Gómez-Gil, B. (2005). *Bacteriología de camarones*. <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Bacteriologia%20de%20camarones.pdf>
- Gómez-Gil, B., Roque, A., & Soto-Rodríguez, S. (2015). Vibriosis en camarones y su diagnóstico. En A. Ruiz-Luna, C. A. Berlanga-Robles, & M. Betancourt Lozano (Eds.), *Avances en acuicultura y manejo ambiental* (pp. 137-150). Editorial Trillas: CIAD. https://www.researchgate.net/profile/Bruno-Gomez-Gil/publication/235636525_Vibriosis_en_camarones_y_su_diagnostico_vibriosis_in_shrimp_and_its_diagnosis/links/0fcfd51224b70b98a0000000/Vibriosis-en-camarones-y-su-diagnostico-vibriosis-in-shrimp-and-its-diagnosis.pdf
- González, Á. A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas* [Trabajo Final de Titulación de Ingeniera Química, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 164-173. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.007>
- Iqbal, T., Hussain, A. I., Chatha, S. A. S., Naqvi, S. A. R., & Bokhari, T. H. (2013). Antioxidant activity and volatile and phenolic profiles of essential oil and different extracts of wild mint (*Mentha longifolia*) from the pakistani flora. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2013/536490>
- Jamal, M. T., Abdulrahman, I. A., Harbi, M. A., & Chithambaran, S. (2019). Probiotics as alternative control measures in shrimp aquaculture: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(3), 69-77. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70313>
- Kawamura, G., Yong, A. S.-K., Au, H.-L., Doison, A., Ooi, S.-Y., & Lim, L.-S. (2019).

Malaysian herbs as feeding attractants and enhancers for the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture* (BJoMSA), 3(2), 57-67.

Klūga, A., Terentjeva, M., Kántor, A., Kluz, M., Puchalski, C., & Kačániová, M. (2017). Antibacterial Activity of *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Origanum vulgare* L. and *Malva mauritiana* against Bacterial Microflora Isolated from Fish. *Advanced Research in Life Sciences*, 1(1), 75-80. <https://doi.org/10.1515/arls-2017-0013>

Lin, H., Yu, M., Wang, X., & Zhang, X.-H. (2018). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of vibrios. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4531-2>

Lomelí-Ortega, C. O., & Martínez-Díaz, S. F. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>

Low, C. F., & Chong, C. M. (2020). Peculiarities of innate immune memory in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.047>

Maraví, G. G. (2012). *Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de Mentha piperita (menta), Origanum vulgare (orégano) y Cymbopogon citratus (hierba luisa) sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Candida albicans ATCC 90028* [Tesis de Cirujano Dentista, Universidad Wiener]. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/48/018%20EAP%20ODONTOLOGIA%20TESIS%20-%20MARAV%c3%8d%20INGA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Martínez, C. (2018). *Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <http://eprints.ucm.es/46375/1/T39569.pdf>

Ngo, H.-V.-T., Huang, H.-T., Lee, P.-T., Liao, Z.-H., Chen, H.-Y., & Nan, F.-H.

- (2020). Effects of *Phyllanthus amarus* extract on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 107, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.016>
- Radaelli, M., da Silva, B. P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., da Costa, L. A. M. A., & Ethur, E. M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 424-430. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.10.001>
- Rosado, A. A. (2018). *Resistencia antimicrobiana de bacterias del género Vibrio en langostino blanco (Litopenaeus vannamei) en centros de cultivo de la región Tumbes* [Tesis de Médico Veterinario, Universidad Ricardo Palma]. http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1686/Rosado_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Roslan, S., Taher, S., Ehteshamei, F., Arshad, A., & Romano, N. (2016). Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) essential oil on survival, growth, cannibalism and hepatopancreatic histopathology of *Portunus pelagicus* juveniles. *Journal of Environmental Biology*, 37(4 Spec No), 785-790.
- Santiago, M. L., Espinosa, A., & Bermúdez, M. C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32.
- Serrano, L. V. (2014). *Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida* [Tesis de Ingeniero en Acuicultura, Escuela Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25086/1/Tesis%20Lizette%20Serrano.pdf>
- Shahbazi, Y. (2015). Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic *Bacteria*. *Journal of Pathogens*, 2015(916305), 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/916305>
- Silvester, R., Alexander, D., Antony, A. C., & Hatha, M. (2017). GroEL PCR- RFLP – An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species.

Microbial Pathogenesis, 105, 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.029>

- Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., & De Feo, V. (2015). *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. *Strains. Molecules*, 20(8), 14402-14424. <https://doi.org/10.3390/molecules200814402>
- Soleimani, M., Arzani, A., Arzani, V., & Roberts, T. H. (2022). Phenolic compounds and antimicrobial properties of mint and thyme. *Journal of Herbal Medicine*, 36, 100604. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100604>
- Stalin, N., & Srinivasan, P. (2016). Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Microbial Pathogenesis*, 97, 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.021>
- Talpur, A. D. (2014). *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 420-421, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.039>
- Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T. Y., Lee, E., Rollon, W. D., Hara, H., Kayal, A. Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1602-1608. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.002>
- Tomazelli, O., Kuhn, F., Mendonça, P. J., Nunes, C., Mestres, M., Dal Magro, J., & De Lamo, S. (2018). Effect of microencapsulated thyme essential oil on white spot virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 26(6), 1459-1468. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0296-5>
- Trichet, V. V. (2010). Nutrition and immunity: An update. *Aquaculture Research*, 41(3), 356-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x>
- Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos

- farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 1-14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Williams, S. L., Jensen, R. V., Kuhn, D. D., & Stevens, A. M. (2017). Analyzing the metabolic capabilities of a *Vibrio parahaemolyticus* strain that causes Early Mortality Syndrome in shrimp. *Aquaculture*, 476, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.030>
- World Bank. (2014). *Reducing disease risk in aquaculture*. World Bank. <http://documents.worldbank.org/curated/en/110681468054563438/pdf/882570REPLACEMENT00NAME0Reantaso0Melba.pdf>
- Yábar, A., & Baca, L. K. (2016). Efectos antibacteriano *in vitro* de los aceites esenciales de: *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Cymbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (orégano), *Citrus aurantifolia* swingle (limón) y *Citrus sinensis* (naranja), frente a cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans*, Cusco 2016. [Tesis de Cirujano Dentista, Universidad Andina del Cusco]. http://repositorio.uandina.edu.pe/bitstream/UAC/559/3/Lisbeth_Adriana_Tesis_bachiller_2016.pdf
- Zelada, J. J. (2019). *Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de Mentha spicata (menta) frente a Staphylococcus aureus* [Tesis de Químico Farmacéutico, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote]. http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/10993/EFEECTO_HALOS_ZELADA_BECERRA_JESSICA_JANETH.pdf?sequence=1
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X.-H. (2016). Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 451, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>
- Zuni, J. (2017). *Actividad antibacteriana "in vitro" del aceite esencial de Menta (Mentha piperita L.) frente a Escherichia coli enteropatógena (EPEC)* [Tesis de Biólogo, Universidad Nacional del Altiplano]. http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4194/Zuni_Mamani_Jhonny.pdf?sequence=1&isAllowed=y

ANEXOS

Anexo 1

Análisis de varianza y test de Tukey para los halos de inhibición en *Vibrio* spp. por el aceite esencial de menta en el ensayo *in vitro*.

ANOVA de un factor

Diámetro del halo de inhibición (mm)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	26249,083	11	2386,280	263,588	0,000
Intra-grupos	2064,100	228	9,053		
Total	28313,183	239			

Pruebas post hoc

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: Diámetro del halo de inhibición (mm)

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-1,85000	0,95148	0,730	-4,9922	1,2922
	3	-4,60000*	0,95148	0,000	-7,7422	-1,4578
	4	-27,70000*	0,95148	0,000	-30,8422	-24,5578
	5	-4,60000*	0,95148	0,000	-7,7422	-1,4578
	6	-8,15000*	0,95148	0,000	-11,2922	-5,0078
	7	-11,20000*	0,95148	0,000	-14,3422	-8,0578
	8	-26,70000*	0,95148	0,000	-29,8422	-23,5578
	9	-0,25000	0,95148	1,000	-3,3922	2,8922
	10	-2,65000	0,95148	0,194	-5,7922	0,4922
	11	-6,45000*	0,95148	0,000	-9,5922	-3,3078
	12	-28,15000*	0,95148	0,000	-31,2922	-25,0078
	2	1	1,85000	0,95148	0,730	-1,2922
3		-2,75000	0,95148	0,151	-5,8922	0,3922
4		-25,85000*	0,95148	0,000	-28,9922	-22,7078

2	5	-2,75000	0,95148	0,151	-5,8922	0,3922	
	6	-6,30000*	0,95148	0,000	-9,4422	-3,1578	
	7	-9,35000*	0,95148	0,000	-12,4922	-6,2078	
	8	-24,85000*	0,95148	0,000	-27,9922	-21,7078	
	9	1,60000	0,95148	0,875	-1,5422	4,7422	
	10	-0,80000	0,95148	1,000	-3,9422	2,3422	
	11	-4,60000*	0,95148	0,000	-7,7422	-1,4578	
	12	-26,30000*	0,95148	0,000	-29,4422	-23,1578	
	3	1	4,60000*	0,95148	0,000	1,4578	7,7422
		2	2,75000	0,95148	0,151	-0,3922	5,8922
		4	-23,10000*	0,95148	0,000	-26,2422	-19,9578
		5	0,00000	0,95148	1,000	-3,1422	3,1422
6		-3,55000*	0,95148	0,013	-6,6922	-0,4078	
7		-6,60000*	0,95148	0,000	-9,7422	-3,4578	
8		-22,10000*	0,95148	0,000	-25,2422	-18,9578	
9		4,35000*	0,95148	0,000	1,2078	7,4922	
10		1,95000	0,95148	0,659	-1,1922	5,0922	
11		-1,85000	0,95148	0,730	-4,9922	1,2922	
12		-23,55000*	0,95148	0,000	-26,6922	-20,4078	
4		1	27,70000*	0,95148	0,000	24,5578	30,8422
	2	25,85000*	0,95148	0,000	22,7078	28,9922	
	3	23,10000*	0,95148	0,000	19,9578	26,2422	
	5	23,10000*	0,95148	0,000	19,9578	26,2422	
	6	19,55000*	0,95148	0,000	16,4078	22,6922	
	7	16,50000*	0,95148	0,000	13,3578	19,6422	
	8	1,00000	0,95148	0,996	-2,1422	4,1422	
	9	27,45000*	0,95148	0,000	24,3078	30,5922	
	10	25,05000*	0,95148	0,000	21,9078	28,1922	
	11	21,25000*	0,95148	0,000	18,1078	24,3922	
	12	-0,45000	0,95148	1,000	-3,5922	2,6922	
	5	1	4,60000*	0,95148	0,000	1,4578	7,7422
2		2,75000	0,95148	0,151	-0,3922	5,8922	
3		0,00000	0,95148	1,000	-3,1422	3,1422	
4		-23,10000*	0,95148	0,000	-26,2422	-19,9578	
6		-3,55000*	0,95148	0,013	-6,6922	-0,4078	
7		-6,60000*	0,95148	0,000	-9,7422	-3,4578	
8		-22,10000*	0,95148	0,000	-25,2422	-18,9578	
9		4,35000*	0,95148	0,000	1,2078	7,4922	
10		1,95000	0,95148	0,659	-1,1922	5,0922	
11		-1,85000	0,95148	0,730	-4,9922	1,2922	
12		-23,55000*	0,95148	0,000	-26,6922	-20,4078	
6		1	8,15000*	0,95148	0,000	5,0078	11,2922

6	2	6,30000*	0,95148	0,000	3,1578	9,4422	
	3	3,55000*	0,95148	0,013	0,4078	6,6922	
	4	-19,55000*	0,95148	0,000	-22,6922	-16,4078	
	5	3,55000*	0,95148	0,013	0,4078	6,6922	
	7	-3,05000	0,95148	0,066	-6,1922	0,0922	
	8	-18,55000*	0,95148	0,000	-21,6922	-15,4078	
	9	7,90000*	0,95148	0,000	4,7578	11,0422	
	10	5,50000*	0,95148	0,000	2,3578	8,6422	
	11	1,70000	0,95148	0,824	-1,4422	4,8422	
	12	-20,00000*	0,95148	0,000	-23,1422	-16,8578	
	7	1	11,20000*	0,95148	0,000	8,0578	14,3422
		2	9,35000*	0,95148	0,000	6,2078	12,4922
3		6,60000*	0,95148	0,000	3,4578	9,7422	
4		-16,50000*	0,95148	0,000	-19,6422	-13,3578	
5		6,60000*	0,95148	0,000	3,4578	9,7422	
6		3,05000	0,95148	0,066	-0,0922	6,1922	
8		-15,50000*	0,95148	0,000	-18,6422	-12,3578	
9		10,95000*	0,95148	0,000	7,8078	14,0922	
10		8,55000*	0,95148	0,000	5,4078	11,6922	
11		4,75000*	0,95148	0,000	1,6078	7,8922	
12		-16,95000*	0,95148	0,000	-20,0922	-13,8078	
8		1	26,70000*	0,95148	0,000	23,5578	29,8422
	2	24,85000*	0,95148	0,000	21,7078	27,9922	
	3	22,10000*	0,95148	0,000	18,9578	25,2422	
	4	-1,00000	0,95148	0,996	-4,1422	2,1422	
	5	22,10000*	0,95148	0,000	18,9578	25,2422	
	6	18,55000*	0,95148	0,000	15,4078	21,6922	
	7	15,50000*	0,95148	0,000	12,3578	18,6422	
	9	26,45000*	0,95148	0,000	23,3078	29,5922	
	10	24,05000*	0,95148	0,000	20,9078	27,1922	
	11	20,25000*	0,95148	0,000	17,1078	23,3922	
	12	-1,45000	0,95148	0,933	-4,5922	1,6922	
	9	1	0,25000	0,95148	1,000	-2,8922	3,3922
2		-1,60000	0,95148	0,875	-4,7422	1,5422	
3		-4,35000*	0,95148	0,000	-7,4922	-1,2078	
4		-27,45000*	0,95148	0,000	-30,5922	-24,3078	
5		-4,35000*	0,95148	0,000	-7,4922	-1,2078	
6		-7,90000*	0,95148	0,000	-11,0422	-4,7578	
7		-10,95000*	0,95148	0,000	-14,0922	-7,8078	
8		-26,45000*	0,95148	0,000	-29,5922	-23,3078	
10		-2,40000	0,95148	0,332	-5,5422	0,7422	
11		-6,20000*	0,95148	0,000	-9,3422	-3,0578	

9	12	-27,90000*	0,95148	0,000	-31,0422	-24,7578
10	1	2,65000	0,95148	0,194	-0,4922	5,7922
	2	0,80000	0,95148	1,000	-2,3422	3,9422
	3	-1,95000	0,95148	0,659	-5,0922	1,1922
	4	-25,05000*	0,95148	0,000	-28,1922	-21,9078
	5	-1,95000	0,95148	0,659	-5,0922	1,1922
	6	-5,50000*	0,95148	0,000	-8,6422	-2,3578
	7	-8,55000*	0,95148	0,000	-11,6922	-5,4078
	8	-24,05000*	0,95148	0,000	-27,1922	-20,9078
	9	2,40000	0,95148	0,332	-0,7422	5,5422
	11	-3,80000*	0,95148	0,005	-6,9422	-0,6578
	12	-25,50000*	0,95148	0,000	-28,6422	-22,3578
11	1	6,45000*	0,95148	0,000	3,3078	9,5922
	2	4,60000*	0,95148	0,000	1,4578	7,7422
	3	1,85000	0,95148	0,730	-1,2922	4,9922
	4	-21,25000*	0,95148	0,000	-24,3922	-18,1078
	5	1,85000	0,95148	0,730	-1,2922	4,9922
	6	-1,70000	0,95148	0,824	-4,8422	1,4422
	7	-4,75000*	0,95148	0,000	-7,8922	-1,6078
	8	-20,25000*	0,95148	0,000	-23,3922	-17,1078
	9	6,20000*	0,95148	0,000	3,0578	9,3422
	10	3,80000*	0,95148	0,005	0,6578	6,9422
	12	-21,70000*	0,95148	0,000	-24,8422	-18,5578
12	1	28,15000*	0,95148	0,000	25,0078	31,2922
	2	26,30000*	0,95148	0,000	23,1578	29,4422
	3	23,55000*	0,95148	0,000	20,4078	26,6922
	4	0,45000	0,95148	1,000	-2,6922	3,5922
	5	23,55000*	0,95148	0,000	20,4078	26,6922
	6	20,00000*	0,95148	0,000	16,8578	23,1422
	7	16,95000*	0,95148	0,000	13,8078	20,0922
	8	1,45000	0,95148	0,933	-1,6922	4,5922
	9	27,90000*	0,95148	0,000	24,7578	31,0422
	10	25,50000*	0,95148	0,000	22,3578	28,6422
	11	21,70000*	0,95148	0,000	18,5578	24,8422

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Diámetro de halos de inhibición (mm)

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1	20	10,4500					
9	20	10,7000					
2	20	12,3000	12,3000				
10	20	13,1000	13,1000				
3	20		15,0500	15,0500			
5	20		15,0500	15,0500			
11	20			16,9000	16,9000		
6	20				18,6000	18,6000	
7	20					21,6500	
8	20						37,1500
4	20						38,1500
12	20						38,6000
Sig.		0,194	0,151	0,730	0,824	0,066	0,933

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000.

Anexo 2

Tabla 6. Registro de supervivencia de langostino infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. según tratamiento y repetición

Día de cultivo	Esencia de menta			Control negativo			Oxitetraciclina		
	Acuario 1	Acuario 2	Acuario 3	Acuario 1	Acuario 2	Acuario 3	Acuario 1	Acuario 2	Acuario 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	95	90	90	90	90	85	95	100	85
8	85	85	70	75	75	75	85	95	75
12	65	70	60	65	55	55	70	95	70
16	45	65	60	50	40	50	60	85	65

Anexo 3

Tabla 7. Peso promedio (g) de langostinos infectados experimentalmente con *Vibrio* spp. por tiempo de cultivo y según tratamiento y repetición.

Tratamiento	Repetición	Tiempo de cultivo (días)				
		1	4	8	12	16
Esencia de menta	Acuario 1	4,6	4,7	5,4	5,3	5,9
	Acuario 2	5,0	4,9	4,9	5,5	6,0
	Acuario 3	4,8	5,1	5,3	5,4	5,8
	Promedio ±					
	Desv. Estándar	4,8 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,3	5,4 ± 0,1	5,9 ± 0,1
Control negativo	Acuario 1	4,9	4,9	4,7	5,1	5,7
	Acuario 2	4,6	4,6	5,2	5,3	5,7
	Acuario 3	4,6	4,9	5,1	5,2	5,7
	Promedio ±					
	Desv. Estándar	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	5,0 ± 0,3	5,2 ± 0,1	5,7 ± 0,0
Oxitetraciclina	Acuario 1	4,6	4,7	4,7	5,4	6,0
	Acuario 2	5,0	5,1	5,2	5,4	6,1
	Acuario 3	4,8	4,9	5,7	5,7	6,0
	Promedio ±					
	Desv. Estándar	4,8 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,5	5,5 ± 0,2	6,0 ± 0,1

Anexo 4

Análisis de varianza y test de Tukey para el crecimiento en peso de *Litopenaeus vannamei* en el ensayo *in vivo*.

Día = 1

ANOVA de un factor^a

Peso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,020	2	0,010	0,273	0,770
Intra-grupos	0,220	6	0,037		
Total	0,240	8			

a. Día = 1

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples^a

Variable dependiente: Peso

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Esencia menta	Control negativo	0,1000	0,1563	0,805	-0,380	0,580
	Oxitetraciclina	0,0000	0,1563	1,000	-0,480	0,480
Control negativo	Esencia menta	-0,1000	0,1563	0,805	-0,580	0,380
	Oxitetraciclina	-0,1000	0,1563	0,805	-0,580	0,380
Oxitetraciclina	Esencia menta	0,0000	0,1563	1,000	-0,480	0,480
	Control negativo	0,1000	0,1563	0,805	-0,380	0,580

a. Día = 1

Subconjuntos homogéneos

Peso^a

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05
		1
Control negativo	3	4,700
Esencia menta	3	4,800
Oxitetraciclina	3	4,800
Sig.		0,805

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Día = 1

b. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Día = 4

ANOVA de un factor^a

Peso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,020	2	0,010	0,273	0,770
Intra-grupos	0,220	6	0,037		
Total	0,240	8			

a. Día = 4

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples^a

Variable dependiente: Peso
HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Esencia menta	Control negativo	0,1000	0,1563	0,805	-0,380	0,580
	Oxitetraciclina	0,0000	0,1563	1,000	-0,480	0,480
Control negativo	Esencia menta	-0,1000	0,1563	0,805	-0,580	0,380
	Oxitetraciclina	-0,1000	0,1563	0,805	-0,580	0,380
Oxitetraciclina	Esencia menta	0,0000	0,1563	1,000	-0,480	0,480
	Control negativo	0,1000	0,1563	0,805	-0,380	0,580

a. Día = 4

Subconjuntos homogéneos

Peso^a

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Control negativo	3	4,800
Esencia menta	3	4,900
Oxitetraciclina	3	4,900
Sig.		0,805

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Día = 4

b. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Día = 8

ANOVA de un factor^a

Peso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,080	2	0,040	0,308	0,746
Intra-grupos	0,780	6	0,130		
Total	0,860	8			

a. Día = 8

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples^a

Variable dependiente: Peso
HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Esencia menta	Control negativo	0,2000	0,2944	0,784	-0,703	1,103
	Oxitetraciclina	0,0000	0,2944	1,000	-0,903	0,903
Control negativo	Esencia menta	-0,2000	0,2944	0,784	-1,103	0,703
	Oxitetraciclina	-0,2000	0,2944	0,784	-1,103	0,703
Oxitetraciclina	Esencia menta	0,0000	0,2944	1,000	-0,903	0,903
	Control negativo	0,2000	0,2944	0,784	-0,703	1,103

a. Día = 8

Subconjuntos homogéneos

Peso^a

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Control negativo	3	5,000
Esencia menta	3	5,200
Oxitetraciclina	3	5,200
Sig.		,784

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Día = 8

b. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Día = 12

ANOVA de un factor^a

Peso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,140	2	0,070	4,200	0,072
Intra-grupos	0,100	6	0,017		
Total	0,240	8			

a. Día = 12

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples^a

Variable dependiente: Peso

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Esencia menta	Control negativo	0,2000	0,1054	0,220	-0,123	0,523
	Oxitetraciclina	-0,1000	0,1054	0,632	-0,423	0,223
Control negativo	Esencia menta	-0,2000	0,1054	0,220	-0,523	0,123
	Oxitetraciclina	-0,3000	0,1054	0,066	-0,623	0,023
Oxitetraciclina	Esencia menta	0,1000	0,1054	0,632	-0,223	0,423
	Control negativo	0,3000	0,1054	0,066	-0,023	0,623

a. Día = 12

Subconjuntos homogéneos

Peso^a

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Control negativo	3	5,200
Esencia menta	3	5,400
Oxitetraciclina	3	5,500
Sig.		0,066

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Día = 12

b. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Día = 16

ANOVA de un factor^a

Peso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,169	2	0,084	19,000	0,003
Intra-grupos	0,027	6	0,004		
Total	0,196	8			

a. Día = 16

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples^a

Variable dependiente: Peso

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Esencia menta	Control negativo	0,2000*	0,0544	0,024	0,033	0,367
	Oxitetraciclina	-0,1333	0,0544	0,109	-0,300	0,034
Control negativo	Esencia menta	-0,2000*	0,0544	0,024	-0,367	-0,033
	Oxitetraciclina	-0,3333*	0,0544	0,002	-0,500	-0,166
Oxitetraciclina	Esencia menta	0,1333	0,0544	0,109	-0,034	0,300
	Control negativo	0,3333*	0,0544	0,002	0,166	0,500

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Día = 16

Subconjuntos homogéneos

Peso^a

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control negativo	3	5,700	
Esencia menta	3		5,900
Oxitetraciclina	3		6,033
Sig.		1,000	0,109

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Día = 16

b. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.