

## **Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura**

Lita Sorroza Ochoa, María Isabel Campoverde y Roberto A. Santacruz-Reyes

Escuela de Ingeniería Acuícola, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

email: [slita@utmachala.edu.ec](mailto:slita@utmachala.edu.ec)

### **Resumen**

Los vibrios son un grupo de microorganismos considerados bacterias patógenas, que pueden también actuar como oportunistas, que ocasionan grandes pérdidas económicas al sector acuícola. Para controlar esta enfermedad, muchos productores utilizan antibióticos, generalmente de manera inadecuada, lo que lleva a la aparición de resistencia bacteriana en el medio. Con este precedente, los extractos de plantas medicinales se presentan como una opción muy prometedora, ya que ayudan a impedir el crecimiento bacteriano y a mejorar la salud del animal. El presente trabajo es un estudio preliminar que evaluó el efecto del extracto de dos plantas medicinales ampliamente utilizadas en nuestro medio: Hierba luisa (*Aloysia triphilla*) y Orégano (*Origanum vulgare*) sobre la presencia de *Vibrio* sp. en agua de estanque de cultivo de camarones peneidos. Se preparó un extracto de cada una de las plantas, por otro lado, se adecuó 21 peceras con una capacidad de 2 L, en las cuales se adicionó 1 L de agua del estanque. En cada una de ellas se añadió diferentes dosis del extracto (6, 8, 10 mL/L) por triplicado, y se dejó reaccionar a diferentes tiempos (12, 24, 48 h) y se sembraron muestras del agua de las peceras en agar TCBS para el recuento del número de vibrios. El análisis estadístico indicó que existe efecto de interacción significativo ( $p < 0,05$ ) entre las diferentes dosis de extractos de plantas y el tiempo de exposición.

Finalmente, en base a estos resultados preliminares se puede sugerir el uso del extracto de plantas medicinales para el tratamiento de la vibriosis, previo un estudio de interacción de estos con organismos acuáticos de interés comercial

### **Summary**

#### **Preliminary study of two medicinal plant extracts with antibacterial effect for use in aquaculture**

Vibrios are a group of microorganisms considered to be pathogenic bacteria, which may also act as opportunists, causing great economic losses to the aquaculture sector. To control this disease, many producers use antibiotics, usually inadequately, leading to the appearance of bacterial resistance in the medium. With this precedent, the extracts of medicinal plants are seen as a very promising option, since they help to prevent bacterial growth and improving the health of the animal at the same time. This work is a preliminary study that evaluated the effect of the extract of two medicinal plants widely used in our medium: lemon verbena (*Aloysia triphilla*) and oregano (*Origanum vulgare*) on the presence of Vibrios in shrimp culture pond water. An extract of each of the plants was prepared, on the other hand, 21 aquariums with a capacity of 2 L were adapted, in which 1 L of water of the pond was added. In each of them different doses of the extracts (6, 8, 10 mL/L) were added in triplicate, and allowed to react at different times (12, 24, 48 h). Then, samples of seawater from each aquarium were spread on TCBS agar. Statistical analysis indicated that there is significant interaction effect ( $p < 0.05$ ) between the different doses of plant extracts and the time of exposure.

Finally, it is possible to suggest the use of the extract of medicinal plants for the treatment of vibriosis, provided a study of their interaction with bio-aquatic organisms of commercial interest is carried out.

### **Introducción**

El cultivo de camarones peneidos es una de las actividades de mayor crecimiento a nivel mundial, y por ende una de las más importantes del sector productivo de Ecuador en términos de ingresos de divisas por exportaciones. La producción de langostino blanco

(*Litopenaeus vannamei*) en América se encuentra en el 80,7% de la producción acuícola mundial, trascendiendo así en el mercado internacional (Gonzales, 2014).

Con el incremento del mercado, los productores han aumentado la densidad de siembra en sus cultivos y ello ocasiona una reducción de la calidad de agua, y un desequilibrio en el ecosistema donde viven estos animales, provocando de esta manera gran estrés en los peneidos e incrementando la presencia de enfermedades infecciosas o de patógenos oportunistas (Leano y cols., 1998). Esto ha generado grandes pérdidas económicas en este sector, siendo las bacterias del género *Vibrio*, los patógenos más importantes que afectan a su cultivo (Santiago y cols., 2009), los cuales además se han descrito como parte de la microbiota intestinal normal en ejemplares silvestres y cultivados (Yasuda y Kitao, 1980; Gomez-Gil y cols., 1998; Leano y cols., 1998).

Para controlar la presencia de este grupo de patógenos es necesario el uso de antibióticos, muchos de los cuales tienen grandes restricciones en la producción acuícola debido a que su uso prolongado puede ocasionar resistencia bacteriana, daños ecológicos, restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos y un posible impacto en la salud humana (Karunasagar y cols., 1994; Soto-Rodríguez y cols., 2008).

Por ello, muchas investigaciones se centran en la búsqueda de nuevas alternativas para poder controlar el tema de las enfermedades infecciosas (García y López, 2002; Gomez-Gil y cols., 2002), y una de ellas sería el uso de plantas medicinales ya que se existen numerosas referencias de trabajos realizados en medicina humana y veterinaria sobre las bondades terapéuticas que pueden tener algunas plantas frente a diferentes patógenos. Hoy en día se puede encontrar una amplia gama de productos de origen vegetal con efecto ya sea bactericida o bacteriostático que sirven para controlar el crecimiento de diversos microorganismos patógenos, debido a que presentan compuestos o metabolitos que inhiben su crecimiento (Vatlák y cols., 2014; Syahidah y cols., 2015). Asimismo, existe información en el campo acuícola sobre la utilización de plantas medicinales, hierbas, algas marinas, y otros compuestos naturales ya que ayudan a controlar el problema de enfermedades y a mejorar el estado inmunitario de los peces y crustáceos (Prieto y cols., 2005; Syahidah y cols., 2015). Considerando lo precedente, se considera de importancia realizar esta investigación y poder brindar al sector productivo una herramienta útil, amigable con el ambiente y que ayude a controlar la presencia de patógenos. Por todo esto, el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto y la interacción de diferentes dosis de extractos de Hierba Luisa (*Aloysia triphilla*) y Orégano (*Origanum vulgare*) sobre la población de vibrios en agua de estanque de cultivo de peneidos, sometidos a diferentes tiempos de exposición.

## **Materiales y métodos**

Este ensayo se realizó en agosto del 2015, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Machala (Ecuador). Para preparar los extractos de plantas se colocaron 120 gramos de cada una de las plantas medicinales en 120 mL de agua hervida a ebullición a 100 °C para obtener una relación de 1:1, se tapó el recipiente durante 1 hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se colocó la dosis establecida en cada una de las peceras. En total se utilizaron 21 peceras de una capacidad de 2 L, en las cuales se colocó 1 L de agua de un estanque de cultivo de peneidos, con una salinidad de 26 partes por mil (ppt), oxígeno disuelto 5,8 partes por millón (ppm), temperatura 28 °C y pH 7,8. En cada una de las peceras se adicionó diferentes dosis del extracto (6, 8, 10 mL/L), y un control (sin extracto), todos ellos con tres repeticiones. Asimismo, se tomaron muestras del agua para los análisis a diferentes horas (12, 24, 48 h). Transcurrido cada uno de los tiempos de acción de los extractos se hicieron diluciones

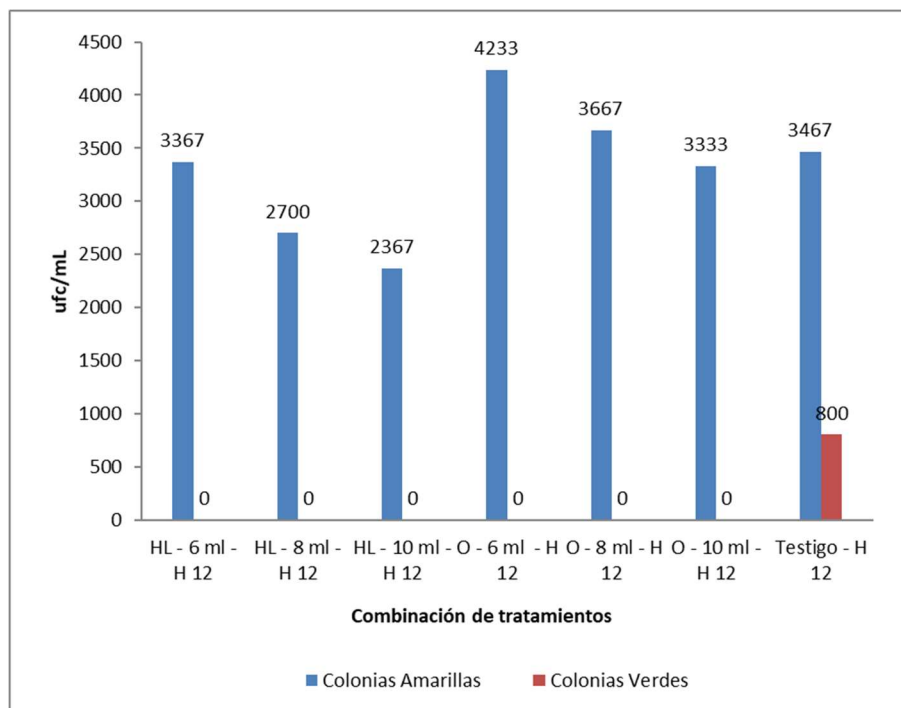
seriadas 1/10, y de cada una de ellas se sembraron 100 µL en un medio específico para vibrios, como es el Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), las placas se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente ( $28 \pm 1$  °C) para realizar el recuento final de las colonias observadas, expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) con la debida corrección debido a la dilución realizada.

En la parte estadística, para determinar el efecto de interacción entre los diferentes extractos de plantas y el tiempo de exposición de la misma, se efectuó Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías previo cumplimiento de los supuestos de independencia, normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas; la significancia estadística fue del 0,05 para lo cual se utilizó el Paquete Estadístico SPSS Versión 22.0 para Windows.

## Resultados

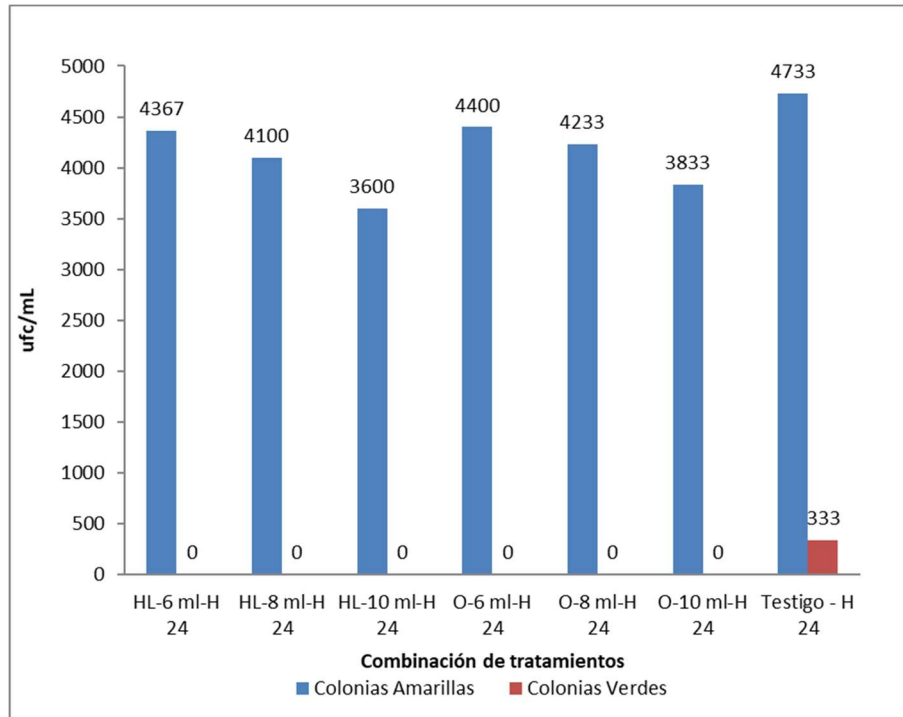
El recuento de colonias se hizo separando dos grupos de bacterias, según su coloración en el medio TCBS (amarillas y verdes) sin presencia de luminiscencia. Los resultados presentados son el promedio de todas las réplicas. En las Figs. 1, 2 y 3 se muestran los efectos de los extractos sobre la cantidad de colonias de vibrios a las 12, 24 y 48 h, respectivamente. Se puede observar que en los dos tratamientos con distintas dosis y tiempos de exposición no existe la presencia de colonias verdes (sacarosa negativas). Por otro lado, en el control se observa crecimiento de colonias verdes a las 12 h, y adicionalmente se observa como a medida que transcurre el tiempo el número de colonias va disminuyendo gradualmente, reduciéndose en un 58,4% a las 24 h y en un 79% a las 48 h; sin embargo, nunca se igualó a la no presencia de estas colonias en los tratamientos con los dos extractos.

En cuanto al análisis estadístico los datos indican que existe un efecto de interacción significativo entre los diferentes factores, dosis de extractos de plantas medicinales y el tiempo de exposición respecto al control ( $p < 0,05$ )

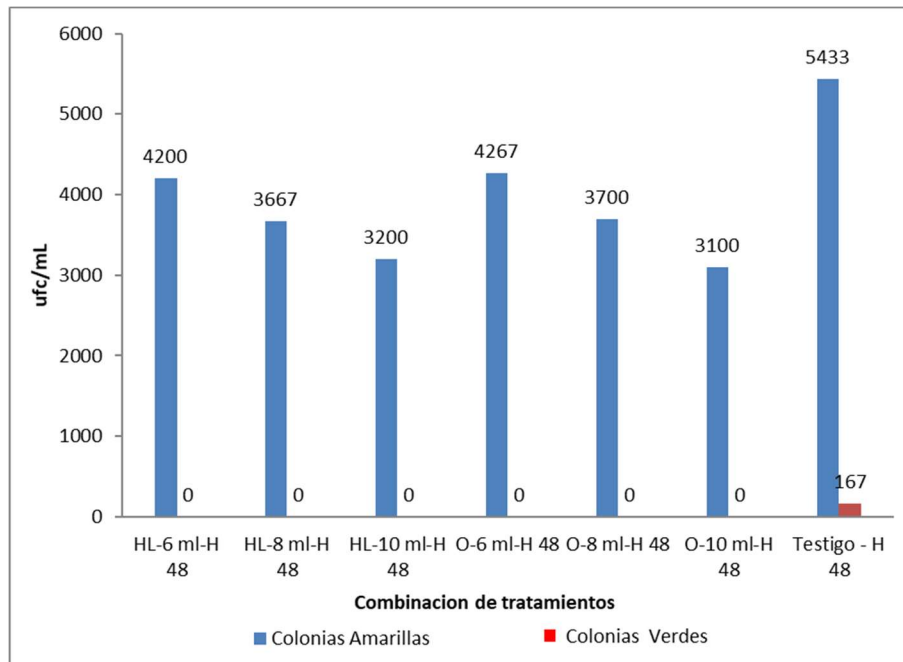


**Figura 1.** Promedios de número de colonias verdes y amarillas (ufc/mL) de *Vibrio* sp. a las 12 horas de aplicación de los extractos de Hierba luisa - HL (*Aloysia triphilla*) y Orégano - O (*Origanum vulgare*) a diferentes concentraciones (6, 8 y 10 mL/L).

Por otro lado, las colonias amarillas disminuyeron en su número, en proporción directa con la dosis del extracto aplicada respecto al control. Situación que se observó tanto a las 12 h, 24 h y 48 h, tal como igualmente se muestra en las Figs. 1, 2 y 3, respectivamente.



**Figura 2.** Promedios de número de colonias verdes y amarillas (ufc/mL) de *Vibrio* sp. a las 24 horas de aplicación de los extractos de Hierba luisa - HL (*Aloysia triphilla*) y Orégano - O (*Origanum vulgare*) a diferentes concentraciones (6, 8 y 10 mL/L).



**Figura 3.** Promedios de número de colonias verdes y amarillas (ufc/mL) de *Vibrio* sp. a las 48 horas de aplicación de los extractos de Hierba luisa - HL (*Aloysia triphilla*) y Orégano - O (*Origanum vulgare*) a diferentes concentraciones (6, 8 y 10 mL/L).

## Discusión

---

En acuicultura las plantas medicinales están siendo utilizadas ya que presentan diferentes características, por ejemplo, con capacidad inmunoestimulante, antimicrobiana, anti-estrés, estimulante del apetito entre otros y por lo tanto pueden ser efectivos frente a diversas enfermedades (Hai, 2015).

En este trabajo se utilizó el medio selectivo diferencial para vibrios TCBS, aunque también pueden crecer en él otros grupos bacterianos que se diferencian por su coloración. En este estudio sólo se pudo observar 2 tipos de colonias, las amarillas que fermentan sacarosa y las verdes que no utilizan este disacárido y permanecen de color verde, lo que en principio indicaría que son las colonias no beneficiosas, puesto que dentro de esta coloración se encuentran algunas especies de vibrios como el *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, que han sido descritos como patógenos para los peneidos (Leano y cols., 1998; Soto-Rodríguez y cols., 2008).

Los resultados aquí expuestos no muestran presencia de colonias verdes en el agua de la granja camaronera, en ninguno de los tratamientos donde se utilizaron los extractos de Orégano y Hierba luisa a ninguno de los tiempos de exposición. Esto podría explicarse gracias a los compuestos o metabolitos que presentan estas dos plantas, así tenemos que el aceite esencial de orégano presenta 60 componentes, los cuales han sido clasificados en grupos: "monoterpenos, sesquiterpenos y fenólicos" (Betancourt, 2012).

Asimismo, se han realizado varios estudios donde se atribuye al orégano propiedades antibacterianas frente a diferentes microorganismos (Baydar y cols., 2004; Betancourt, 2012), y esto se debe a que existen componentes de mayor abundancia como son el timol y carvacrol, donde aparentemente el timol es mucho más efectivo contra microorganismos bacterianos Gram negativo, mientras que el carvacrol presenta mayor efectividad frente a bacterias Gram positivo (Barday y cols., 2004), lo cual podría explicar los resultados del presente estudio.

Adicionalmente, otras plantas como la albahaca morada (*Ocimum sanctus*), grosella (*Phyllanthus acidus*), palo maría (*Callophyllum inphyllum*), han sido utilizadas en camaronicultura ya que poseen actividad antiviral contra el virus de la cabeza amarilla en el camarón *Penaeus monodon* (Direksaburakom y cols., 1996).

Igualmente, extractos de plantas como: *Melissa officinalis* L. (Bálsamo), *Ocimum basilicum* L. (Albahaca), *Hyssopus officinalis* L. (Hisopo), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavanda), *Origanum vulgare* L. (Orégano), *Salvia officinalis* L. (Sage) y *Thymus vulgaris* L. (Tomillo), se han usado como alternativa al uso de antibióticos en la acuicultura, ya que poseen efectos antibacterianos (Özcan y Erkmen, 2001), con lo cual se ha demostrado el potencial uso de las plantas medicinales en acuicultura.

De manera similar, otros ensayos han utilizado el extracto de hoja de *Chromolaena odorata* para ver su efecto contra el *Vibrio harveyi* en camarones y se demostró que tiene efecto antibacteriano ya que contiene fenoles, flavonoides, alcaloides y esteroides (Harlina y cols., 2015).

En este contexto, los extractos de vegetales no solo se han utilizado en el cultivo de crustáceos sino también en el cultivo de peces, así tenemos que existe una importante evidencia científica del uso de plantas como la guayaba (*Psidium guajava*) para tratar la necrosis hematopoyética infecciosa en salmones (Prieto y cols., 2005). Núñez (2011), utilizando aceite esencial de orégano como suplemento en las dietas de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), demostró que en el tracto digestivo de esta especie algunos géneros bacterianos fueron mayormente afectados por las relaciones de carvacrol:timol, entre ellos *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Edwardsiella* sp., *Pseudomonas* sp.,

*Aeromonas* sp. y *Klebsiella* sp., sugiriendo el potencial antibacteriano de éste tratamiento y pudiendo ser una alternativa al uso de antibióticos para tratar enfermedades en peces.

Hoy en día, se están identificando nuevos aditivos nutracéuticos, como los aceites esenciales de origen vegetal para control de enfermedades, ya que se ha reconocido la actividad antimicrobiana de estas sustancias ante la presencia de *Vibrios*, así mismo se cuenta con información relacionada con el amplio rango de actividad de los aceites esenciales in vitro, entre otras y su importancia en la acuicultura como alternativa al uso de antibióticos (Dorman y Deans, 2000).

Además, también se incluyen dentro de los extractos de vegetales a las macroalgas, y algunos estudios han demostrado que los extractos de dos especies como *Chaetomorpha antennina* y *Azadirachta indica* presentan efecto antibacteriano frente a patógenos que afectan tanto a cultivo de peces como crustáceos en la India (Thanigaivel y cols., 2014 y 2015)

Para concluir, se puede decir que, en base a este estudio preliminar, tanto el extracto de hierbaluisa como el extracto de orégano muestran positivos efectos antimicrobianos, específicamente para controlar el crecimiento de las colonias verdes de *Vibrio* spp., por lo cual se recomienda estudios más detallados para medir su efectividad y al mismo tiempo su inocuidad para las especies de interés acuícola.

## Bibliografía

1. Baydar, H., Sagdiç, O., Özkan, G., Karadogan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 15(3): 169-172.
2. Betancourt, L. (2012). *Evaluación del aceite esencial de orégano en la dieta de los pollos de engorde* (Tesis para optar el título de Doctor en Ciencias de Producción Animal). Universidad Nacional de Colombia. 88-90. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6506/1/787020.2012.pdf>.
3. Direksaburakom, S., Hirunsaree, U., Boonyaratpalin, S., Doyanodd, Y., Aekpanithanpong, V. (1996). The virucidal activity of *Clinacanthus nutens* (Lindau) against yellow head baculovirus of black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *NICA Technical Abstracts*. 8: 56-61.
4. Dorman, H., Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88(2): 308-316.
5. García, E., López, R. (2002). Los bacteriofagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*. 15(4): 306-312.
6. Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., Guerra-Flores, A.L. (1998). Species of vibrio isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163: 1-9.
7. Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. (2002). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
8. González, Y. (2014). *Efecto de la adición de ácidos orgánicos y probióticos sobre el crecimiento del camarón*. Tesina de pregrado. Universidad Técnica de Machala (Ecuador). Recuperado de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1979>.
9. Hai, N.V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. A review. *Journal of Applied Microbiology*. 119: 917-935.
10. Harlina, H., Prajitno, A., Suprayitno, E., Nursyam, H., Rosmiati (2015). Potential Study of *Kopasanda* (*Chromolaena odorata* L.) Leaves as Antibacterial Againsts *Vibrio harveyi*, Disease Causative Agent of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Post Larvae. *Journal Aquac. Res. Development* 6: 372. doi:10.4172/2155-9546.1000372.
11. Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 128: 203-209.
12. Leano, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R., Paner, M.G. (1998). Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture*. 164: 367-374.

13. Núñez, M. (2011). *Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (Oreochromis niloticus) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta*. Tesis de Magister en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/4361/1/186310.2011.pdf>.
14. Özcan, M., Erkmen, O. (2001). Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*. 212(6): 658-660.
15. Prieto, A., Auró, A., Fernández, A., Pérez, M. (2005). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 8(1): 38-49.
16. Santiago, H., Espinosa, P., Bermúdez, A. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 40(3): 22-32.
17. Soto-Rodríguez, S., Gómez-Gil, B., Lozano, R. (2008). MICs de antibióticos de *Vibrio* spp. aislados de *L. vannamei* cultivado en México. *Panorama Acuícola*. 14(1): 52-57.
18. Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M., Abdelhadi, Y.M. (2015). Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 14(1): 27-44.
19. Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., Thomas, J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of *Chaetomorpha antennina* against shrimp pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 433: 467-475.
20. Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Gopinath, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., Thomas, J. (2015). *In vivo* and *in vitro* antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*. 437: 252-255.
21. Vatňák, A., Kolesárová, A., Vukovič, N., Rovná, K., Petrová, J., Vimmerová, V., Hleba, L., Mellen, M., Kačániová, M. (2014). Antimicrobial activity of medicinal plants against different strains of bacteria. *Journal of Microbiology*. 3: 174-176.
22. Yasuda, K., Kitao, T. (1980). Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*. 19: 229-234.