

12

SINERGIA DE COMBINACIONES

**DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE
VIBRIOSIS EN SISTEMA PRODUCTIVO DE CAMARÓN
(*LITOPENAEUS VANNAMEI*)**

SINERGIA DE COMBINACIONES

DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE VIBRIOSIS EN SISTEMA PRODUCTIVO DE CAMARÓN (LITOPENAEUS VANNAMEI)

SYNERGY OF COMBINATION OF PLANT EXTRACTS FOR THE CONTROL OF VIBRIOSIS IN SHRIMP PRODUCTIVE SYSTEM (LITOPENAEUS VANNAMEI)

Cristopher Adrian Gómez Parrales¹

E-mail: cagomezp_est@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3025-8438>

Yinson Anibal Carbay Uyaguari¹

E-mail: ycarbay_est@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1351-314X>

Lita Sorroza Ochoa¹

E-mail: slita@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8829-0414>

Leonor Rivera Intriago¹

E-mail: lriviera@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9407-1525>

¹ Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

Cita sugerida (APA, sexta edición)

Gómez Parrales, C. A., Carbay Uyaguari, Y. A., Sorroza Ochoa, L., & Rivera Intriago, L. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibriosis en sistema productivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2(3), 91-98. Recuperado de <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA>

RESUMEN

Los vibrios son unos de los principales patógenos en el cultivo de camarón y causan pérdidas económicas a camaroneros. El uso inadecuado de fármacos ha ocasionado resistencia bacteriana y problemas medioambientales. El uso de extracto de plantas es una alternativa factible para la inhibición bacteriana. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto sinérgico de extractos alcohólicos de plantas sobre la presencia de vibrios en el organismo, agua de mar y biomasa de camarones. El estudio se efectuó en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad Técnica de Machala. Se probaron extractos alcohólicos combinados entre plantas de canela-eucalipto y tomillo-guayaba en presencia de vibrios. Se evaluó el efecto inhibitorio con 100 µl de los extractos sobre cepas de vibrios por 24 horas mediante difusión en Placa de Petri. Se dosificó 200 µl/gr y 400 µl/gr de cada combinación con el alimento durante 10 días, luego se aplicaron dosis de 2 mL y 4 mL de extractos en 1 litro de agua por 24 horas, luego se cuantificó el contenido de vibrios. La aplicación de extracto combinado de tomillo-guayaba a 400 µl/gr en alimento inhibió la presencia de vibrios (0 UFC) en hepatopáncreas y agua. El uso de extractos combinados produce un efecto sinérgico bactericida, adecuado para el tratamiento de la vibriosis en sistemas productivos del Camarón.

Palabras clave: Vibrio, sinergia, dosis, camarón, tratamientos, bactericida, inhibición.

ABSTRACT

Vibrios are one of the main pathogens in shrimp farming and cause economic losses to shrimp farmers. The inappropriate use of antibiotics has caused bacterial resistance and environmental problems. The use of plant extract is a feasible alternative for bacterial inhibition. The objective of this work is to evaluate the synergistic effect of alcoholic extracts of plants on the presence of vibrios in the organism, sea water and shrimp biomass. The study was carried out in the Microscopy Laboratory of the Technical University of Machala. Combined alcoholic extracts between cinnamon-eucalyptus and thyme-guava plants were tested in the presence of vibrios. The inhibitory effect was evaluated with 100 µl of extracts on vibrio strains for 24 hours by diffusion in Petri dish. 200 µl / gr and 400 µl / gr of each combination were dosed with feed for 10 days, then doses of 2 ml and 4 ml of extracts were applied in 1 liter of water for 24 hours, then the content of vibrios was quantified. The application of combined extract of thyme-guava at 400 µl / gr in food inhibited the presence of vibrios (0 CFU) in hepatopancreas and water. The use of combined extracts produces a bactericidal synergistic effect, suitable for the treatment of vibriosis in shrimp production systems.

Keywords: Vibrio, synergy, dose, shrimp, treatments, bactericide, inhibition.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se conoce que, la acuicultura es una actividad que se incrementa a nivel del mundo, por la demanda de recursos alimentarios marinos, ya que, la pesquería no puede abarcar todo el consumo de proteína. El cultivo de especies de carácter comercial, tanto peces, moluscos, como crustáceos, deben contar con las condiciones medioambientales adecuadas para su desarrollo, los mismos que, son muy lucrativos por su gran acogida en los mercados internacionales (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017). La producción camaronera en el Ecuador, en los últimos años ha ido aumentando, tanto por la demanda de exportaciones al mercado internacional (Quinde, Quinde & Riquero, 2018), como en el mercado interno. La ventaja del país es la de contar con las condiciones medioambientales óptimas para el buen desarrollo en el cultivo del Camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

Los productores gracias a estas ventajas, han incrementado las densidades de siembra en sus cultivos, lo cual ha traído consigo consecuencia como el aumento del rendimiento, y por ende la aparición de enfermedades con mayor frecuencia, esto se debe a causa del deterioro de la calidad de agua y del sustrato, y el estrés que estos cambios ocasionan a los animales en su hábitat. Agentes patógenos promotores de las enfermedades en el camarón, como los virus, hongos, bacterias y parásitos, están presentes en el medio ambiente en donde se cultiva. Entre ellos, los que ocasionan mayor afección son los clasificados como oportunistas, que es el caso de los hongos y las bacterias. Dichas enfermedades ocasionan mortalidades en el cultivo, que representan pérdidas económicas, como es el caso de la Vibriosis, causada por bacterias del género *Vibrio*. La afección depende del tipo bacteriano que prolifere en el medio, estos pueden ser *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, entre otras. Dichas bacterias son Gram negativas extracelulares y algunas oportunistas.

Para poder contrarrestar la presencia de estos agentes patógenos, los camaronicultores han optado por usar productos como probióticos y antibióticos, y de estos últimos, existen fármacos cuyo uso es prohibido, tales como el nitrofurano, y el cloranfenicol, por las afecciones que pueden causar, tanto al medio, como a los consumidores finales, pero antibióticos como la Florfenicol, y la Oxitetraciclina son de uso permitido. El uso prolongado de estos fármacos puede crear resistencia bacteriana a los mismos, malograr el medio, y puede provocar restricciones para exportar el producto, a causa de la residualidad en tejido.

A raíz de esto, se ha enfatizado en la búsqueda de nuevas alternativas para controlar estos agentes patógenos, como el uso de bacteriófagos específicos y el uso de plantas medicinales. De dichas plantas se extraen

sustancias de sus partes (raíces, tallo, hojas, flores, frutos), en solventes como aceites, alcoholes, formoles, agua, entre otros. Tanto en la medicina humana, medicina veterinaria, como en el campo acuícola, se han comprobado las bondades bactericidas y bacteriostáticas de estos productos, ya que sus compuestos inhiben el crecimiento bacteriano. Estos compuestos brindan una mejora en la calidad del agua, el crecimiento de los organismos cultivados, reduce el posible estrés y puede mejorar su sistema inmunológico.

Los principios activos de las plantas medicinales pueden causar efectos en las bacterias, tales como, lisar pared celular, bloquear proteína y la síntesis de ADN, pueden inhibir las secreciones enzimáticas y pueden interferir el quorum sensing.

Los extractos de plantas medicinales tienen efectos antimicrobianos por sí solos, pero su accionar se multiplica al trabajar en conjunto entre compuestos, potenciando su efecto, a lo que llamamos Sinergia. El estudio del sinergismo entre los compuestos de las plantas medicinales es un campo de investigación muy amplio, complejo y prometedor, ya que algunas sustancias, al trabajar en conjunto, facilitan la asimilación de los principios activos y su biodisponibilidad, mientras que otras sustancias pueden ser antagónicas o a su vez pueden ayudar a evitar efectos secundarios en el organismo.

El objetivo del trabajo fue probar extractos alcohólicos en sinergia de las plantas de Canela (*Cinnamomum verum J Presl*) - eucalipto (*Eucalyptus melliodora A.*), y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) - guayaba (*Psidium guajava L.*) combinados con 200 µl/gr y 400 µl/gr de alimento balanceado, para observar la concentración de vibrios, tanto en los organismos (camarón), mediante la ingesta de alimento, y en el agua, con la aplicación de dos dosis, 2 mL/L y 4 mL/L, de agua de mar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló entre agosto y septiembre del 2019, en el Laboratorio de Microscopía, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, perteneciente a la Universidad Técnica de Machala (UTMACH), provincia de El Oro, Ecuador, el cual cuenta con balanza de precisión, multiparámetros, vidriería, compresor aireador, entre otros equipos, condiciones asépticas adecuadas y temperatura adecuada de 26±1 °C. Se utilizaron 18 peceras con una capacidad de 4.8 L, en donde se trabajó con un volumen de 4 L de agua de mar, proveniente de una piscina camaronera en producción, la cual contaba con 26 ppt de salinidad, una temperatura de 23.5 °C, y 4.2 ppm de oxígeno disuelto (OD). Se colocaron botellas plásticas, con 1 L de agua de mar, la cual contaba con 26 ppt de salinidad, 23.5 °C, y 4.2 ppm de OD, una por cada tratamiento.

Para la preparación de los extractos alcohólicos, se utilizó el método de Rodríguez & Hecheverría (2004), mediante el cual, se inició la pulverización de hojas secas de las plantas de Eucalipto, Tomillo, Guayaba, y de cascara de Canela, luego, se tomaron 20 gramos de cada planta, y se colocaron en 50 mL de alcohol industrial al 96°, en envases plásticos, tapados y puestos a macerar durante tres días a temperatura ambiente. Pasados los tres días, fue evaluado el efecto inhibitorio de todos los extractos por medio de difusión en placa, para la cual se añadió 100 µl de cada extracto en filtros circulares estériles, luego estos fueron colocados en una placa previamente sembrada con vibrios a una concentración de 107 ufc/mL, luego se incubó a 25°C. Después de 24 horas se procedió a observar los halos de inhibición frente al patógeno.

Para el desarrollo de la investigación se utilizó un diseño factorial completo completamente al azar en el cual se combinaron los dos factores de estudio (extractos alcohólicos y dosis) alcanzando cuatro combinaciones posibles, las cuales fueron replicadas tres veces, además el testigo control utilizado para conocer en las condiciones que se desarrolló el experimento se replicó seis veces, para un total de 18 unidades experimentales (peceras).

Las dosis de los extractos de plantas combinadas se colocaron en relación 1:1 con un volumen final de 200 µl/gr de balanceado como primera dosificación y 400 µl/gr de balanceado como segunda dosificación, a los cuales se le adicionó pegante acuicola. En cada pecera se colocaron cinco camarones, previamente aclimatados durante tres días en el laboratorio, cuyo peso promedio inicial fue de 2.8 g, con una oxigenación constante mediante compresor de aire (6.5 ppm de oxígeno en cada pecera); la cantidad de alimento suministrado (balanceado al 35% de proteína) fue del 5% de la biomasa de los camarones. Diariamente se mantuvieron recambios de agua al 25% del volumen total. En el agua de mar se suministraron dos dosis, 2 mL/L de extracto y la segunda de 4 mL/L de extracto en relación 1:1 de los extractos combinados. Al control no se le suministro ningún extracto ni dosis.

Para contar las posibles colonias formadas (ufc/mL) se utilizó 1 g de hepatopáncreas de cada tratamiento, se realizaron diluciones sucesivas siguiendo la metodología de Passalacqua & Cabrera (2014), en serie (1/10), luego se sembró 100 µl en Placas de Petri, con agar TCBS, exclusivo para vibrios. Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (26±1 °C) en total oscuridad, luego se contaron las unidades de colonias formadas (ufc/gr). En el agua de mar, a las 24 horas, se realizaron siembras de 100 µl de cada tratamiento en Placas de Petri con Agar TCBS y Chromagar. Se incubaron por 48 horas. El peso de los camarones se realizó al inicio del experimento y a los 10 días, y se utilizó balanza gramera (marca Casio).

Para conocer si se presenta efecto de interacción entre los extractos alcohólicos (canela-eucalipto y tomillo-guayaba) y las dosis (200 y 400 µl/gr) en función del peso de

camarones a los 10 días se utilizó un ANOVA factorial intersujetos. De no presentarse efecto de interacción y con la finalidad de conocer si se presentan diferencias estadísticas significativas o no entre los factores de estudio (extractos alcohólicos y dosis utilizadas) en función de las UFC en camarones y agua; y peso de camarones a los 10 días, se aplicó por separado análisis de varianza de un factor intergrupos, previo cumplimiento de los supuestos del ANOVA (normalidad de datos, homogeneidad de varianzas E independencia de observaciones). Cuando se presentaron diferencias estadísticas significativas entre extractos alcohólicos y dosis se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 24 de prueba para Windows y un error máximo permitido de 5% ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto inhibitorio frente a Vibrios

En la evaluación del efecto inhibitorio se pudo observar un halo de inhibición frente a los Vibrios correspondiente a 6mm para el extracto de Canela, Tomillo, y Eucalipto, 5 mm para el extracto de Guayaba (*Psidium guajava*) como se muestra en la figura 1.

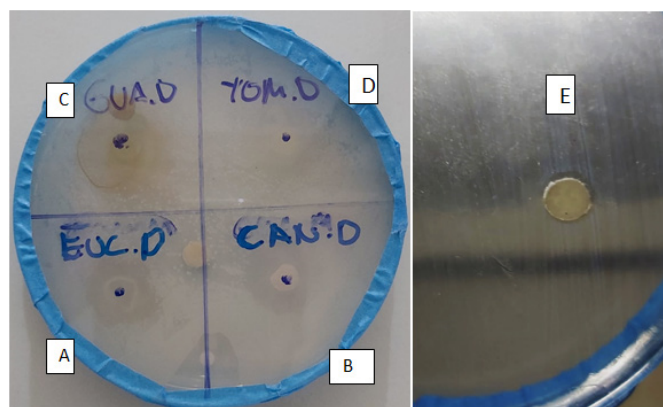


Figura 1. Efecto inhibitorio (halo de inhibición) frente a colonias de vibrios, con extracto de eucalipto (A), canela (B), guayaba (C), tomillo (D), en una concentración de 20 g en 50 mL de alcohol industrial 96° y el control solo con alcohol industrial 96° (E).

Los compuestos de las plantas medicinales son los que le dan la capacidad inhibitoria, frente a microorganismos bacterianos tales como alcaloides, terpenoide, taninos, saponinas, flavonoides, entre otros como mencionan Reverter, Tapissier, Sasal & Saulner (2017), en donde la obtención del de los mismo dependen del tipo de planta y de la forma de extracción, como en el caso de la canela, que contiene aldehídos, y eugenol, que son antibacterianos y antifúngicos.

Plantas como la de eucalipto presentan aproximadamente 12 compuestos de carácter antibacteriano. Granados, Santafé & Acevedo (2015), mencionan el amplio efecto inhibitorio frente a bacterias Gram +, Gram -, y hongos. Del

mismo modo, la guayaba tiene grandes propiedades antibacterianas, al contener piranosídeos, gualajaverina, entre otros compuestos. Según Martínez, Molina & Boucourt (1997), al extraer sus principios activos en etanol al 40% tiene una efectividad media frente a bacterias y hongos.

Srivastava, et al. (2016), establecieron que, la actividad antibacteriana de los compuestos de la canela en acetona fue la mejor frente a *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, seguido del metanol y etanol.

Gedikoğlu, Sökmen & Çivit (2019), en su estudio mencionan que el tomillo tiene gran efectividad frente a bacterias Gram + y Gram -, gracias a que contiene thymol (79%), carvacrol (5%), al extraer con metanol como solvente, potencia la actividad antibacteriana. Así mismo Rodríguez (2018), señala las propiedades antibacterianas (inhibición: 47.98%) del higuero (*Ficus citrifolia*), por sus componente, entre ellos los taninos condensados, lactonas, entre otros.

Llivicura (2018), señala que las plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*) tienen actividades antimicrobianas, antifúngicas, por sus principios activos, los cuales varían según el tipo de planta y del método de extracción. Del mismo modo, Sarango (2019), señala que las plantas de toronjil (*Melissa officinalis*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) en la prueba de inhibición frente a cepas de vibrios, mostraron halos de inhibición de 5 mm y 7 mm, respectivamente.

Conteo de las colonias

Para el conteo de Vibrios cultivados en las Placas de Petri del hepatopáncreas, pasado los 10 días establecidos, en los cuales se suministró alimento balanceado enriquecido con los extractos en sinergia (1:1), con las dos dosis previamente establecidas (200 µl/gr y 400 µl/gr) a los camarones, se observó la clara disminución de la presencia de vibrios en todos los tratamientos, en donde el tratamiento guayaba-tomillo en 400 µl/gr mostro la mejor acción ante los vibrios, al no mostrar colonias (TCBS), con respecto al control que mostró una concentración de 1.19x10⁵ ufc/gr de hepatopáncreas (tabla 1).

Tabla 1. Conteo de Vibrios en agar TCBS, cultivados del molturado de hepatopáncreas de los camarones alimentados con dos dosis establecidas anteriormente (200 µl/gr y 400 µl/gr), de extractos alcohólicos en sinergia entre las plantas de Canela, Eucalipto y entre Tomillo, Guayaba por cada gramo de balanceado, con su respectivo control.

Tratamientos	Cantidad de Vibrio (UFC/g)	Porcentaje (%)	Color
Control	1 x10 ⁵	96	Amarillas
		5	Verde
canela-eucalipto en 200 µl/gr	3x10 ²	100	Amarillas

guayaba-tomillo en 200 µl/gr	2x10 ²	100	Amarillas
canela-eucalipto en 400 µl/gr	5x10 ³	100	Amarillas
guayaba-tomillo en 400 µl/gr	0	0	N/A

La presencia de colonias verdes y amarillas en el cultivo de bacterias en agar TCBS, se presenta en el tratamiento control, mientras que en los otros tratamientos solo se registraron colonias amarillas. Todos los tratamientos, tuvieron efecto en la disminución de vibrios en el camarón, con respecto al control, pero en el tratamiento correspondiente a guayaba-tomillo en 400 µl/gr se muestra la mejor sinergia ya que no hubo crecimiento de vibrios después de 24 horas.

Con respecto a la sinergia entre los tratamientos canela-eucalipto en 200 µl/gr y guayaba-tomillo en 200 µl/gr existe sinergia, pero no es significativa entre ellas, pero si respecto al control. Por otra parte, en el tratamiento canela-eucalipto en 400 µl/gr se pueden notar crecimiento bacteriano, pero esto puede ser debido a que los animales no consumieron todo el alimento medicado en su totalidad. Los efectos positivos de esta investigación son similares a los obtenidos por otros autores y esto se da, gracias a la sinergia que ocurre al combinar los principios activos de las plantas medicinales objeto de estudio, como lo menciona Jaramillo, Jaramillo, D’Armas, Troccoli & Rojas (2016), en donde la sinergia entre los componentes de canela y eucalipto, se debe a la presencia de saponinas y polifenoles respectivamente, ya que al combinarse causan en el patógeno un efecto bactericida.

La sinergia entre flavonoides pertenecientes a los compuestos de las hojas de guayaba y tomillo, dan una alta función antibacteriana y antioxidante como lo mencionan Más Toro, et al. (2017), en su estudio donde al combinar moringa a mayor proporción que la guayaba (sinergismo), dan un mayor resultado frente a bacterias Gram Negativas.

Fierro, et al. (2019) echinacea, ginger, and basil, en su investigación determinaron que la sinergia entre los principios activos en combinación del jengibre, albahaca y ajo, protegen al camarón blanco del Pacífico contra el WSSV y *V. parahaemolyticus*. Asimismo, Arief & Happy (2015), utilizaron en su estudio, extracto metanólico de hojas de Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) en la reducción en la carga de vibrios en el post-larva de camarón tigre (*Penaeus monodon*), dando buenos resultados, además la sinergia entre sus principios activos extraídos en metanol, mostro ser no tóxico para el organismo. García, Orozco & Molina (2012), en su estudio concluyeron que, para la inhibición de *Vibrio spp.* En camarones peneidos, el compuesto del aceite del orégano (carvacrol) tiene gran efecto.

De igual forma, los extractos de *Melissa officinalis* y *Ocimum basilicum*, probados por Sarango (2019), suministrados en dietas balanceadas durante 10 días, disminuyeron las colonias amarillas y colonias verdes, respectivamente, en agar selectivo (TCBS). Del mismo modo, Trejo, et al. (2016), encontraron un efecto protector del polvo de Aloe vera en el alimento (1 gr/kg) dosificando cada dos días en *P. vannamei* causo resistencia a *V. parahaemolyticus*.

De igual manera, Moussaoui & Alaoui (2016), mencionan la actividad antibacteriana de los flavonoides metilados extraídos de la resina de *Heliotropium sinuatum*, presentan gran actividad antibacteriana, probado en cepas de *Escherichia coli*, en donde, las flavonovas son las de mayor acción antibacteriana.

Los extractos de plantas no solo han sido utilizados en camarones, sino también en otros organismos acuáticos como lo menciona Yilmaz, Tasbozan & Erbas (2018), en su investigación denotan el uso de plantas medicinales como el romero, el mismo que tiene efecto frente a los Estreptococos en tilapia del Nilo, también plantas como aloe vera causan mejoras en el crecimiento del pez dorado y resistencia a infecciones bacterianas, al suministrarles ésta en su dieta balanceada.

Después de 24 horas de haber colocado los extractos en el agua de mar, se pueden observar que en todos los tratamientos hubo una disminución del crecimiento bacteriano con respecto al control, siendo el tratamiento a base de guayaba-tomillo en 4 mL/L el que mostró los mejores resultados ya que no hubo crecimiento bacteriano (Tabla 2).

Tabla 2. Conteo de Vibrios en agar TCBS, cultivados del agua de mar con dos dosis establecidas anteriormente (2 mL/L y 4 mL/L), de extractos alcohólicos en sinergia entre las plantas de Canela, Eucalipto y entre Tomillo, Guayaba, por cada litro de agua, con su respectivo control.

Tratamientos	Cantidad de Vibrio (UFC/g)	Porcentaje (%)	Color
Control	2 x10 ⁴	100	Amarillas
Canela/Eucalipto en 2 mL/L	5x10 ²	80	Amarillas
		20	Verde
Guayaba/Tomillo en 2 mL/L	4x10 ²	75	Amarillas
		25	Verde
Canela/Eucalipto en 4 mL/L	1x10 ²	100	Amarillas
Guayaba/Tomillo en 4 mL/L	0	0	No aplica

Para la clasificación de Vibrios en el agua de mar, mediante coloración en Chromagar, se observaron en mayor concentración cepas azules (*V. vulnificus*), de color mauve (*V. parahaemolyticus*) y crema (*V. alginolyticus*), en todos los tratamientos y el control, pero con distintas concentraciones para cada una.

La mejor eficiencia en el agua se dio en el tratamiento Guayaba y Tomillo en 4 mL/L , en donde, la sinergia entre los compuestos de Guayaba y tomillo, dio buenos resultados, a una concentración de 4 mL por litro de agua, de igual manera como menciona, en donde los extractos de *Sargassum hemiphyllum* y polvo de ají dulce (*Capsicum chinense*) trabajando en sinergia, mezclados en el agua marina, ayudó a los camarones a tener mayor resistencia a infecciones con *V. alginolyticus* y WSSV.

Este trabajo es similar al realizado por Sorroza, Campoverde & Santacruz (2017), donde demostraron que los extractos de las plantas como hierba luisa (*Aloysia triphilla*) y orégano (*Origanum vulgare*), disminuye la carga de vibrios en el agua, de similar forma, Villanueva, Martínez, Martínez & Arvayo (2015), mencionaron la disminución de vibrios en el agua y la mejora del medio, mediante el uso de *Lasianthaea podocephala*.

En lo que corresponde a la biomasa de los camarones a los 10 días con respecto a la combinación de los tratamientos en los dos factores de estudio, se obtuvo un p-valor de 0.700, por lo que estadísticamente no se presentan diferencias significativas, no mostrándose un efecto de interacción entre los extractos alcohólicos y las dosis utilizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Pruebas de efectos inter-sujetos para los factores extractos alcohólicos y dosis en función del peso (g) de los camarones a los 10 días.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Extractos alcohólicos *Dosis	0,050	1	0,050	0,150	0,700
Error	27,316	82	0,333		
Total	1087,943	87			
Total corregido	29,042	86			
a. R al cuadrado = ,059 (R al cuadrado ajustado = ,014)					

La prueba estadística realizada muestra un p-valor de 0,141, valor mayor a 0,05 por lo que, no se presentan diferencias estadísticas significativas entre las combinaciones de extractos alcohólicos en función de la biomasa de camarones a los 10 días (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas de efectos inter-sujetos para el factor combinación de extractos alcohólicos en función del peso (g) de los camarones a los 10 días.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	1,321	2	0,661	2,002	0,141
Dentro de grupos	27,720	84	0,330		
Total	29,042	86			

En el gráfico de la figura 2 se muestran las medias de peso de los camarones a los 10 días de sembrados, y aunque no se presentan diferencias estadísticas entre los grupos creados a partir de las combinaciones de extractos alcohólicos, se evidencia una tendencia al aumento de peso, cuando se alimentan los camarones con un balanceado con adición de estos extractos alcohólicos y en especial la combinación de tomillo-guayaba.

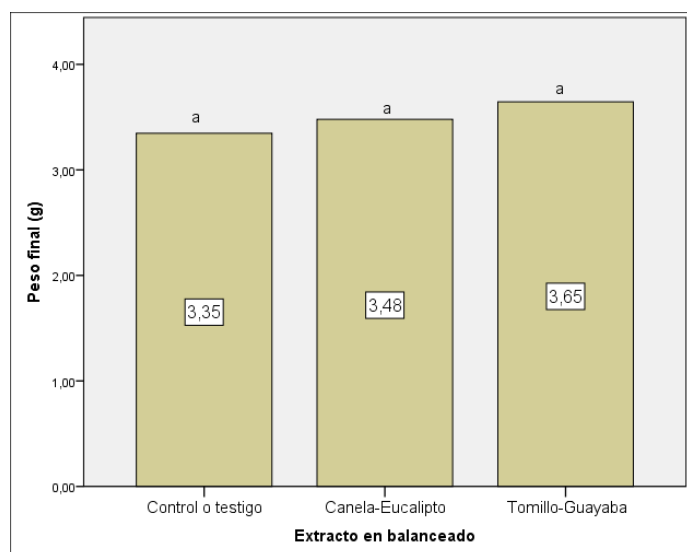


Figura 2. Peso de los camarones a los 10 días, con extractos alcohólicos combinados de plantas de canela-eucalipto y tomillo-guayaba.

*Letras iguales para los tratamientos no difieren estadísticamente para un p-valor<0,05.

La prueba estadística realizada muestra un p-valor de 0,160, y al ser mayor a 0,05, se infiere que no se presentan diferencias estadísticas significativas entre las dosis de extractos en función de la biomasa de camarones a los 10 días (Tabla 5).

Tabla 5. Pruebas de efectos inter-sujetos para el factor dosis extractos alcohólicos en función del peso (g) de los camarones a los 10 días.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	1,239	2	0,620	1,872	0,160

Dentro de grupos	27,802	84	0,331		
Total	29,042	86			

Las medias de peso de los camarones a los días 10 días de sembrados, no presentan diferencias estadísticas entre los grupos creados a partir de las dosis de extractos alcohólicos, sin embargo, se evidencia una tendencia al aumento en peso, cuando se alimentan los camarones con un balanceado dosificado a 200 y 400 µl/g, siendo mayor en esta última dosis.

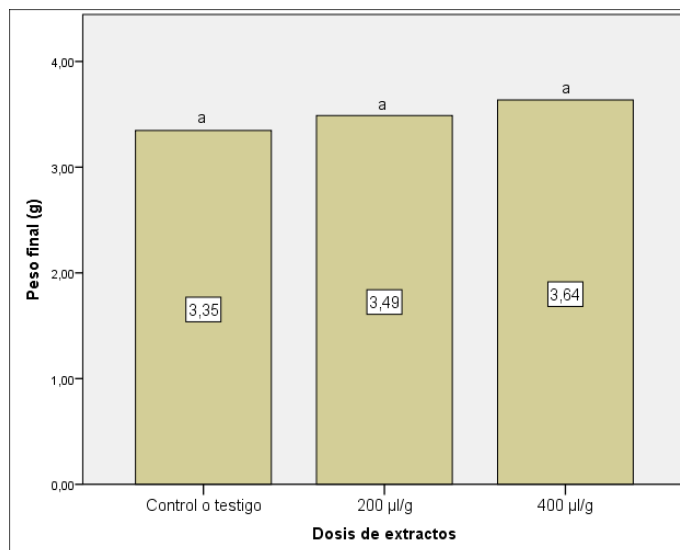


Figura 3. Peso de los camarones a los 10 días, alimentados con dos dosis establecidas (200 µl/g y 400 µl/g), de extractos alcohólicos combinados de plantas de canela-eucalipto y tomillo-guayaba, y el testigo control.

*Letras iguales para los tratamientos no difieren estadísticamente para un p-valor<0,05.

Lo obtenido puede ocurrir debido a la aceptación del alimento por parte de los animales, o por la sinergia de los extractos alcohólicos y sus compuestos, que lo hacen biodisponibles, mejorando el sistema inmune de los animales, y el crecimiento, lo que se corrobora con López (2018), que probó el efecto bactericida de ajo, cebolla y jengibre, frente a cepas de vibrios en juveniles de camarón blanco, dando la respuesta esperada, por los principios activos en sinergia de estos tres compuestos, que también ayudan a mejorar el crecimiento de los camarones.

CONCLUSIONES

La sinergia al combinar los extractos alcohólicos ente canela y eucalipto, guayaba y tomillo, dio los resultados esperados al bajar la carga de vibrios (Gram negativas), tanto en el organismo, como directo en el agua, lo que sugiere que podría ser usado en el campo acuícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arief, H., & Happy, E. (2015). Potential Study of Kopsandra (Chromolaena odorata L.) Leaves as Antibacterial Against *Vibrio harveyi*, Disease Causative Agent of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Post Larvae. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/c628/86534aaacef88c8313e04e6586a609541d90.pdf?ga=2.236669825.1825871133.1574187156-1472184485.1574187156>
- Fierro, J., et al. (2019). Effect of medicinal plants on the survival of white shrimp (*Penaeus vannamei*) challenged with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. *Latin American journal of aquatic research*, 47(2), 377-381. Recuperado de <http://lajar.ucv.cl/index.php/rlajar/article/view/vol47-issue2-fulltext-20/1062>
- Gediköglu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, 7(5), 1704-1714. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6526640/>
- Granados, C., Santafé, G. G., & Acevedo, D. (2015). Chemical composition and evaluation of antioxidant activity of leaf essential oil *Eucalyptus camaldulensis* from Norte de Santander (Colombia). *Rev. U. D. C. A Act Div Cient.*, 18(1), 235-240. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100027
- Jaramillo, C., Jaramillo, A., D'Armas, H., Troccoli, L., & Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171-1184. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/449/44946472020.pdf>
- Llivicura, M. (2018). *Comparación in vitro de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero (Rosmarinus officinalis) y cola de caballo (Equisetum arvense); frente al hongo Colletotrichum gloeosporioides Penz.* (Tesis de Grado). Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.
- López, R., & Herrera, C. S. (2013). *Efecto de tres bactericidas naturales (Ajo, Cebolla y Jengibre) sobre las poblaciones de Vibrio, patógenos de camarones juveniles Litopenaeus vannamei en estanques experimentales.* (Tesis Ing. Acuicola). León: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Martínez, J., Molina, N., & Boucourt, T. E. (1997). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del Psidium guajava L (Guayaba).* *Rev. Cubana Plant Med.*, 2(1), 12-14. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v2n1/pla03197.pdf>
- Más Toro, D., Martínez, Y., Rodríguez, R., Pupo, G., Rosabal, O., & Olmo, C. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1). Recuperado de <http://cielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla05117.pdf>
- Moussaoui, F., & Alaoui, T. (2016). Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 32-37. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222116911500249X>
- Passalacqua, N., & Cabrera, J. (2014). Diluciones decimales sucesivas. *Análisis microbiológico de los alimentos*, 3. Recuperado de https://www.academia.edu/20189648/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III
- Reverter, M., Tapissier, N., Sasal, P., & Saulnier, D. (2017). *Use of Medicinal Plants in Aquaculture*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/315850361_Use_of_Medicinal_Plants_in_Aquaculture
- Rodríguez, F. (2018). *Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico del Ficus citrifolia Mill. (Moraceae), in vitro frente a cepas de Staphylococcus aureus.* (Tesis de Grado). Lima: Universidad Inca Garcilaso de La Vega.
- Rodríguez, H., & Hechevarría, I. (2004). Efectos estimulantes del crecimiento de extractos acuosos de plantas medicinales y gel de Aloe vera (L.) N. L. Burm. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(2). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000200006
- Sarango, J. (2019). *Evaluación del efecto de dos plantas medicinales sobre la presencia de vibrios spp en el camarón blanco (Litopenaeus vannamei).* (Tesis de Grado). Machala: Universidad Técnica de Machala.
- Srivastava, A., Singh, A., & Singh, M. (2016). Antibacterial activity of spices against *Vibrio* species isolated from pond water. *Pelagia Research Library*, 6, 21-25. Recuperado de <http://www.imedpub.com/articles/antibacterial-activity-of-spices-against-ivibrioi-species-isolated-from-pond-water.php?aid=11625>
- Trejo, J., et al. (2016). Protective effect of Aloe vera in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 465, 60-64. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848616304331>
- Yilmaz, E., Taşbozan, O., & Erbaş, C. (2018). Potential of medical herbal products to be used in aquaculture. *Eastern Anatolian Journal of Science*, 6(2), 17-23. Recuperado de <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/578807>