

El extracto de *Mentha piperita* incrementa la supervivencia del camarón *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp

Mentha piperita extract increases survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp experimentally infected with *Vibrio* spp

Gianmarco Mendoza Noblecilla¹, Alberto Ordinola-Zapata^{1,2,3}

RESUMEN

Las enfermedades bacterianas más importantes en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* son las vibriosis originadas por *Vibrio* spp, las que son usualmente tratadas con oxitetraciclina (OTH). Los extractos vegetales son una alternativa para su tratamiento. El estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de tres extractos de menta (*Mentha piperita*) en la supervivencia de camarones infectados experimentalmente con *Vibrio* spp. Se prepararon tres extractos: etanólico en baño maría (EBM), en aceite de oliva en baño maría (ABM) y macerado en aceite de oliva (MA). Se aislaron 20 cepas de *Vibrio* spp de camarones de cultivo y se realizó un ensayo *in vitro* de su sensibilidad a tres dosis (10, 15 y 20 µl) de los extractos. Se realizó un ensayo *in vivo* por 16 días con 180 camarones de 4.5 g infectados por inmersión con 10⁵ UFC/ml de las cepas de *Vibrio* spp en tres tratamientos: 1) alimento con EBM, 2) con 3‰ de OTH y 3) sin ningún aditivo. Se evaluó la supervivencia, crecimiento y carga de *Vibrio* spp en el hepatopáncreas. Se

¹ Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú

² Grupo de Biodiversidad Acuática Tropical (BioTrop), Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú

³ E-mail: aordinolaz@untumbes.edu.pe

Recibido: 7 de septiembre de 2021

Aceptado para publicación: 5 de abril de 2022

Publicado: 29 de junio de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

determinó que *in vitro*, los tres tipos de extractos pudieron inhibir a *Vibrio* spp, siendo 20 µl de EBM el de mayor inhibición, aunque su poder fue menor al de OTH (diámetro del halo de inhibición equivalente a 58.2% del de OTH). En el ensayo *in vivo*, el EBM mostró ser tan eficiente como la OTH en incrementar la supervivencia y el crecimiento en peso, así como en reducir la carga de *Vibrio* spp en hepatopáncreas de los camarones infectados ($p < 0.05$). Se concluyó que el EBM es una alternativa tan eficiente como la oxitetraciclina para incrementar la supervivencia de camarones infectados con *Vibrio* spp.

Palabras clave: langostino, mortalidad, tratamiento alternativo, fitobiótico, menta, antibiótico

ABSTRACT

The most important bacterial diseases in *Litopenaeus vannamei* farming are vibriosis caused by *Vibrio* spp, which are usually treated with oxytetracycline (OTH). Plant extracts are an alternative for its treatment. The study aimed to determine the effect of three extracts of peppermint (*Mentha piperita*) on the survival of shrimp experimentally infected with *Vibrio* spp. Three mint extracts were prepared: ethanolic in a water bath (EBM), in olive oil in a water bath (ABM) and macerated in olive oil (MA). Twenty strains of *Vibrio* spp were isolated from farmed shrimp and it was performed an *in vitro* assay for their sensitivity to three doses of the extracts (10, 15 and 20 µl). An *in vivo* trial was carried out for 16 days with 180 shrimp of 4.5 g infected by immersion with 10^5 CFU/ml of *Vibrio* spp strains in three treatments: 1) feed with EBM, 2) with 3% OTH and 3) without those additives. The survival rate, growth and load of *Vibrio* spp in the hepatopancreas were evaluated. It was determined that *in vitro*, the three types of extracts were able to inhibit *Vibrio* spp, with 20 µl of EBM being the one with the greatest inhibition, although its power was lower than that of OTH (diameter of the inhibition halo equivalent to 58.2% of that of OTH). In the *in vivo* assay, EBM showed to be as efficient as OTH in increasing survival rate and growth in weight, as well as in reducing the load of *Vibrio* spp in the hepatopancreas of infected shrimp ($p < 0.05$). It was concluded that EBM is an alternative as efficient as oxytetracycline to increase the survival of shrimp infected with *Vibrio* spp.

Key words: shrimp, mortality, alternative treatment, phyto-biotic, mint, antibiotic

INTRODUCCIÓN

Las vibriosis son un conjunto de enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio*, de gran importancia para la acuicultura a nivel mundial, pues afecta a un gran número de especies en cultivo, ya sea peces, crustáceos o moluscos (Rakesh *et al.*, 2018; Arunkumar *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2020; de Souza y Wan, 2021). Las vibriosis son las principales enfermedades bacterianas en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus*

vannamei (Amatul-Samahah *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2021). Entre ellas, la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) ha originado fuertes pérdidas económicas en cultivos de camarones de Asia y Norteamérica (Santos *et al.*, 2020; Culot *et al.*, 2021; Restrepo *et al.*, 2021).

En el tratamiento de las vibriosis en camarones se han usado antibióticos como oxitetraciclina, enrofloxacina, florfenicol, norfloxacina, sarafloxacina y ormetoprim-sulfametoxazol (Santiago *et al.*, 2009;

Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Rakesh *et al.*, 2018). En el caso de los cultivos de camarón en Perú, la oxitetraciclina se utiliza en dosis de al menos 3 g/kg de alimento balanceado, pero algunos acuicultores aplican dosis que superan la máxima recomendable de 4.5 g/kg (Aguirre *et al.*, 2021; Avunje *et al.*, 2021).

Dadas las crecientes restricciones hacia el uso de antibióticos en el cultivo (Amatul-Samahah *et al.*, 2020) y la ocurrencia de resistencia antibiótica (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018; Varela y Choc-Martínez, 2020; Vaiyapuri *et al.*, 2021), se viene buscando alternativas no antibióticas para el tratamiento de las vibriosis, habiéndose investigado probióticos, prebióticos, simbióticos, vacunas, fagos y fitobióticos (Amatul-Samahah *et al.*, 2020; Domínguez-Borbor *et al.*, 2020; Borges *et al.*, 2021). Los fitobióticos en particular, presentan interesantes ventajas frente a los antibióticos, pues son biodegradables y no se acumulan en los tejidos animales (Dawood *et al.*, 2021). Los fitobióticos incluyen a los aceites esenciales y extractos obtenidos de plantas con propiedades medicinales (Domínguez-Borbor *et al.*, 2020).

Las plantas del género *Mentha* han sido tradicionalmente utilizadas por más de 250 años para el tratamiento de enfermedades en humanos poseen múltiples propiedades, entre ellas las antibacterianas (Diniz *et al.*, 2020; Eftekhari *et al.*, 2021; Gholamipourfard *et al.*, 2021), sus aceites esenciales están constituidos por más de 30 compuestos químicos, siendo los más abundantes: mentol, mentona, d-carvona, limoneno, epoxiocimeno, linalool, eucaliptol y neo-mentol (Diniz *et al.*, 2020; Gholamipourfard *et al.*, 2021). La menta se ha utilizado en cultivos acuícolas, principalmente como anestésico (Metin *et al.*, 2015), promotor de crecimiento (Snoussi *et al.*, 2015), antiparasitario (de Oliveira *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2020), inmunoestimulante (Adel *et al.*, 2015a,b), antifúngico (Adel *et al.*, 2020) y antibacteriano (Talpur, 2014; Snoussi *et al.*, 2015; Chagas *et al.*, 2020). En el caso del camarón *Litopenaeus vannamei*, se le

ha usado como promotor de crecimiento y estimulante de enzimas digestivas (Akbari *et al.*, 2017), así como atrayente alimenticio (Kawamura *et al.*, 2019).

La literatura científica no revela trabajos de investigación donde se haya empleado la menta como agente antibacteriano para el control de enfermedades o para incrementar la supervivencia del camarón en cultivo. Ante esto, esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de tres extractos de menta sobre la supervivencia de camarones infectados experimentalmente con *Vibrio* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos de Menta

Se recolectaron 9 kg de hojas maduras aparentemente sanas de *Mentha piperita*, y se secaron bajo sombra durante 10 días. Con las hojas secas se prepararon tres extractos: 1) etanólico procesado en baño maría (EBM), 2) en aceite de oliva y procesado en baño maría (ABM) y 3) macerado en aceite de oliva (MA).

El EBM se preparó colocando 150 g de hojas secas de menta molidas en 200 ml de etanol al 96%, el cual fue colocado en baño maría a 70 °C por 3 h y luego fue filtrado para retirar restos de material vegetal. El ABM fue preparado con las mismas proporciones y método usado para el EBM, pero en lugar de etanol se empleó aceite de oliva. Para el MA, 250 g de hojas secas molidas en 375 ml de aceite de oliva fueron puestas en maceración durante 30 días, y luego fue filtrado.

Cepas de *Vibrio* spp

Diez camarones *L. vannamei* con peso promedio de 4 g fueron donados por una empresa langostinera de la zona de Puerto Pizarro (Tumbes). Estos fueron recolectados de un estanque en el que se tuvo problemas

por vibriosis durante el cultivo. Los camarones fueron sacrificados siguiendo las directrices de la Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA, 2016).

El aislamiento y purificación de las cepas de *Vibrio* se realizó según el método de Jeyasanta *et al.* (2017), con modificaciones. De cada camarón se extrajo el hepatopáncreas e intestino, se tomó una porción de aproximadamente 100 mg entre ambos órganos. Se tomaron las muestras de intestino y hepatopáncreas de tres camarones con las que se hizo un *pool* que fue triturado en 900 μ l de solución salina (0.85% de NaCl). Se obtuvieron cuatro *pools*, con los cuales se realizaron diluciones sucesivas de 10^0 a 10^{-3} , que fueron sembradas en placas con medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) suplementado con NaCl (concentración final de 2.5%). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

Se seleccionaron 45 colonias que fueron las más representativas que crecieron en el medio TCBS. Estas fueron subcultivadas en medio agar tripticosa soya (TSA) por 24 h a 37 °C hasta obtener cultivos puros. Se obtuvieron 20 cepas puras de *Vibrio* spp, las que fueron almacenadas en congelación a -20 °C en caldo lisogenia (LB) suplementado con NaCl (concentración final de 2.5%) y glicerol (concentración final de 15%).

Las colonias bacterianas que al crecer en el medio TCBS, fueron circulares, verdes o amarillas, con diámetros pequeños a moderados (1 a 5 mm), bordes enteros y elevación convexa, fueron identificadas presuntamente como originadas por cepas de *Vibrio* spp (Sabir *et al.*, 2013). Se verificó la identidad de dichas cepas realizando tinción de Gram y prueba de catalasa y oxidasa, así como crecimiento en soluciones de NaCl, a fin de apreciar las cepas con características compatibles con las de *Vibrio* spp (Rosado, 2018).

Sensibilidad de las Cepas de *Vibrio* spp

Se prepararon discos de papel filtro de 6 mm de diámetro a los que se agregó 10, 15 y 20 μ l de cada extracto (EBM, ABM y MA). El ensayo *in vitro* se realizó mediante un diseño en bloques completamente al azar, teniendo como tratamientos los extractos en sus tres dosis y como control discos comerciales de oxitetraciclina (30 μ g). Se consideró como bloques las 20 cepas de *Vibrio* spp que fueron aisladas a partir de los camarones infectados.

Las cepas de *Vibrio* spp fueron sembradas a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml (equivalente al estándar de MacFarland 0.5) en placas con agar Mueller Hinton (MH). En las placas se colocaron los discos de papel filtro con las tres dosis de cada extracto, así como el disco control. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C, luego de lo cual se midió el diámetro de los halos de inhibición formados por cada uno de los tratamientos. Los datos de los halos de inhibición fueron analizados estadísticamente con las pruebas de análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey, ambas con 0.05 de nivel de significancia.

Control de Vibriosis

Para el ensayo se obtuvieron 186 camarones de 4.5 ± 0.5 g obtenidos por donación de la misma empresa langostinera de la zona de Puerto Pizarro (Tumbes) que donó los ejemplares para la fase *in vitro*. Los camarones, aparentemente sanos, se recolectaron del mismo estanque del que procedieron los camarones usados en la fase *in vitro*, pero correspondieron a la siguiente campaña de cultivo en que no se presentó problemas de vibriosis. Estos fueron colocados en nueve acuarios con 40 L de agua del estero cada uno. Se seleccionaron 62 camarones por tratamiento, dos de ellos fueron sacrificados al iniciar el experimento para determinar la carga inicial de *Vibrio* spp en el hepatopáncreas.

Cuadro 1. Diámetro de halos de inhibición (media \pm desviación estándar) en cepas de *Vibrio* spp según tipo de extracto y dosis

Dosis	Tipo de extracto de menta		
	EBM	ABM	MA
10 μ l	15.1 \pm 1.5 ^{de}	10.7 \pm 1.5 ^f	10.5 \pm 1.9 ^f
15 μ l	18.6 \pm 1.9 ^{bc}	13.1 \pm 1.8 ^{ef}	12.3 \pm 2.6 ^{ef}
20 μ l	21.7 \pm 2.3 ^b	16.9 \pm 1.8 ^{cd}	15.1 \pm 3.1 ^{de}
Control	37.2 \pm 5.0 ^a	38.6 \pm 3.1 ^a	38.2 \pm 5.8 ^a

EBM: Menta en etanol al 96% en baño maría a 70 °C por 3 h; ABM: en forma similar al EBM pero aceite de oliva en lugar de etanol; MA: Menta en aceite de oliva macerada por 30 días; Control: oxitetraciclina Superíndices diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey

Los 60 camarones restantes de cada tratamiento fueron distribuidos en los acuarios experimentales a razón de 20 ejemplares por acuario.

Se realizó la infección experimental de los camarones con una mezcla de las 20 cepas de *Vibrio* spp que fue agregada a cada acuario hasta lograr una concentración de 10⁵ UFC/ml. Se trabajó con tres tratamientos y cada uno con tres repeticiones: 1) experimental, se aplicó 15‰ (v/w) del extracto EBM al alimento balanceado de los camarones; 2) control positivo, se aplicó 3‰ (w/w) de oxitetraciclina al alimento balanceado y, 3) control negativo, sin aplicar alguno de los productos al alimento balanceado.

El alimento balanceado fue suministrado dos veces al día (09:30 y 15:00 h), inicialmente en una cantidad equivalente al 10% de su biomasa, y posteriormente ajustado de acuerdo con el consumo. El ensayo de control de vibriosis duró 16 días. Cada cuatro días se evaluó la supervivencia, el crecimiento en peso y la carga de *Vibrio* spp en el hepatopáncreas de los camarones. Para esto último dos camarones por tratamiento fueron sacrificados. La selección de los camarones se hizo al azar por cada tratamiento; primero

se seleccionó por sorteo dos de los tres acuarios que conformaron el tratamiento, luego se eligió al azar un camarón de cada acuario seleccionado. Los camarones sacrificados semanalmente no fueron considerados para el cálculo de la supervivencia.

El ensayo se realizó con un diseño completamente al azar y los resultados fueron analizados utilizando el análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey, ambas con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad de las Cepas de *Vibrio* spp

Las 20 cepas de *Vibrio* spp aisladas fueron sensibles a los tres tipos de extracto de menta (Cuadro 1). Los diámetros promedio de los halos de inhibición se incrementaron progresivamente conforme se aumentó la dosis (desde 10 hasta 20 μ l) en los tres extractos de menta.

El tratamiento control (OTH, 30 μ g) presentó los mayores halos de inhibición en las cepas de *Vibrio* spp con diámetros de halos de inhibición entre 37.2 y 38.6 mm. Entre los

grupos tratados, los mejores resultados se obtuvieron con el extracto etanólico en baño maría (EBM) en dosis de 15 y 20 µl, sin diferencia significativa entre ellos. Por otro lado, su poder inhibitorio fue inferior al de la OTH, dado que el halo de inhibición del EBM fue el 58.2% de aquel con OTH; no obstante, estos resultados se pueden considerar aceptables, considerando que se trata de un extracto artesanal y que se probó en dosis menores que la del control (15 µl vs. 30 µg).

En investigaciones utilizando la menta (*M. spicata*) como antibacteriano se determinó que los extractos ensayados tuvieron potencial antimicrobiano (Shahbazi, 2015; Radaelli *et al.*, 2016), incluso cuando sus resultados fueron más modestos que los observados en este estudio. Así en el primer caso, la eficiencia de la concentración mínima bactericida (CMB) fue menor al 1% del correspondiente al antibiótico control (cloranfenicol), y en el caso del estudio de Shahbazi (2015), el diámetro de los halos de inhibición producido en dos cepas de *Escherichia coli* fue de 43.3% al correspondiente al antibiótico control (tetraciclina). Resultados similares a los del presente estudio han sido hallados con otros extractos; por ejemplo, con el extracto metanólico de dos macroalgas (*Padina tetrastratica* y *Sargassum ilicifolium*) en la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* obtenido de camarones *Penaeus monodon* utilizando como antibiótico control a la ciprofloxacina (AftabUddin *et al.*, 2021).

El hecho de que el extracto etanólico en baño maría (EBM) haya sido más efectivo en inhibir a *Vibrio* spp podría deberse a que el mentol, principal componente presente en el aceite esencial de la menta y potente bactericida (Yunilawati *et al.*, 2021), es más soluble en alcohol que en agua o aceites (NCBI, 2021).

Supervivencia de Camarones

La supervivencia de los camarones infectados con *Vibrio* spp que fueron tratados con los extractos de meta se redujo progresivamente a lo largo del tiempo del ensayo, siendo a partir del octavo día que los camarones que recibieron oxitetraciclina y el EBM presentaron mayores tasas de supervivencia que los camarones del grupo control negativo (Figura 1; $p < 0.05$). Al final del ensayo (día 16), la tasa de supervivencia de los grupos tratados con OTH y EBM fueron estadísticamente similares (entre 56.7 a 70.0%), pero mayores a la del tratamiento control negativo (46.7%).

En términos generales, el extracto etanólico de menta en baño maría (EBM) logró reducir la mortalidad de los camarones infectados experimentalmente con *Vibrio* spp, en comparación a aquellos en los que no se aplicó ninguna medicación. Casos similares han sido reportados en *L. vannamei* y contra *Vibrio* spp utilizando aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) (Dominguez-Borbor *et al.*, 2020); así como del extracto de cebolla tiwai (*Eleutherine americana*) (Azis y Cahyadi, 2020). Así mismo, el extracto de menta también pudo incrementar la supervivencia de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada experimentalmente con la bacteria *Yersinia ruckeri* (Adel *et al.*, 2016).

La razón del mejor resultado del extracto de menta en la prueba *in vivo* en comparación con la prueba de sensibilidad *in vitro* puede deberse a que este producto contiene no solo sustancias bactericidas, sino también inmunoestimulantes. Así, el resultado *in vivo* podría indicar que el extracto de menta mejoraría el rendimiento del sistema inmunitario del camarón (Adel *et al.*, 2015a), tal y como ha sido demostrado en peces como *Labeo*

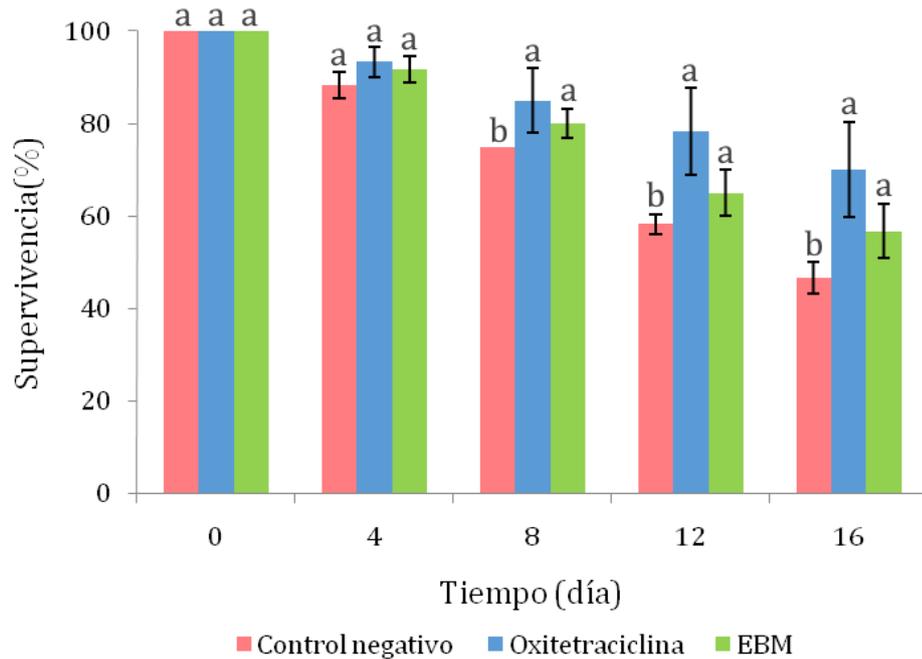


Figura 1. Supervivencia de camarones *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con cepas de *Vibrio* sp. EBM: extracto etanólico de menta en baño maría. Las letras que acompañan a cada barra indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

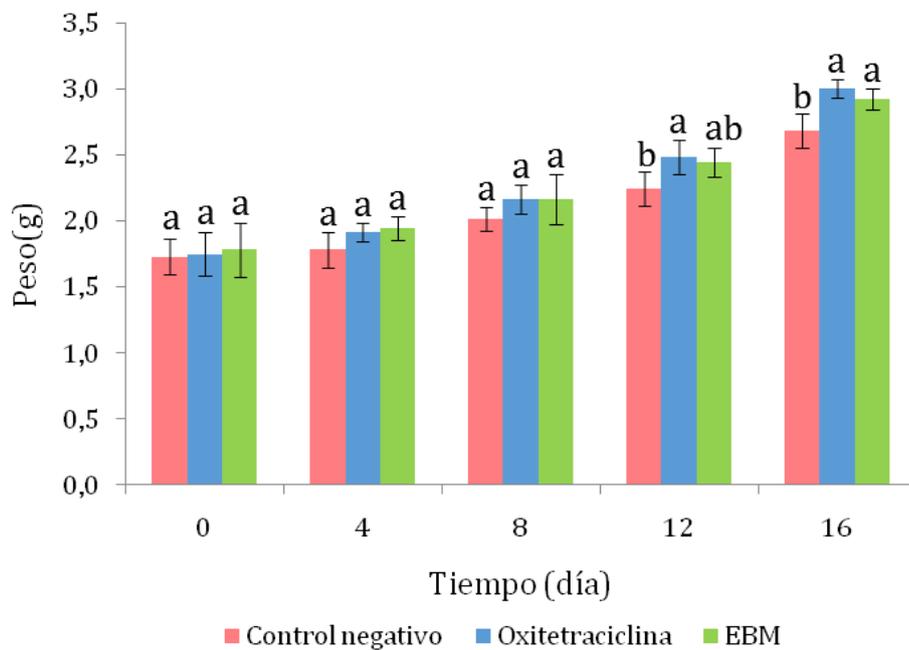


Figura 2. Crecimiento en peso de camarones *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con cepas de *Vibrio* sp. EBM: extracto etanólico de menta en baño maría. Las letras que acompañan a cada barra indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

rohita (Padala *et al.*, 2021) *Oncorhynchus mykiss* (Adel *et al.*, 2016), *Salmo trutta caspius* (Adel *et al.*, 2015b), *Rutilus frisii kutum* (Adel *et al.* 2015a), *Lates calcarifer* (Talpur, 2014), con lo cual sería más eficiente la eliminación del *Vibrio* spp que infecta al camarón.

Crecimiento de Camarones

El EBM produjo un efecto positivo en el crecimiento en peso de los camarones infectados con *Vibrio* spp, siendo estadísticamente superior al tratamiento control negativo ($p < 0.05$), y sin diferencia significativa con el control positivo (OTH) (Figura 2). En experimentos similares se observó un efecto benéfico del aceite esencial de menta adicionado al alimento balanceado, dado que algunos de sus compuestos estimulan la producción de enzimas digestivas que actúan como atrayente e incrementan el consumo de alimento en *L. vannamei* (Akbari *et al.*, 2017; Kawamura *et al.*, 2019), así como de otros crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii* (Kawamura *et al.*, 2019) y de peces (Talpur, 2014; Adel *et al.*, 2015a,b).

Por otro lado, el hecho que los camarones del grupo control positivo con OTH hayan obtenido un peso promedio similar al logrado con el extracto de menta, se justifica debido a que la OTH, como muchos antibióticos, tiene la propiedad de actuar como promotor de crecimiento (Arsène *et al.*, 2021; Hosain *et al.*, 2021), cuando se aplica en dosis que no rebasan la máxima recomendada, que en el caso del camarón es de 4.5 g/kg de alimento (Bermúdez-Almada y Espinosa-Plascencia, 2012; Avunje *et al.*, 2021), como ha sido el caso en el presente estudio.

Carga de *Vibrio* spp en Hepatopáncreas

La carga de *Vibrio* spp no fermentadores de sacarosa, que se desarrollan como colonias de color verde en el medio TCBS,

se incrementó luego de la infección experimental con *Vibrio* spp. La carga fue estadísticamente similar en los tres tratamientos hasta el cuarto día, pero del octavo día en adelante se observó una carga significativamente menor en el tratamiento con OTH, seguido del tratamiento con EBM (Figura 3).

De manera similar, la carga total de *Vibrio* spp (tanto fermentadores como no fermentadores de sacarosa), desde el octavo día en adelante fue significativamente menor en el tratamiento con OTH ($p < 0.05$), seguido del tratamiento con EBM, en comparación con el control negativo ($p < 0.05$) (Figura 4). El hecho de que el recuento de la carga total de *Vibrio* spp haya sido menor en el grupo tratado con OTH en comparación con el grupo tratado con EBM es coherente con lo observado en este mismo estudio *in vitro*, en el que se observó que el EBM tuvo un poder inhibidor equivalente al 58.2% de la oxitetraciclina.

El recuento de *Vibrio* spp en hepatopáncreas indicó un crecimiento elevado de dichas bacterias según el criterio establecido otros estudios (Gómez-Gil, 2005; Rosado, 2018). Así mismo, el recuento de *Vibrio* spp no fermentadores de sacarosa que superó la carga de 10^6 UFC/g (en el caso del tratamiento control), indicó una vibriosis (Gómez-Gil *et al.*, 2015).

Si bien el recuento de *Vibrio* spp en el tratamiento con EBM no fue tan bajo como el logrado con la OTH, pero que la supervivencia y el peso de los camarones con dicho tratamiento fuera similar a los obtenidos con OTH, indica que más allá del efecto bactericida e inmunoestimulante del EBM, es posible que su efecto como atrayente y estimulante del apetito (Akbari *et al.*, 2017; Kawamura *et al.*, 2019) esté relacionado con un mayor apetito del camarón infectado, lo cual le podría conferir mayor resistencia a morir y mejorar su peso.

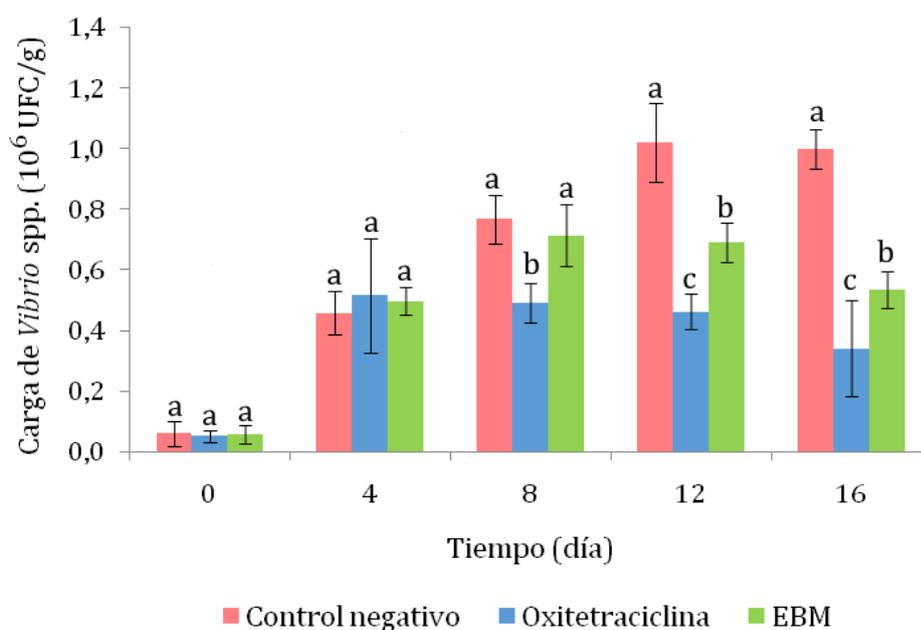


Figura 3. Carga de *Vibrio* spp no fermentadores de sacarosa (colonias verdes) en hepatopáncreas de camarones *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con cepas de *Vibrio* sp. EBM: extracto etanólico de menta en baño maría. Las letras que acompañan a cada barra indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

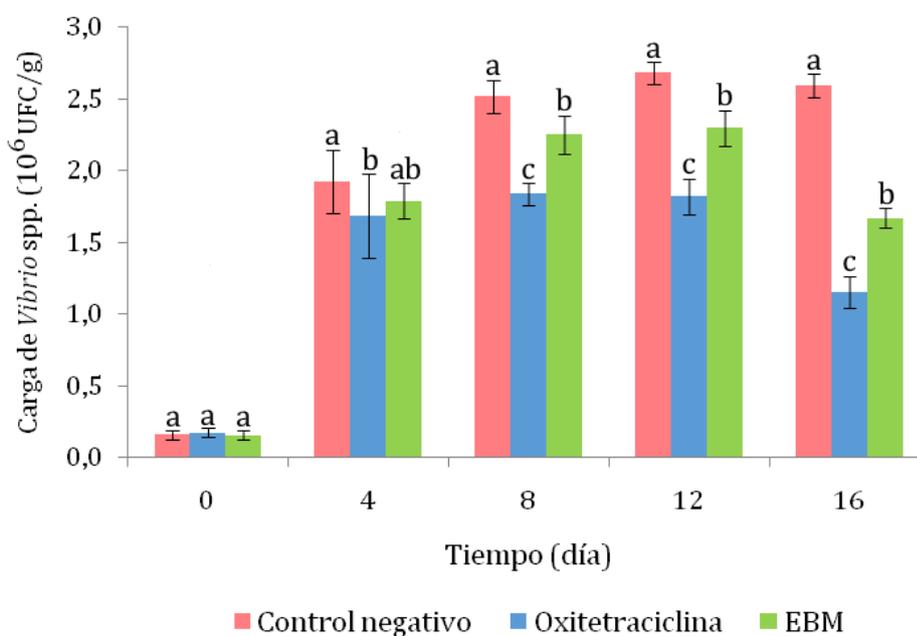


Figura 4. Carga total de *Vibrio* spp (fermentadores y no fermentadores de sacarosa) en hepatopáncreas de camarones *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con cepas de *Vibrio* sp. EBM: extracto etanólico de menta en baño maría. Las letras que acompañan a cada barra indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de menta en baño maría (EBM) demostró ser una alternativa viable para incrementar la supervivencia de camarones infectados con *Vibrio* spp.
- Los tres extractos de menta preparados (etanólico en baño maría [EBM], en aceite de oliva en baño maría [ABM] y macerado en aceite de oliva [MA]) pudieron inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp en ensayo *in vitro*, especialmente con EBM (15 y 20 µl/disco), aunque su poder inhibitor *in vitro* fue solo equivalente al 58.2% del obtenido con oxitetraciclina.
- El EBM al 15‰ (w/v) mejoró la supervivencia y el peso de los camarones infectados experimentalmente con *Vibrio* spp ($p < 0.05$), con resultados estadísticamente similares a los logrados con el tratamiento con oxitetraciclina.
- El EBM redujo la carga de *Vibrio* spp en el hepatopáncreas de los camarones infectados experimentalmente ($p < 0.05$), aunque en menor proporción al obtenido con oxitetraciclina.
- Los resultados indican un excelente potencial terapéutico del EBM, el cual podría ser incluso mejorado, si se realizan ensayos con extractos más puros como con aceite esencial o extractos concentrados usando soxhlet o rotaevaporador.

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de Tumbes, por ayudar a financiar parte de esta investigación con los proyectos: 1) Proyecto de Investigación Avanzada: Desarrollo de alternativas terapéuticas para tratamiento de *Vibrio* spp resistente a antibióticos en *Litopenaeus vannamei*, autorizado mediante Resolución 0904-2018/UNTUMBES-CU y 2) Proyecto de Investigación con fondos de Canon y Sobrecanon Petrolero: Efecto de la aplicación de compuestos bioactivos de dos plan-

tas locales: *Azadirachta indica* (neem) y *Nerium oleander* (laurel rosa) en el control de patógenos en *Litopenaeus vannamei* (camarón) y *Sus scrofa domesticus* (cerdo) y en el control de plagas en los cultivos de *Musa* sp (plátano) y *Vitis vitifolia* (uva), autorizado mediante Resolución 0180-2016/UNTUMBES-R-I.

LITERATURA CITADA

1. **Adel M, Abedian A, Zorriehzahra J, Nematolahi A, Esteban MÁ. 2015a.** Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish Shellfish Immun* 45: 841-847. doi: 10.1016/j.fsi.2015.06.010
2. **Adel M, Safari R, Pourgholam R, Zorriehzahra J, Esteban MÁ. 2015b.** 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 Immun* 47: 623-629. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.005
3. **Adel M, Pourgholam R, Zorriehzahra J, Ghiasi M. 2016.** Hematoimmunological 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 Immun* 55: 267-273. doi: 10.1016/j.fsi.2016.05.040
4. **Adel M, Dadar M, Zorriehzahra MJ, Elahi R, Stadlander T. 2020.** Antifungal activity and chemical composition of Iranian medicinal herbs against fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Iran J Fish Sci* 19: 3239-3254. doi: 10.22092/ijfs.2020.122970

5. **AftabUddin S, Siddique MAM, Habib A, Akter S, Hossen S, Tanchangya P, Abdullah M. 2021.** Effects of seaweeds extract on growth, survival, antibacterial activities, and immune responses of *Penaeus monodon* against *Vibrio parahaemolyticus*. *Ital J Anim Sci* 20: 243-255. doi: 10.1080/1828051X.2021.-1878943
6. **Aguirre LE, Sánchez-Suárez HA, Ordinola-Zapata A. 2021.** Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Rev Inv Vet Perú* 32: e19386. doi: 10.15381/rivep.v32i4.19386
7. **Akbary P, Shoghi M, Fereidouni MS. 2017.** Growth performance and digestive enzymes activities of Pacific white leg shrimp (*Litopenaus vannamei*) juveniles fed dietary mixtures of four medicinal plants. *Iran J Fish Sci* 16: 1157-1163.
8. **Amatul-Samahah MA, Wan, WHH, Mohd NF, Amal MN, Zamri-Saad M, Ina-Salwany MY. 2020.** Vaccination trials against vibriosis in shrimp: a review. *Aquac Rep* 18: 100471. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100471
9. **Arsène MMJ, Davares AKL, Andreevna SL, Vladimirovich EA, Carime BZ, Marouf R, Khelifi I. 2021.** The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Vet World* 14: 319-328. doi: 10.14202/vetworld.2021.-319-328
10. **Arunkumar M, LewisOscar F, Thajuddin N, Pugazhendhi A, Nithya C. 2020.** *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* spp: a significant threat in aquaculture. *Process Biochem* 94: 213-223. doi: 10.1016/j.procbio.2020.-04.029
11. **Avunje S, Patil PK, Ezaz W, Praveena E, Ray A, Viswanathan B, Alavandi SV, et al. 2021.** Effect of oxytetracycline on the biosafety, gut microbial diversity, immune gene expression and withdrawal period in Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 543: 736957. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2021.736957
12. **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: 105-112. doi: 10.20473/jipk.v12i1.12826
13. **Bermúdez-Almada MC, Espinosa-Plascencia A. 2012.** The use of antibiotics in shrimp farming. In: Carvalho E (ed). *Health and environment in aquaculture*. London: InTech. p 199-214.
14. **Bermúdez-Almada MC, Espinosa-Plascencia A, Santiago-Hernández ML, Barajas-Borgo CJ, 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: 29-37. doi: 10.18633/bt.v16i3.138
15. **Borges N, Keller-Costa T, Sanches-Fernandes GMM, Louvado A, Gomes NCM, Costa R. 2021.** Bacteriome structure, function, and probiotics in fish larviculture: the good, the bad, and the gaps. *Annu Rev Anim Biosci* 9: 423-452. doi: 10.1146/annurev-animal-062920-113114
16. **Chagas EC, Majolo C, Monteiro PC, Oliveira MR, Gama PE, Bizzo HR, Chaves FCM. 2020.** Composition of essential oils of *Mentha* species and their antimicrobial activity against *Aeromonas* spp. *J Essent Oil Res* 32: 209-215. doi: 10.1080/10412905.2020.1741457
17. **Costa CMS, da Cruz MG, Lima TBC, Ferreira LC, Ventura AS, Brandão FR, Chagas EC, et al. 2020.** Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. *Aquac Rep* 18: 100414. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100414

18. **Culot A, Grosset N, Bruey Q, Auzou M, Giard J-C, Favard B, Wakatsuki A, et al. 2021.** Isolation of Harveyi clade *Vibrio* spp. collected in aquaculture farms: how can the identification issue be addressed? *J Microbiol Meth* 180: 106106. doi: 10.1016/j.mimet.2020.-106106
19. **Dawood MAO, El Basuini MF, Zaineldin AI, Yilmaz S, Hasan MT, Ahmadifar E, El Asely AM, et al. 2021.** Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: an alternative approach for sustainable aquaculture. *Pathogens* 10: 185. doi: 10.3390/pathogens10020185
20. **de Oliveira GS, Neto FM, Ruiz ML, Acchile M, Chagas EC, Chaves FCM, Martins ML. 2016.** Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450: 182-186. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.07.029
21. **de Souza C, Wan AHL. 2021.** *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *J Invertebr Pathol* 181: 107527. doi: 10.1016/j.jip.2020.107527
22. **Diniz, L, Moraes AAB, Costa KS, Pereira JM, Taube PS, Costa CML, Neves J, et al. 2020.** Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: new findings and potential applications. *Biomolecules* 10: 988. doi: 10.3390/biom10070988
23. **Domínguez-Borbor C, Sánchez-Rodríguez A, Sonnenholzner S, Rodríguez J. 2020.** Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 529: 735639. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2020.-735639
24. **Eftekhari A, Khusro A, Ahmadian E, Dizaj SM, Hasanzadeh A, Cucchiari M. 2021.** Phytochemical and nutraceutical attributes of *Mentha* spp: a comprehensive review. *Arab J Chem* 14: 103106. doi: 10.1016/j.arabjc.2021.-103106
25. **Gholamipourfard K, Salehi M, Banchio E. 2021.** *Mentha piperita* phytochemicals in agriculture, food industry and medicine: features and applications. *S Afr J Bot* 141: 183-195. doi: 10.1016/j.sajb.2021.05.014
26. **Gómez-Gil B. 2005.** Bacteriología de camarones. México: Industria acuícola. [Internet]. Disponible en: <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Bacteriologia%20de%20camarones.pdf>
27. **Gómez-Gil B, Roque A, Soto-Rodríguez S. 2015.** Vibriosis en camarones y su diagnóstico. En: *Avances en acuicultura y manejo ambiental*. Cap. 8. Ed Trillas. p 137-150.
28. **Hosain, MZ, Kabir SML, Kamal MM. 2021.** Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Vet World* 14: 210-221. doi: 10.14202/vetworld.2021.210-221
29. **Jeyasanta KI, Lilly T, Patterson J. 2017.** Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistant. *Asian J Appl Sci Technol* 1: 100-111.
30. **Ji Q, Wang S, Ma J, Liu Q. 2020.** A review: progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines. *Immunol Lett* 226: 46-54. doi: 10.1016/j.imlet.2020.-07.002
31. **Kawamura G, Yong AS-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 J Marine Sci Aquac* 3: 57-67. doi:10.51200/bjomsa.v3i2.1793
32. **Metin, S, Didinen B, Kubilay A, Pala M, Aker Y. 2015.** Determination of anesthetic effects of some medicinal plants on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *J Limnol Freshwater Fish Res* 1: 37-37. doi: 10.17216/LimnoFish-5000099756
33. **[NCBI] National Center for Biotechnology Information. 2021.** PubChem Compound Summary for CID 1254,

- Menthol. NCBI. [Internet]. Available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol>
34. **Padala D, Marakini GN, Kokkam A, Prabhakaran PL, Muhammad M, Kavalagiriyannahalli R. 2021.** Effect of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth, survival, disease resistance and haematology on fingerlings of rohu (*Labeo rohita*). *Aquac Res* 52: 2697-2705. doi: 10.1111/are.15120
 35. **Radaelli M, da Silva BP, Weidlich L, Hoehne L, Flach A, da Costa LAMA, Ethur EM. 2016.** Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Braz J Microbiol* 47: 424-430. doi: 10.1016/j.bjbm.2015.10.001
 36. **Rakesh K, Ganapathi M, Nevil P, Padala D, Manjulesh P, Anjusha KV. 2018.** A review on drugs used in shrimp aquaculture. *Int J Pure Appl Biosci* 6: 77-86. doi: 10.18782/2320-7051.6296
 37. **Restrepo L, Domínguez-Borbor C, Bajaña L, Betancourt I, Rodríguez J, Bayot B, Reyes A. 2021.** Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolis*). *Microbiome* 9: 88. doi: 10.1186/s40168-021-01043-8
 38. **Rosado AA. 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. Lima, Perú: Univ. Ricardo Palma. 91 p.
 39. **[RSPCA] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. 2016.** Humane killing and processing of crustaceans for human consumption. Canberra: RSPCA Australia. RSPCA Information Papers. 9 p.
 40. **Sabir M, Ennaji MM, Cohen N. 2013.** *Vibrio alginolyticus*: an emerging pathogen of foodborne diseases. *Int J Sci Technol* 2: 302-309.
 41. **Santiago ML, Espinosa A, Bermúdez MC. 2009.** Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Rev Mex Cienc Farm* 40: 22-32.
 42. **Santos HM, Tsai C-Y, Maquiling KRA, Tayo LL, Mariatulqabtiyah AR, Lee C-W, Chuang KP. 2020.** Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. *Aquacult Int* 28: 169-185. doi: 10.1007/s10499-019-00451-w
 43. **Shahbazi Y. 2015.** Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *J Pathog* 2015: 916305. doi: 10.1155/2015/916305
 44. **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: 14402-14424. doi: 10.3390/molecules-200814402
 45. **Talpur AD. 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. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.039
 46. **Vaiyapuri M, Pailla S, Rao M, Pillai D, Chandragiri R, Prasad M. 2021.** Antimicrobial resistance in *Vibriosis* of shrimp aquaculture: incidence, identification schemes, drivers and mitigation measures. *Aquac Res* 52: 2923-2941. doi: 10.1111/are.15142
 47. **Varela A, Choc-Martínez LF. 2020.** Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. *Rev Inv Vet Perú* 31: e18165. doi: 10.15381/rivep.v31i3.18165
 48. **Varela-Mejías A, Alfaro-Mora R. 2018.** Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Rev Inv Vet Perú* 29: 1-14. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14186

49. **Yunilawati R, Handayani W, Cahyaningtyas AA, Imawan C. 2021.** Peppermint oil loaded on recycled paper as an antibacterial label for shrimp freshness. *IOP Conference Series: Earth and Environm Sci* 739: 012065. doi: 10.1088/1755-1315/739/1/012065
50. **Zuo H, Weng K, Zhu Z, Guo Z, Weng S, He J, Xu X. 2021.** Suppression of a JAK-STAT pathway target gene *Ftz-F1H* enhances the resistance of shrimp to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 543: 737022. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737022