



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO  
ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LOS  
ACEITES ESENCIALES DE  
MUÑA (*Minthostachys mollis*), MOLLE  
(*Shinus molle*) Y LIMÓN SUTIL (*Citrus  
aurantifolia*) FRENTE A AISLADOS  
PATOGENICOS DE *Aeromonas spp.*  
PROCEDENTES DE TRUCHAS  
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)  
CULTIVADAS EN EL PERÚ”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN SANIDAD ACUÍCOLA

MARIA TERESA APARICIO ZAPATA

LIMA - PERÚ

2022

**ASESOR**

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

**CO - ASESOR**

Dr. Mg. MV. Luis Llanco Albornoz

**JURADO DE TESIS**

DR. CARLOS MARTIN SHIVA RAMAYONI

PRESIDENTE

MG. CIELO AYDELI LLERENA ZAVALA

VOCAL

MG. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR

SECRETARIO (A)

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mis padres y hermanos , mis mejores amigos, la fortaleza de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por todas las bendiciones que día a día tengo en mi vida.

A los docentes por compartir sus conocimientos durante mi paso por la UPCH y al personal administrativo por su amabilidad y cooperación en cada tramite realizado.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230- 2015- FONDECYT-DE-PROMOCION 3).

# EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MUÑA (*Minthostachys mollis*), MOLLE (*Shinus molle*) Y LIMÓN SUTIL (*Citrus aurantifolia*) FRENTE A AISLADOS PATOGENICOS DE Aerom

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>19%</b>	<b>19%</b>	<b>7%</b>	<b>4%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>7%</b>
<b>2</b>	<b>cybertesis.unmsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>revistas.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>repositorio.ucv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>www.revistas.unitru.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>dspace.unitru.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
III.	MARCO TEÓRICO.....	5
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	16
V.	OBJETIVOS .....	18
VI.	METODOLOGÍA .....	19
VII.	RESULTADOS.....	31
VIII.	DISCUSIÓN .....	43
IX.	CONCLUSIONES .....	55
X.	RECOMENDACIONES .....	56
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición total del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> “Muña”. Se describen entre sus principales constituyentes: Isomentona, Pulegona y Acetato de carvacrol.	32
<b>Tabla 2.</b> Composición total del aceite esencial de <i>Shinus molle</i> “Molle”. Se describen entre sus principales constituyentes: $\beta$ -Mirceno, $\alpha$ -Felandreno y D-Limoneno.	34
<b>Tabla 3.</b> Composición total del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> “limón sutil”. Se describen entre sus principales constituyentes: D-Limoneno y $\gamma$ -Terpineno.	35
<b>Tabla 4.</b> Análisis de normalidad de los halos de inhibición obtenidos tras la prueba de difusión en pozo de los aceites esenciales de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ), molle ( <i>Shinus molle</i> ) y limón sutil ( <i>Citrus aurantifolia</i> ) según grupo tratamiento: 5, 10, 15 % v/v frente a las cepas de <i>Aeromonas spp.</i> a las 24 horas, según el test Shapiro Wilk.	37
<b>Tabla 5.</b> Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ), molle ( <i>Shinus molle</i> ) y limón sutil ( <i>Citrus aurantifolia</i> ) al 5,10 y 15% v/v frente a las cepas de <i>Aeromonas spp.</i> a las 24 horas. Se observan la media del diámetro de los halos de inhibición (en milímetros) tras la prueba de difusión en pozo.	38
<b>Tabla 6.</b> Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ) frente a las cepas de <i>Aeromonas spp.</i>	40
<b>Tabla 7.</b> Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ) frente a las cepas de <i>Aeromonas spp.</i>	40

## RESUMEN

El salmónido trucha arcoíris es la especie acuícola de origen continental de mayor producción a nivel nacional. El cultivo de trucha viene siendo limitado por la presentación de altas mortalidades de origen infeccioso, lo cual genera elevadas pérdidas económicas y productivas. Ante esta problemática se vienen desarrollando alternativas profilácticas, como el uso de productos derivados de plantas con efecto antibacteriano. En base a ello, el presente estudio se enfocó en la evaluación de la susceptibilidad de 34 cepas bacterianas de *Aeromonas spp.*, uno de los principales patógenos que afectan a la trucha en el Perú, frente a aceites esenciales de muña, molle y limón. Para ello se realizaron dos ensayos *In vitro*. El método de difusión en agar permitió determinar que el aceite esencial de muña 15% presentó actividad antibacteriana fuerte, con halos de inhibición de  $16.466 \pm 0.840$  mm de diámetro, mientras que los aceites de molle y limón mostraron actividad moderada, frente a las cepas patogénicas de *Aeromonas spp.* El Método de microdilución en caldo permitió determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de muña a una concentración (CMI) de 0.625 y 0.156 % v/v. Así mismo, se confirmó que el AE de muña tiene actividad bactericida a las concentraciones de 0.625 y 0.156 % v/v (Concentración mínima bactericida).

**Palabras Clave:** Aceite esencial, *Aeromonas spp.*, *Shinus molle*, *Citrus aurantifolia*, *Minthostachys mollis*.



## **ABSTRACT**

The rainbow trout salmonid is the aquaculture species of continental origin with the highest production at the national level. Trout farming is limited by the presentation of high mortalities of infectious origin, which generates high losses being economic and productive. Faced with this problem, prophylactic alternatives are being developed, such as the use of products derived from plants with an antibacterial effect. Based on this, the present study focused on the evaluation of the susceptibility of 34 bacterial strains of *Aeromonas spp.*, one of the main pathogens that killed trout in Peru, against essential oils of muña, molle and lemon. For this, two in vitro tests were carried out. The agar diffusion method was able to determine that the 15% muña essential oil presented strong antibacterial activity, with inhibition halos of  $16.466 \pm 0.840$  mm in diameter, while the molle and lemon oils showed moderate activity against pathogenic strains. of *Aeromonas spp.* The broth microdilution method will be able to determine the inhibitory effect of muña essential oil at a concentration (CMI) of 0.625 and 0.156% v/v. Likewise, it is guaranteed that muña EO has bactericidal activity at concentrations of 0.625 and 0.156% v/v (minimum bactericidal concentration).

**Keywords:** *Essential oil, Aeromonas spp., Shinus molle, Citrus aurantifolia, Minthostachys mollis.*

## I. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola ha venido mostrando una tendencia positiva, y aunque en los últimos años ha experimentado un descenso moderado, sigue creciendo a mayor escala que otros sectores importantes de la producción de alimentos (FAO, 2018). Entre las especies acuícolas de mayor comercio mundial se encuentra el salmónido *Oncorhynchus mykiss* (FAO, 2018), recurso hidrobiológico de mayor producción nacional que ocupó el 63,79% de la producción acuícola continental del año 2017 (PRODUCE, 2017).

La intensificación de los cultivos, junto con inadecuadas prácticas acuícolas incrementan la susceptibilidad de los peces a presentar enfermedades infecciosas (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). Ante ello, la terapia con antibióticos ha sido la solución más empleada en las piscifactorías (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2017). Sin embargo, el impacto negativo que genera el uso inadecuado de antibióticos hace necesaria la búsqueda de alternativas que puedan ser utilizadas frente a esta problemática (Bandeira *et al.*, 2017).

Bajo el conocimiento del uso tradicional de ciertas plantas como medicina natural, los investigadores empezaron a estudiar a los aceites esenciales y otros extractos de plantas con efecto antibacteriano, pero estas investigaciones fueron desplazadas tras el inicio de la producción masiva de antibióticos (Thomar, 2011).

Sin embargo, después de los primeros reportes de resistencia bacteriana a los antibióticos se retomó el interés en el desarrollo de

compuestos antibacterianos a partir de productos naturales (Da Cunha *et al.*, 2018). Actualmente, las investigaciones se enfocan en el estudio de los compuestos bioactivos derivados de diferentes especies de plantas como tratamiento alternativo a muchas enfermedades (Park *et al.*, 2016).

En consecuencia, sabiendo que en el Perú se producen aceites esenciales de plantas que ancestralmente se han utilizado como antimicrobianos, es necesario conocer su eficacia frente a bacterias patógenas que tienden a generar resistencia a antibióticos y que actualmente afectan a la principal especie producida en acuicultura continental como lo es la trucha arcoíris.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acuicultura es una industria que ha crecido exponencialmente en los últimos años, aportando un importante porcentaje de proteína de alta calidad en alimentación de la población. No obstante, como en todos los sistemas pecuarios, la producción intensiva viene acompañada de un impacto negativo, principalmente debido al incumplimiento de buenas prácticas en la producción y el inadecuado manejo de enfermedades infecciosas durante el cultivo (Mateo *et al.*, 2016).

Los efectos negativos del uso indiscriminado de antibióticos en el control de las enfermedades resultan en contaminación del medio, tanto de agua como sedimentos, así como la generación de reservorios de bacterias resistentes a los medicamentos (García *et al.*, 2021). Ante ello, para el control de enfermedades se vienen desarrollando alternativas profilácticas como la vacunación, pero por su alto costo podría no ser viable en todas las piscifactorías.

Por otro lado, diversos estudios han reportado productos derivados de plantas, con efectos bactericidas contra patógenos frecuentes en humanos y animales, cuyas sustancias bioactivas siguen siendo investigadas a profundidad, debido a que han sido enfocadas como una excelente opción frente el uso de antibióticos (Tukmechi *et al.*, 2010, Balouiori *et al.*, 2016, Sutili *et al.*, 2017, Da Cunha *et al.*, 2018).

En el campo de la acuicultura, ya se han estudiado algunas plantas y

frutos con efecto bactericida; no obstante, existe una variabilidad entre los resultados debido a que la presencia de ciertos grupos funcionales puede variar entre especies de plantas, procedencia y forma de cultivo (Runyoro *et al.*, 2010); así mismo, la constante aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, con diferentes mecanismos de infección amerita el constante estudio de la efectividad de estos productos.

En este contexto, el estudio del efecto bactericida de productos derivados de plantas cultivadas en el país, contra aislados patogénicos de *Aeromonas spp.* permitirá disponer de información necesaria para iniciar estudios en organismos vivos. Por lo cual, se ha planteado evaluar la susceptibilidad de *Aeromonas spp.*, uno de los principales patógenos que afectan la truchicultura en el Perú frente a aceites esenciales procedentes de tres plantas cultivadas en el país.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Panorama acuícola

A partir del decenio de 1980 la acuicultura mundial ha mostrado un notable crecimiento como sector productivo, siendo la acuicultura continental uno de los principales promotores del sector acuícola en general, representando el 64% de la producción mundial de peces comestibles cultivados del año 2016 (FAO, 2018). En el Perú, la acuicultura continental está representada por el cultivo de trucha arcoíris, producción que ha experimentado un crecimiento de 339,1% en los últimos diez años (PRODUCE, 2017).

En tal sentido, el crecimiento y la intensificación de la acuicultura, junto con malas prácticas acuícolas, hacinamiento y mala calidad de agua son factores que incrementan la susceptibilidad de los peces a las infecciones por una gran variedad de patógenos (Ji *et al.*, 2017), escenario observado especialmente en países en desarrollo (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2017). Siendo uno de principales patógenos que aprovechan las condiciones de estrés para producir enfermedad en los peces, la bacteria *A. salmonicida* (Zepeda *et al.*, 2017).

#### 3.2. Género *Aeromonas*

*Aeromonas* (etimológicamente unidades productoras de gas: ‘*Aer-gas* y *monas*- unidades’) (Bravo, *et al.* 2020), son miembros de la clase Gammaproteobacterias, orden Aeromonadales, y familia Aeromonadaceae (Alperi *et al.*, 2010; Bravo *et al.*, 2020; Dallaire-Dufresne, *et al.*, 2014). Las 36 especies bacterianas pertenecientes a este género (Bravo, *et al.* 2020,

Puah *et al.*, 2018) se caracterizan habitar ambientes acuáticos y afectar a animales, humanos (Alperi *et al.*, 2010) y poiquiloterms (Dallaire-Dufresne, *et al.*, 2014), actuando generalmente como patógenos oportunistas (Reith, *et al.*, 2008).

El género *Aeromonas* puede dividirse en dos grupos: psicrófilo (bacterias no móviles, que crecen entre 22 y 25°C) y mesófilo (bacterias móviles, que crecen entre 35 y 37°C) (Reith, *et al.*, 2008, Gonçalves *et al.*, 2019). En particular, el grupo psicrófilo está representado por *Aeromonas salmonicida*, principal causante de enfermedad en peces (Gonçalves *et al.*, 2019), cuyas subespecies han sido catalogadas como típicas y atípicas (Gulla, *et al.*, 2019). La especie *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* conocida como *A. salmonicida* "típica" generalmente afecta a salmónidos. Mientras que las otras cuatro subespecies, conocidas como "atípicas" afectan a peces no salmónidos (Gulla, *et al.*, 2019).

*A. salmonicida* son bacilos gramnegativos, oxidasa y catalasa positivos (Bravo, *et al.* 2020). Sus colonias tienen el tamaño de una cabeza de alfiler a las 18 a 24 horas de incubación, mientras que 3 días después, presentan un aspecto circular, convexo y friable con un diámetro de 1-2 mm (Gonçalves *et al.*, 2019; Dallaire-Dufresne, *et al.*, 2014). El cultivo en laboratorio puede realizarse en una variedad de medios de cultivo tales como Tryptic soy agar (TSA), Tryptic soy broth (TSB) y medios diferenciales como Glutamate Starch Phenol Red (GSP) (Gonçalves *et al.*, 2019). Aunque suelen producir un pigmento marrón difuso en agar, no todas las cepas presentan esta característica (Reith, *et al.*, 2008, Dallaire-Dufresne, *et al.*,

2014). La identificación molecular del género *Aeromonas* comúnmente se ha realizado mediante la amplificación de marcadores moleculares, como el gen 16S rRNA, bajo técnicas convencionales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gonçalves *et al.*, 2019).

### **3.3. Furunculosis**

La enfermedad causada por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en salmónidos como *Oncorhynchus mykiss* es: furunculosis (Valderrama *et al.*, 2017). Su nombre deriva de los furúnculos que se desarrollan en piel y musculatura de peces enfermos (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). La vía de transmisión es por contacto directo entre peces o a través de agua contaminada cuando las barreras cutáneas están afectadas (Supattapone *et al.*, 2017).

Los brotes de esta enfermedad se caracterizan por producir alta mortalidad y morbilidad (Villumsen *et al.*, 2017) y su aparición depende de diferentes factores tanto propios del hospedero como de las condiciones ambientales, tales como: estado de salud, edad, temperatura elevada, flujo reducido de agua, altas densidades de cultivo, etc. (Supattapone *et al.*, 2017, Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014).

Se han descrito tres formas de la enfermedad: Aguda, crónica y latente. La forma aguda, suele presentarse en peces juveniles, observándose cuadros septicémicos con muertes súbitas en dos a tres días. Los peces presentan melanosis, letargia, anorexia, lesiones necróticas en piel y hemorragias en órganos internos. En la forma crónica, los peces generalmente adultos, desarrollan furúnculos, hemorragias en la base de las



aletas y tracto digestivo, prolapso anal además de melanomas, pérdida de apetito y letargo. Tiene un inicio lento de síntomas y baja mortalidad. Por último, en la forma latente, los peces enfermos son portadores subclínicos (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014).

Actualmente, existen varias estrategias para el tratamiento y prevención de furunculosis como: antibióticos, vacunas, probióticos, bacteriófagos, etc. (Supattapone *et al.*, 2016). No obstante, los brotes infecciosos habitualmente son tratados con antibióticos (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2017), incluso han sido utilizados como preventivos; lo cual ha promovido la presencia de resistencia antimicrobiana (Ji *et al.*, 2017). La gravedad de esta situación se observa en el fracaso de los tratamientos, especialmente con fármacos de uso frecuente como tetraciclina y las quinolonas (Kim *et al.*, 2013).

### **3.4. Aceites esenciales (AE)**

En términos generales, la presencia de patógenos resistentes a los antibióticos ha creado la necesidad de buscar compuestos antimicrobianos alternativos que puedan ser empleadas en reemplazo, en combinación o como suplemento de los tratamientos convencionales a fin de lograr un efecto sinérgico y mejorar la eficacia de los tratamientos (Luís *et al.*, 2016). En tal sentido, se han desarrollado diversos estudios para determinar métodos alternativos a la terapia antibiótica (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2017), uno de los cuales es el uso de productos derivados de plantas como los aceites esenciales. Estos recursos se caracterizan por ser inocuos para el ambiente, viables económicamente (Chouhan *et al.*, 2017) y generar efectos

antioxidantes, antiestrés, estimulantes de apetito, crecimiento, efectos tónicos e inmunitarios en los animales (Bandeira *et al.*, 2017).

Los aceites esenciales también llamados aceites etéreos, aceites volátiles o aceites vegetales, son una mezcla de compuestos químicos complejos, aceitosos o lipídicos, volátiles y de intenso olor; que generalmente se extraen de las semillas, frutos, flores, hojas, brotes, raíces o corteza de las plantas. Se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente y por tener baja solubilidad en agua y alta en grasas, alcohol, disolventes orgánicos y otras sustancias hidrófobas (Thormar, 2011).

Los AE han sido descritos como el conjunto de metabolitos secundarios, biosintetizados en las cavidades de aductos, tricomas glandulares y osmóforos; estructuras presentes en diferentes partes de la planta desde las hojas hasta las raíces (Baptiste *et al.*, 2020), que si bien están involucrados en la inhibición o retraso del crecimiento de patógenos o repelencia de insectos que puedan afectara las plantas (Chauhan *et al.*, 2017), no son sintetizados en todas las plantas (Ashrafi *et al.*, 2017), habiéndose demostrado que su composición es dependiente del método de extracción, de las condiciones climáticas, estacionales y geográficas de cultivo y cosecha (Baydar *et al.*, 2004, Ashrafi *et al.*, 2017).

La composición química de los AE puede contener entre 20 y 60, hasta más de 100 componentes (Thormar, 2011) de los cuales dos o tres son sus componentes principales, presentes en concentraciones altas, mientras que los demás componentes están presentes en cantidades traza (Bakkali *et al.*, 2008). Los componentes de los AE pueden clasificarse en dos grupos,

uno de terpenos y otro de componentes aromáticos y alifáticos (Tariq *et al.*, 2019. Bakkali *et al.*, 2008). Los terpenos o isoprenos, también conocidos como terpenoides cuando contienen oxígeno (Bakkali *et al.*, 2008), son el grupo más grande de compuestos naturales (Thormar, 2011), que se definen a su vez, según su número de unidades de isopreno (Baser *et al.*, 2020), cabe señalar hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos cuando contienen 1, 2, 3 y 4 unidades de isopreno, respectivamente (Thormar, 2011).

Los AE están compuestos principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos (Chamorro *et al.* 2012) y sus derivados oxigenados (Thormar, 2011). Desde el enfoque de evaluación de actividad antimicrobiana, autores como Thormar (2011) proponen agrupar los componentes según sus grupos funcionales, entre los que se mencionan: Carburos, alcoholes, aldehídos, cetona, ésteres, éteres y fenoles (Aziz *et al.* 2018, Bakkali *et al.* 2008). Dentro de los principales grupos de fitoquímicos que poseen propiedades antimicrobianas se menciona a los terpenoides (Ginovyan *et al.*, 2017).

El mecanismo de acción de los AE contra bacterias puede estar dado por su efecto sobre el perfil de ácidos grasos de la membrana celular, acción sobre las proteínas, efecto sobre ATP y ATPasas, efecto sobre el metaboloma, efectos sobre la morfología celular, alteración de la permeabilidad, actividad de detección anti-quórum, entre otros (Nazzaro *et al.*, 2013).

Estudios previos han determinado la actividad bactericida *In vitro* de diversos AE frente a patógenos comunes en acuicultura como bacterias

del género *Aeromonas* (Starliper *et al.*, 2015). En Turquía, se determinó el efecto bactericida de los AE de tomillo y melissa contra *A. hydrophila* (Ekici *et al.*, 2011). Görmez *et al.* (2017), reportaron el efecto antibacteriano de los AE de orégano y ajeno contra *A. hydrophila* y *Y. ruckeri*. A su vez, Yildirim *et al.* (2018), demostraron el efecto antibacteriano de veinticuatro plantas procedentes de herbolarios turcos contra *A. hydrophila* y *A. salmonicida*.

### **3.5. Metodologías de evaluación de la actividad antimicrobiana de los AE**

Con respecto a la metodología de estudio del efecto antibacteriano de los AE se emplean diferentes pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Condò *et al.*, 2018), de las cuales las comúnmente utilizadas, por su factibilidad y bajo costo, son la prueba de difusión en disco o en pozo y dilución en caldo o en agar (Lalitha, 2017). Otros métodos, como citofluorometría de flujo y bioluminiscencia son más rápidos y permiten mejor comprensión del impacto en la viabilidad y el daño celular infligido al microorganismo probado, sin embargo, requieren equipamiento de alto valor económico y presentan dificultades en su estandarización (Balouiori *et al.*, 2016).

Los ensayos para la evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas pueden ser clasificados como métodos de difusión, dilución y bioautográficos (Valgas *et al.*, 2007). Por un lado, los métodos de difusión y bioautográficos, entre los que se incluyen difusión en disco, difusión en pozo de agar, técnica de alimentos tóxicos (Das *et al.*, 2010), son pruebas cualitativas que evalúan el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento

de los microorganismos y normalmente se utilizan como una comprobación preliminar para seleccionar la eficiencia de varios aceites esenciales (Prabuseenivasan *et al.*, 2016).

El método de difusión en pozo de agar se usa ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas (Balouiori, *et al.*, 2016). Esta técnica es más sensible que el método de difusión en disco y aunque presenta sensibilidad similar a las técnicas como las bioautográficas, proporciona condiciones más adecuadas para el crecimiento microbiano (Valgas *et al.*, 2007). Autores como Öntaş *et al.* (2016), Ekici *et al.* (2011) y Rojas *et al.* (2003) realizaron estudios de susceptibilidad de aislados bacteriano de peces frente a aceites esenciales empleando el método de difusión en pozo de agar, mientras que otros, como Adel *et al.* (2016), Park *et al.* (2016), Görmez *et al.* (2017) y Yildirim *et al.* (2018) optaron por el método de difusión en disco.

Por otro lado, los métodos de dilución, como: dilución de agar, microdilución en caldo y macrodilución en caldo (Das *et al.*, 2010), permiten determinar cuantitativamente la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un AE. El resultado del ensayo se cuantifica en términos de concentración de AE (Thormar, 2011) analizado en el agar (dilución de agar) o medio de caldo (macrodilución o microdilución) (Chouhan *et al.*, 2017). Por lo cual, al ser un método más preciso, autores como Thirugnanasampandan *et al.* (2015), Bandeira *et al.* (2017) y Majolo *et al.* (2016), trabajaron evaluando la susceptibilidad de *A. hydrophila* bajo este método.

Cabe mencionar que algunos investigadores emplean más de un método para evaluar la efectividad de los aceites esenciales. En Francia, Snoussi *et al.* (2016) estudiaron el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de laurel, eneldo y jengibre contra varias cepas bacterianas aisladas de peces y mariscos a través del método de difusión en disco y microdilución en caldo. Así mismo, en EE.UU. Starliper *et al.* (2015) evaluaron la actividad bactericida de doce aceites esenciales derivados de plantas contra sesenta y nueve aislados de *Aeromonas* spp., mediante el ensayo de difusión en disco y la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

### **3.6. *Minthostachys mollis***

En el Perú, la medicina tradicional sugiere una gama de plantas nativas con efectos antimicrobianos. *Minthostachys mollis*, planta aromática que crece en diferentes países sudamericanos, se usa empíricamente en tratamiento de enfermedades respiratorias y digestivas. El efecto antimicrobiano del AE de “ruyaq muña” ha sido demostrado frente a patógenos que afectan a humanos como *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* (Carhuapoma *et al.*, 2009). Mientras que, estudios en Venezuela determinaron su efecto frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, atribuyéndole su efectividad a dos de sus principales componentes: pulegone (55.2%) y transmenthone (31.5%) (Mora *et al.*, 2009).

### 3.7. *Schinus molle*

*Schinus molle* L., comúnmente conocida como pimienta rosa (Martins *et al.*, 2014) o molle es una especie arbórea originaria de Perú (Do Prado *et al.*, 2018), que habitualmente se ha empleado como antibacteriano, antiviral, antiséptico tópico, antifúngico, antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, antiespasmódico y analgésico (Feuereisen *et al.*, 2017). Martins *et al.* (2014) estudiaron entre otras propiedades, la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *S. molle* L. mediante el método de difusión en disco de agar y el ensayo de CMI frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

### 3.8. *Citrus aurantifolia*

Los citrus, aunque nativos de Asia, pertenecen a un género de plantas cuyos AE han sido catalogados como promisorios para el control bacteriano de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*, (Torrenegra *et al.*, 2017; Dosoky *et al.*, 2018), *Mycobacterium tuberculosis* y varias especies de hongos (Lee *et al.*, 2018). Öntaş *et al.* (2016), determinaron la actividad bactericida del AE de la cáscara de limón (*Citrus limon* L.) contra *A. hydrophila*. y otros cinco patógenos de peces, mediante métodos de microdilución y difusión.

Lemes *et al.* (2018) estudiaron el efecto antibacteriano del AE del *Citrus aurantifolia* contra bacterias del género *Streptococcus* y *Lactobacillus*, a través de la determinación de la CMI por el método de microdilución en caldo en microplacas de 96 pocillos. Así mismo, Lee *et al.* (2018) determinaron el efecto antimicrobiano *In vitro* de *C. aurantifolia*

sobre cepas antibiótico-resistentes de *H. pylori*.

Si bien se ha demostrado la efectividad antimicrobiana de AE de diferentes especies de plantas es importante mencionar que, su composición química puede variar según factores como el origen geográfico y características genéticas de la planta (Faleiro *et al.*, 2003), condiciones climáticas y estacionales del cultivo, período de cosecha, condiciones de almacenamiento y técnica de destilación del aceite (Runyoro *et al.*, 2010).

Al respecto, Gamarra *et al.* (2006) mencionan que la calidad el AE de limón depende tanto del quimiotipo y biotipo de la planta, como de las condiciones climáticas y el proceso de extracción. A su vez, Pauer *et al.* (2019) determinaron en su estudio, una alta variabilidad en la proporción de metabolitos secundarios, alcaloides y fenoles en muestras de rama florida de muña procedente de diferentes mercados populares de Lima – Perú. Por otro lado, Hosni *et al.* (2011) evaluaron los cambios en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de molle según la influencia de la maduración de la planta evidenciando mayor eficiencia de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *S. typhimurium* y *E. coli* en plantas en etapa intermedia.



#### IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Si bien en el país la truchicultura es la principal actividad acuícola de origen continental, las deficiencias sanitarias en el manejo de los cultivos generan una constante presentación de brotes de enfermedades infecciosas en los peces provocando así altas pérdidas económicas a los acuicultores (Montesinos, 2018). Esta situación podría ser una de las limitantes para que la actividad se desarrolle a mayor escala, poniendo en riesgo no sólo a la actividad como tal, sino también a los consumidores, debido a que representa una importante fuente de proteína para la alimentación de muchas personas.

Dentro los agentes infecciosos que afectan frecuentemente a las truchas, y salmónidos en general, se encuentran diferentes especies bacterianas del género *Aeromonas* (Zepeda *et al.*, 2017). El control de estas bacterias se ha visto limitado debido a que se ha reportado su capacidad de generar diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Kim *et al.*, 2013); además, en Perú, al menos cuatro de las principales regiones productoras de trucha presentan bacterias con patrones de resistencia múltiple frente a antibióticos como oxitetraciclina, amoxicilina y ácido oxolínico (Hurtado, 2019).

En base a esta problemática, se vienen desarrollando investigaciones que han determinado que recursos como los aceites esenciales de plantas presentan actividad antimicrobiana frente a patógenos multi-drogo resistentes que afectan a humanos y animales (Quendera *et al.*, 2018; Carhuapoma *et al.*, 2009). En este contexto, esta línea de investigación

puede ser aprovechada en el Perú pues se cuenta con una amplia variedad de plantas que ancestralmente han sido usadas contra diferentes microorganismos.

Cabe señalar que, una característica de estos compuestos naturales es la variación que pueden tener en su composición química, según diversos factores como: la procedencia de las plantas, forma de cultivo, de extracción de los aceites, etc. Por lo cual, se ha planteado el estudio de tres aceites esenciales de plantas cultivadas y procesadas el país (limón sutil - *Citrus aurantifolia*), resaltando que dos de ellas son plantas nativas del Perú: muña (*Minthostachys mollis*) y molle (*Shinus molle*). Sabiendo que los aceites esenciales de plantas poseen al menos algún grado de actividad antibacteriana, que los compuestos en estudio son sustancias comercialmente puras y que la eficacia de su uso está directamente relacionada con la concentración a la que inhiben el crecimiento o matan las bacterias *In Vitro* (Thormar H, 2011), su evaluación se realizará a dosis de 5, 10 y 15%.

En la presente investigación se ha planteado el estudio de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) evaluando su composición y efecto antimicrobiano frente a diferentes cepas de *Aeromonas spp.*, uno de los agentes patógenos más frecuentes en acuicultura. Los resultados obtenidos tras el estudio *In Vitro* de los aceites esenciales de muña, molle y limón sutil, permitirá obtener información requerida para plantear futuros estudios en organismos vivos.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a aislados patogénicos de *Aeromonas spp.* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición química y pureza de los aceites esenciales comerciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) empleados en el estudio.
- Confirmar molecularmente el género bacteriano de cepas patogénicas aisladas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en Perú.
- Determinar, mediante la técnica de difusión en agar, el efecto antimicrobiano los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) o limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a aislados de *Aeromonas spp.* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú.
- Determinar, mediante la técnica de dilución en caldo, la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del aceite esencial con mayor efecto antibacteriano frente a los aislados de *Aeromonas spp.* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú.

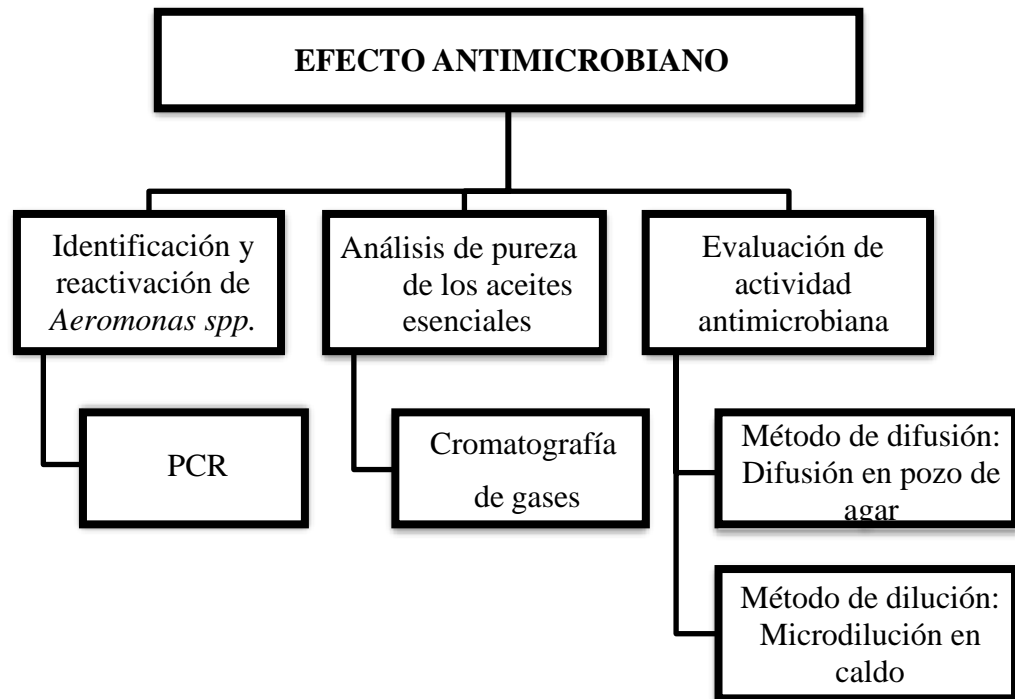
## VI. METODOLOGÍA

La presente investigación fue un estudio experimental que planteó evaluarla eficacia antimicrobiana *In Vitro* de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a aislados patogénicos de *Aeromonas spp.* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú. Para lograr este objetivo, primero se identificó molecularmente las cepas del género *Aeromonas spp.* Después se evaluó, por cromatografía de gases, la composición química de los tres aceites esenciales de plantas con potencial antimicrobiano.

Se continuó con la evaluación de los tres aceites esenciales mediante la técnica de difusión en pozo de agar para establecer cualitativamente el aceite esencial con mayor efecto antibacteriano. En este primer ensayo los aceites esenciales fueron analizados a tres concentraciones diferentes, comparando sus halos de inhibición de crecimiento bacteriano frente los aislados de *Aeromonas spp.* para la determinación de la concentración más efectiva.

Luego de seleccionar el aceite esencial con la concentración de mayor inhibición de crecimiento, se procedió a la segunda fase, donde se evaluó cuantitativamente la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial seleccionado. Este ensayo se realizó mediante la prueba de microdilución en caldo, teniendo en cuenta controles positivo, negativo y como control de calidad el tratamiento estándar para *A.*

*salmonicida*, Florfenicol (Calvez *et al.*, 2014).



**Gráfico 1.** Diseño del estudio

### 6.1. Lugar de estudio

La evaluación de la susceptibilidad de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a cepas patogénicas de *Aeromonas spp.* se realizó en el laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ-UPCH).

Las cepas de *Aeromonas spp.* pertenecieron al Cepario del Laboratorio de Parasitología Animal FAVEZ-UPCH. Los aislados se procesaron en el mismo laboratorio, caracterizándose bioquímica y molecularmente por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante amplificación del gen ARNr 16S.

## **6.2. Tipo de estudio**

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental.

## **6.3. Criterios de inclusión y exclusión**

*Criterios de inclusión:* Sólo se incluyeron aislados de *Aeromonas spp.* identificados tanto bioquímicamente como molecularmente por PCR. Las muestras procedieron de truchas arcoíris con signos clínicos de furunculosis, cultivadas en las regiones Ancash, Cajamarca, Junín y Puno.

*Criterios de exclusión:* Se excluyeron aislados de *Aeromonas spp.* ambientales o procedentes de otras especies.

## **6.4. Tamaño de muestra**

En la presente investigación se trabajó con la totalidad de población objetivo, constituida por 28 cepas patogénicas de *Aeromonas spp.* aisladas de truchas arcoíris, con signos clínicos compatibles con furunculosis, durante el 2017 y 2018, de las cuales sólo se logró confirmar 26 aislados, omitiendo dos cepas por resultar contaminadas; y adicionalmente se incluyeron en el estudio 8 cepas patogénicas aisladas en el año 2018, todas pertenecientes al Cepario del Laboratorio de Parasitología Animal FAVEZ-UPCH. El conjunto de aislados (34 cepas) fue enfrentado a tres aceites esenciales comerciales de: muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*).

## **6.5. Recolección y procesamiento de datos**

### **6.5.1. Aceites esenciales**

Se emplearon aceites esenciales comerciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*). Los aceites de *Minthostachys mollis* y *Shinus molle* fueron comprados en la empresa Essential Oils Peru SAC, cuyo fin comercial es aromaterapia. Los AE empleados fueron producidos en el año 2019, procediendo de plantas de molle y muña cultivadas en la provincia de Cajamarca. El proceso de destilación se realizó en la ciudad de Piura, en una planta propia de empresa Essential Oils Peru SAC. El aceite esencial de muña fue extraído de las hojas, mientras que, el aceite esencial de molle se extrajo del fruto (rojo).

El aceite esencial de *Citrus aurantifolia* fue brindado por la empresa Limones Piuranos SAC. El destilado de Aceite esencial de limón es destinado a la industria de alimentos, bebidas y cosmética, principalmente en la elaboración de extractos para bebidas carbonatada. Las plantas de limón fueron cultivadas en la región Piura, y el proceso de extracción (destilado) se realizó en la misma región. El aceite esencial de limón fue extraído del fruto y producido en el año 2019.

Cada uno de los aceites esenciales fue evaluado a tres dosis: 5, 10 y 15% v/v. Estas concentraciones fueron determinadas tras un estudio piloto, realizado por el tesista en el laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana

Cayetano Heredia (FAVEZ-UPCH), donde se sometieron diferentes concentraciones (5 a 90%) de los aceites esenciales frente a cepas a la cepa referencia de *Aeromonas spp.* La dilución de los aceites se realizó con etanol al 96% (Bandeira *et al.*, 2017).

### **6.5.2. Gas Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG - MS) de aceites esenciales**

Los aceites esenciales evaluados en la presente investigación fueron sometidos a un estudio de CG – MS para determinación de la composición química (Majolo *et al.*, 2016). El análisis fue realizado en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Brevemente, los análisis de cromatografía de gases se realizaron mediante un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C. Se utilizó una columna J&W 122- 1545.67659 DB-5ms, 325 °C (60 m x 250 µm x 0.25 µm). Se empleó Gas portador Helio (1 ml/min).

Las condiciones de operación fueron las siguientes: Para el AE muña la rampa de temperatura empezó en 40 °C y subió a 5 °C/min hasta 180 °C; 2.5°C/min hasta 200 °C por 2 min y finalmente 10 °C/min hasta 240 °C; con un tiempo de corrida de 42 minutos. Para el AE limón la rampa de temperatura empezó con 40 °C y subió a 5 °C/min hasta 155 °C; 2.5 °C/min hasta 170 °C por 10 min y finalmente 10 °C/min hasta 240 °C, con un tiempo de corrida de 46 minutos. Para el AE molle la rampa de temperatura empezó



en 60 °C y subió a 2 °C/min hasta 130 °C; 2.5 °C/min hasta 180 °C y finalmente 20 °C/min hasta 240°C; con un tiempo de corrida de 58 minutos.

### **6.5.3. Cepas bacterianas: reactivación y aislamiento**

Las cepas bacterianas incluidas en el presente estudio fueron crioconservadas a -80°C en el cepario del laboratorio de parasitología FAVEZ-UPCH. Brevemente, las cepas fueron reactivadas en medio BHI (Caldo Infusión Cerebro Corazón) e incubadas a 22 °C por 24 – 48 horas. Posteriormente, del caldo se sembró en medio TSA (Agar de Soja Trípico) e incubó según lo antes mencionado (Hayatgheib *et al.*, 2020). De las colonias aisladas se realizaron las pruebas primarias de identificación bacteriana como crecimiento en agar GSP (Glutamate Starch Phenol Red Agar), tinción Gram, prueba oxidasa y catalasa (Gonçalves *et al.*, 2019).

Las cepas procedieron de truchas arcoíris con signos clínicos compatibles con furunculosis (abscesos laterales, melanosis y/o nado errático), de centros acuícolas de las regiones Junín (provincia de Chupaca), Cajamarca, Ancash y Puno, donde se capturaron juveniles (18 cm de longitud en promedio) y adultos (29 cm de longitud, en promedio) de diferentes estanques. Las cepas fueron aisladas durante los años 2017 y 2018, confirmándose molecularmente en los años 2018 y 2019.

Las cepas incluidas en el presente estudio presentaron resistencia fenotípica a amoxicilina, ácido oxolínico y oxitetraciclina, fenotipo multidrogo-resistente detectado por Hurtado, CL (2019), constituyendo un riesgo latente en para el sector truchícola nacional.

#### **6.5.4. Extracción de ADN para identificación molecular**

A partir de los cultivos bacterianos identificados, se seleccionó una colonia de cada aislado para la extracción de ADN. Se utilizó el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega-USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La evaluación de la concentración y pureza del ADN genómico se realizó con el equipo Nanodrop (Thermo Scientific, USA). La concentración del ADN se determinó tras la lectura de una absorbancia de 260 nm, donde la densidad óptica de 1 corresponde a 50 µg/ul de ADN de doble cadena. Mientras que la pureza se estimó según la proporción de la absorbancia a 260/280 nm (longitud de onda en que se realiza la lectura de proteínas), aceptando valores mayores o iguales a 1.8 (Suárez *et al.*, 2018).

#### **6.5.5. Identificación molecular de *Aeromonas spp.* por PCR**

De acuerdo con Hoie *et al.* (1997), la amplificación de una región conservada de 271 bp del gen ARNr 16S se realizó empleando los cebadores AS1(5'-GGCCTTTCGCGATTGGATGA-3') y AS2 (5' TCACAGTTGACACGTATTAGGCGC-3'). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó bajo un volumen final de 20 µL (2X del buffer PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix, 0.5 U Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.4 pmol de cada cebador y 50 ng ADN molde), con ciclos de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 50 °C por 1 min y extensión 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 10 min. Como controles positivo y negativo

se emplearon las cepas de *A. salmonicida* ATCC® 33658 y *E. coli* ATCC® 25865, respectivamente. La lectura de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis (80 V/cm por 60 min) en gel de agarosa (Calbiochem, Alemania) al 1% en buffer TAE 1X, empleando el marcador de peso molecular DNA 100 bp Ladder (Invitrogen, Brasil). A continuación, se tiñó el gel en una solución (0.5 µg/mL) de bromuro de etidio (Merck Millipore, Alemania) por 20 minutos. Luego de lavar el gel (agua destilada por 5 minutos) se realizó la observación de bandas en el transiluminador de luz UV (DNR Bio-Imaging Systems, USA).

#### **6.5.6. Evaluación In vitro del efecto antimicrobiano de aceites esenciales.**

La técnica de difusión en pozo de agar se realizó para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de muña, molle y limón sutil frente a cepas patogénicas de *Aeromonas spp.* Los resultados obtenidos a partir de esta prueba permitieron seleccionar el aceite esencial más eficiente. El paso siguiente fue realizar la técnica de microdilución en caldo, cuyos resultados permitieron obtener cuantitativamente valores de CMI y CMB del aceite esencial más eficiente.

##### **Método de difusión en pozo de agar**

Tras la reactivación y aislamiento de las cepas de *Aeromonas spp.* se procedió a preparar el inóculo bacteriano siguiendo las indicaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2006). Brevemente, se suspendieron tres a cuatro colonias del agar TSA en solución salina estéril (NaCl 0.85%). La densidad óptica del inóculo fue ajustada a 0.5 en escala

de Mc Farland ( $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ) a través de lecturas en espectrofotómetro (OD= 625 nm) entre 0.08 a 0.13.

Esta variante de las técnicas de difusión fue desarrollada en base a lo descrito por Tukmechi *et al.* (2010). La suspensión bacteriana antes descrita fue inoculada, con hisopos estériles, en placas Petri con agar Mueller-Hinton (Liofilchem, Italia), preparado según las instrucciones del fabricante. Dentro de los 15 minutos posteriores, el agar fue perforado (con un sacabocado estéril) en 5 pocillos de 6 mm y se llenaron con 50  $\mu\text{l}$  de cada aceite esencial a concentraciones de 5, 10 y 15% v/v. Posterior a una incubación de 22°C por 24h se procedió a dar lectura de las placas. Los halos de inhibición fueron medidos en milímetros con ayuda de un vernier calibrado.

Las pruebas se realizaron por triplicado, teniendo como control positivo florfenicol 30  $\mu\text{g}$  (50  $\mu\text{L}$ ) y como control negativo etanol al 96% (Bansemir *et al.*, 2006). Como criterios de interpretación se siguió la clasificación de zonas de inhibición de Bansemir *et al.* (2006), donde las zonas de inhibición mayores a 15mm clasificaban como actividad fuerte, de 8 a 15 mm: actividad moderada y de 1 a 8 mm: actividad débil. El control de calidad de la prueba fue realizado con la inclusión de la cepa control *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC®33658; NCIMB 1102.

### **Método de microdilución en caldo**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial seleccionado en el procedimiento anterior, fue

determinada mediante el método de microdilución en caldo siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) y la metodología descrita por Eloff *et al.* (1998). El inóculo bacteriano fue preparado en solución salina estéril (NaCl 0.85%) a partir de tres a cuatro colonias de cada una de las cepas de *Aeromonas spp.* cultivadas en agar TSA (Liofilchem, USA) ( $1 \times 10^8$  CFU/mL - 0.08 a 0.13 OD 625nm) diluidas hasta una concentración equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. El aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*), elegido tras la realización del ensayo anterior, fue diluido en etanol al 96% a razón de 5% v/v.

Brevemente, en placas estériles de 96 pozos con fondo redondo se agregaron 50  $\mu$ L de inóculo bacteriano a cada pocillo que contenía 50  $\mu$ L del aceite esencial diluido en caldo Müeller-Hinton (Liofilchem, Italia). Inmediatamente después las placas fueron incubadas a 22°C durante 24h. El procedimiento se realizó por duplicado e incluyó controles positivo y negativo (caldo más inóculo y caldo solo, respectivamente) y como control de calidad se incluyó el tratamiento estándar contra *A. salmonicida* (florfenicol 0.03-16  $\mu$ g/mL).

Tras la incubación, a cada pocillo se le añadió 40  $\mu$ L de solución de sales de violeta de p-iodonitrotetrazolio (Sigma®) y se incubó a 22°C por 30 minutos. La concentración más baja de los aceites esenciales que se mostró incolora fue definida como la Concentración Mínima Inhibitoria (Eloff, 1998). La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se determinó mediante la reinoculación de 10  $\mu$ L de cada cultivo bacteriano en agar TSA

(22°C - 24h) y la concentración más baja de los aceites esenciales que no presentó crecimiento fue definida como la CMB.

El control de calidad de ambas pruebas fue realizado con la inclusión de la cepa control *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658; NCIMB 1102 (CLSI, 2006).

#### **6.6. Plan de análisis de datos**

La información obtenida en este estudio fue recopilada en un documento Excel y luego procesada estadísticamente con el software STATA 14®, todos los análisis usaron un nivel de significancia de 0.05. Los halos de inhibición de crecimiento en milímetros en las 3 diferentes concentraciones para cada aceite esencial frente a las cepas de *Aeromonas* spp y su eficacia fueron evaluados mediante la prueba de ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Bonferroni.

Luego de realizar la prueba de difusión en pozo y seleccionar el aceite esencial con mayor efecto antibacteriano, se realizó la evaluación de la concentración mínima bactericida y concentración mínima inhibitoria de este. Para esta segunda prueba, se empleó método de microdilución en caldo, enfrentando las 34 cepas de *Aeromonas spp.* al AE seleccionado, antibiótico florfenicol y un grupo control (etanol). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Bonferroni.

Cuando las observaciones no siguieron la distribución normal, se

procedió a usar la prueba de Kruskal Wallis con la prueba post hoc de Dunn.

La distribución normal fue evaluada con la prueba de Shapiro Wilk.

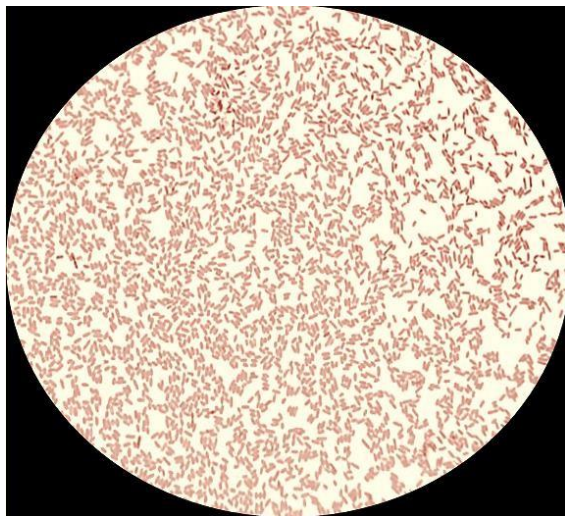
#### **6.7. Consideraciones éticas**

El presente trabajo fue evaluado por el comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con código de registro 2003030.

## VII. RESULTADOS

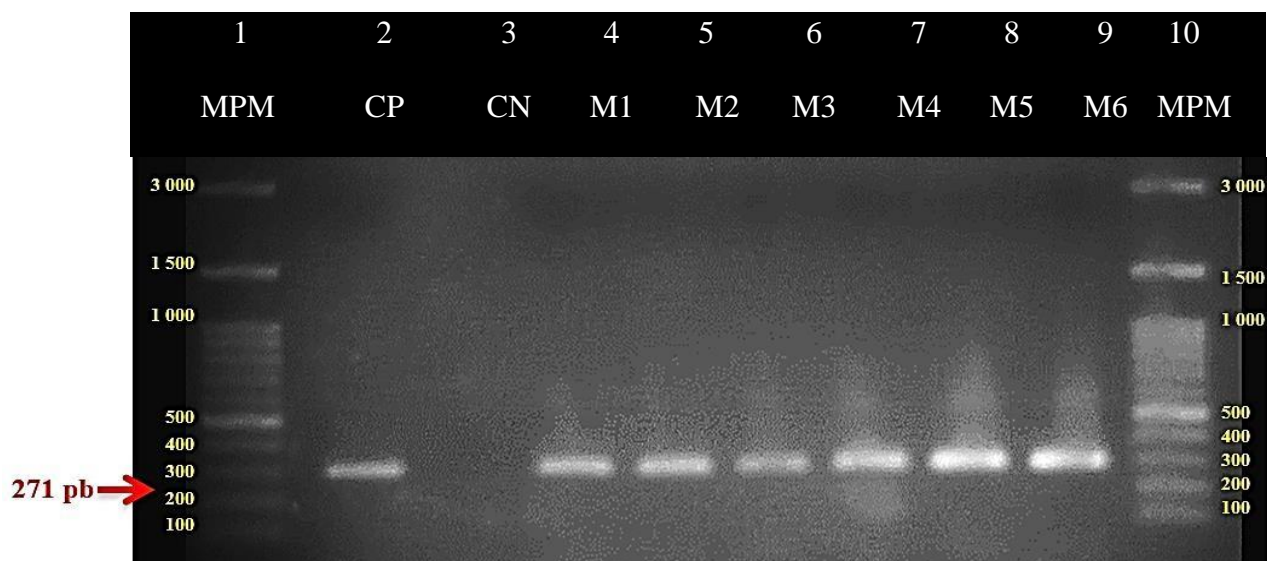
### 7.1. Identificación de las cepas de *Aeromonas spp.*

Tras la reactivación de las 34 cepas de *Aeromonas spp.*, los aislados fueron confirmados mediante pruebas preliminares como oxidasa, catalasa y Gram, observándose microscópicamente bacilos Gram negativos (Figura 1), oxidasa y catalasa negativos. Molecularmente las cepas de *Aeromonas spp.* fueron confirmadas bajo la técnica de PCR, observándose amplificación de un fragmento de ADN de 271 pb. (Figura 2).



**Figura 1.** Caracterización de cepas de *Aeromonas spp.* Bacilos Gram negativos vistos al microscopio tras ser teñidos con la tinción de Gram.





**Figura 2.** Identificación molecular de *Aeromonas spp.* por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) a través de la amplificación del gen ARNr 16S. Se observa un amplicones de tamaño 271pb. Carril 1 y 10: marcador de peso molecular (MPM); Carril 2: control positivo (CP) *A. salmonicida* ATCC® 33658; Carril 3: control negativo (CN) *E. coli* ATCC® 29473; Carril 4-9: muestras analizadas (M1 – M6).

## 7.2. Análisis GC de componentes de aceites esenciales.

La composición química de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) fue determinada por el estudio de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El nombre de los compuestos identificados, así como su tiempo-o de retención y su porcentaje en la muestra son listados en las tablas N° 1, 2 y 3. Cabe mencionar que, individualmente, se identificaron 43 compuestos en la composición química del AE de muña, 21 compuestos en el AE de molle y 34 compuestos en el AE de limón sutil.

**Tabla 1.** Composición total del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña”. Se describen entre sus principales constituyentes: Isomentona, Pulegona y Acetato de carvacrol. tR: Tiempo de retención.

Nombre del compuesto (NIST08.L)	tR(min)	Porcentaje en la muestra
Isomentona	20.49	25.75
Pulegona	22.96	19.6
Acetato de carvacrol	26.26	9.12
<i>o</i> -Cimeno	16.19	5.37
Carvacrol	24.41	4.79
<i>trans</i> -Dihidrocarvona	21.68	3.36
Carvona	23.05	3.25
Acetato de 3,7-dimetil-2,6-Octadien-1-ol	26.46	3.06
Óxido de cariofileno	32.6	2.88
Piperitenona	25.78	2.1
Acetato de Timol	25.69	2.03
Timol	24.12	1.86
$\beta$ -Linalool	18.44	1.49
Piperitona	23.36	1.47
Isopulegona	21	1.44
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	22.29	1.39
D-Limoneno	16.34	1.37
<i>p</i> -Mentan-3-ona	20.71	1.34
Spatulenol	32.37	1.34
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> )	26.06	0.59
$\beta$ -Pino	14.74	0.47
$\alpha$ -Cital	23.52	0.45
$\beta$ -Cariofileno	28.06	0.45
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	21.89	0.42
$\alpha$ -Terpineol	21.57	0.39

Desconocido (C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> )	24.25	0.38
Humuleno-1,2-epóxido	33.38	0.37
3-Octanol	15.1	0.35
β-Bisaboleno	30.12	0.33
Óxido de piperitona	23.3	0.31
β-Mirceno	14.88	0.3
Terpinen-4-ol	21.16	0.23
α-Pineno	13.26	0.22
α-Copaeno	26.8	0.22
Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	27.07	0.22
Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	28.56	0.22
β-Citral	22.75	0.2
α-Tuyeno	12.95	0.19
β-Cadineno	30.51	0.19
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> )	18.91	0.17
α-Cariofileno	29.01	0.14
Sabineno	14.51	0.1
Mentofurano	20.64	0.08
β-Pineno	14.74	0.47
α-Citral	23.52	0.45
β-Cariofileno	28.06	0.45
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	21.89	0.42
α-Terpineol	21.57	0.39
Desconocido (C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> )	24.25	0.38

tR: Tiempo de retención

**Tabla 2.** Composición total del aceite esencial de *Shinus molle*

“Molle”. Se describen entre sus principales constituyentes:  $\beta$ -

Mirceno,  $\alpha$ -Felandreno y D-Limoneno.

Nombre del compuesto (NIST08.L)	tR(min)	Porcentaje en la muestra
$\beta$ -Mirceno	16.54	28.3
$\alpha$ -Felandreno	17.7	19.77
D-Limoneno	19.08	12.45
$\beta$ -Cimeno	18.76	10.55
$\alpha$ -Pino	13.62	8.4
$\beta$ -Felandreno	19.23	8.38
$\beta$ -Pino	16.07	7.08
$\beta$ -Cariofileno	44.51	1.01
Camfeno	14.53	0.98
$\alpha$ -Gurjuneno	43.74	0.5
Metil éster del ácido octanoico	24.89	0.35
Sabineno	15.67	0.32
$\alpha$ -Tuyeno	13.09	0.31
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> )	38.37	0.27
Isomentona	27.39	0.25
$\beta$ -Elemeno	42.61	0.25
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	30.61	0.2
$\alpha$ -Terpineno	18.24	0.18
Pulegona	32.98	0.17
$\gamma$ -Terpineno	20.79	0.14
Copaeno	41.86	0.14

tR: Tiempo de retención

**Tabla 3.** Composición total del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* “limón sutil”. Se describen entre sus principales constituyentes: D-Limoneno y  $\gamma$ -Terpineno.

Nombre del compuesto (NIST08.L)	tR(min)	% en la muestra
D-Limoneno	16.39	41.81
$\gamma$ -Terpineno	17.25	9.81
$\alpha$ -Terpineol	21.58	7.35
Terpinoleno	18.13	6.98
$\beta$ -Cimeno	16.19	6
$\beta$ -Pino	14.75	5.42
Isocineol	15.85	2.22
Eucaliptol	16.51	1.77
$\alpha$ -Terpineno	15.93	1.76
$\beta$ -Bisaboleno	31.44	1.7
$\alpha$ -Pino	13.26	1.49
$\gamma$ -Terpineol	21.69	1.33
1-Terpinenol	19.7	1.17
$\beta$ -Mirceno	14.89	1.1
$\alpha$ -Bergamoteno	28.81	1.08
4-Terpineol	21.16	1.07
Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	31.1	1.05
$\beta$ -Cariofileno	28.65	0.79
Fenchol	19.28	0.74
$\beta$ -Terpineol	20.14	0.7
$\beta$ -cis-Ocimeno	16.72	0.67

Camfeno	13.85	0.48
<i>trans</i> -Borneol	20.96	0.46
Terpinen-4-ol	21.27	0.45
Pseudolimoneno	16.47	0.42
<i>p</i> -Cimeno	18.27	0.33
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	14.38	0.29
Cadineno	30.85	0.29
Sabineno	14.51	0.26
$\alpha$ -Felandreno	15.6	0.23
Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	20.71	0.23
$\alpha$ -Fencheno	13.77	0.19
$\beta$ -Linalool	18.43	0.19
Citral	23.53	0.17

tR: Tiempo de retención

### **7.3.Evaluación In vitro del efecto antimicrobiano de aceites esenciales**

#### **7.3.1. Método de difusión en pozo de agar**

A través del método de difusión en pozo de agar se determinó cualitativamente el efecto antibacteriano de los aceites de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a las cepas de *Aeromonas spp.* Los datos obtenidos fueron agrupados en tres categorías según el porcentaje de concentración de cada aceite esencial con el fin de evaluar si los grupos presentaban diferencia significativa entre sí.

Primero se aplicó el test de normalidad a cada grupo, mediante la prueba de Shapiro Wilk (Tabla 4). Planteando la hipótesis nula que los grupos de tratamiento 5, 10, 15% presentaron datos con distribución normal, con un valor de probabilidad (p-valor) menor a 0.05. Determinando que los grupos de tratamiento (TC) 5% molle y TC 15% muña, molle y limón, sí seguían una distribución no normal, mientras que el grupo tratamiento TC 10% muña, molle y limón Y TC 5% muña y limón seguía una distribución normal.

**Tabla 4.** Análisis de normalidad de los halos de inhibición obtenidos tras la prueba de difusión en pozo de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) según grupo tratamiento: 5, 10, 15 % v/v frente a las cepas de *Aeromonas spp.* a las 24 horas, según la prueba Shapiro Wilk.

<b>GRUPO</b>	<b>AE Muña</b>	<b>AE Molle</b>	<b>AE Limón</b>
<b>TC05C</b>	0.09	0.02	0.09
<b>TC10C</b>	0.99	0.91	0.27
<b>TC15C</b>	0.03	0.03	0.01

AE: Aceite Esencial. TC05C: tratamiento 5%, TC10C: tratamiento 10%, TC15C:tratamiento 15%. Desv. Est: Desviación estándar.

Tras la prueba de normalidad, se desarrollaron pruebas paramétricas y no paramétricas para el respectivo análisis de diferencia entre las medias de cada grupo tratamiento. Para los grupos tratamiento 5% (TC05C) y 15% (TC15C) se realizó la prueba de Kruskal Wallis, mientras que para el grupo tratamiento 10%(TC10C), se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con test de Bonferroni. Resultando que entre cada grupo tratamiento sí existía diferencia significativa, por lo cual se procedió a la evaluación de las medias de cada grupotratamiento para seleccionar el mejor tratamiento.

Luego de confirmar que las medias de los halos de inhibición obtenidos eran significativamente diferentes entre sí, se procedió a la selección del aceite esencial con mayor efecto antibacteriano según la concentración evaluada para la realización del siguiente ensayo (Concentración mínima inhibitoria). En este casose eligió el aceite esencial



de muña, por presentar las medias más elevadas respecto a los otros dos aceites esenciales, tal como se observa en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) al 5, 10 y 15% v/v frente a las cepas de *Aeromonas spp.* a las 24 horas. Se observan la media del diámetro de los halos de inhibición (en milímetros) tras la prueba de difusión en pozo.

Aceite esencial	5%		10%		15%	
	Media	Desv. Est	Media	Desv. Est	Media	Desv. Est
<b>Muña</b>	12.931	0.946	14.765	0.718	16.466	0.840
<b>Molle</b>	9.245	0.856	10.559	0.827	11.593	0.856
<b>Limón</b>	10.608	0.750	11.819	0.729	13.093	0.893

Desv. Est: Desviación Estándar.

Por otro lado, la selección de la concentración con mejor actividad antibacteriana, según los resultados del método de difusión en pozo, se realizó categorizando la actividad antibacteriana en tres rangos según el diámetro del halo de inhibición producido por cada AE, en base a los criterios de interpretación descritos por Bansemir *et al.* (2006). Encontrando que, el AE de muña presentó actividad moderada (8 a 15 mm) en las concentraciones de 5 y 10% mientras que, bajo la concentración de 15% se observó actividad fuerte con diámetros de inhibición mayor a 15 mm.

A su vez, los resultados de la prueba de difusión para los AE de

molle y limón en sus concentraciones de 5, 10, y 15% fueron clasificados dentro del rango de actividad moderada, obteniendo halos de inhibición comprendidos entre 8 a 15mm de diámetro.

### **7.3.2. Método de microdilución en caldo**

Tras la evaluación del efecto antibacteriano de los AE de muña, molle y limón, según el método de difusión en pozo, se determinó que únicamente el AE de muña presentaba efecto antibacteriano fuerte (16.466  $\pm$ 0.840) frente a las cepas de *Aeromonas spp.* a una concentración de 15% v/v.

Estos resultados fueron empleados como punto de partida para el estudio de microdilución en caldo, para lo cual, se realizó un ensayo previo de microdilución en caldo empleando AE de muña al 5 y 10 % v/v a fin de evidenciar efecto antibacteriano frente a la cepa tipo *A. salmonicida* subsp *salmonicida* ATCC 33658. El ensayo reveló que a ambas concentraciones existía actividad inhibitoria, por lo cual se optó por evaluar la menor concentración (5% v/v) a fin de hacer más eficiente su uso.

Las 34 cepas de *Aeromonas spp.* en estudio mostraron diferentes niveles de susceptibilidad frente al aceite esencial de muña, a través del método de microdilución en caldo. Los valores de Concentración mínima inhibitoria (CMI) oscilaron entre concentraciones de 0.625 y 0.156% v/v (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de muña

(*Minthostachys mollis*) frente a las cepas de *Aeromonas spp.*

AE	N	CMI % (v/v)										
		5.00	2.50	1.250	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	0.020	0.010	0.005
MUÑA	34				18	4	12					

CMI: Concentración mínima inhibitoria, AE: Aceite esencial, N: número de cepas

Así mismo, se demostró que el aceite esencial de muña sí tiene actividad bactericida frente a las cepas de *Aeromonas spp.* El 47% de las cepas en estudio presentaron una concentración mínima bactericida a 0.625% v/v, mientras que, sólo el 15% de las cepas presenta susceptibilidad bactericida a una menor concentración (0.156% v/v). (Tabla 7)

**Tabla 7.** Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de muña

(*Minthostachys mollis*) frente a las cepas de *Aeromonas spp.*

AE	N	CMB % (v/v)										
		5.00	2.50	1.250	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	0.020	0.010	0.005
MUÑA	34				16	13	5					

CMB: Concentración mínima bactericida, AE: Aceite esencial, N: número de cepas

## VIII. DISCUSIÓN

Las bacterias del género *Aeromonas* conforman un grupo de patógenos frecuentes en el cultivo de trucha arcoíris, que acompañadas de un uso inadecuado de antibióticos predisponen a la aparición de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, generando un gran riesgo tanto en el campo acuícola como en la salud pública (Lim *et al.*, 2013). En los últimos años, los crecientes niveles de resistencia antimicrobiana por parte de *Aeromonas spp*, tanto patógenas como oportunistas, representan una real preocupación ya que, los determinantes de la resistencia a antibióticos pueden transmitirse a patógenos humanos a través del medio acuático o al tratarse de patógenos zoonóticos, potencialmente se reducirían las opciones terapéuticas para enfermedades humanas y animales (Piotrowska *et al.*, 2014). Autores como, Skwor *et al.*, (2019) afirman que la creciente resistencia a los antibióticos junto con la falta de desarrollo de nuevos antibióticos daría paso a una crisis de salud global.

*Aeromonas salmonicida*, patógeno importante de salmónidos, regularmente es combatido con terapia antibiótica, sin embargo, ya se han reportado brotes de furunculosis con aislamientos resistentes a uno o más tratamientos con antibióticos convencionales (ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfonamida, amoxicilina y florfenicol). Por lo cual, surge el interés en desarrollar alternativas al uso de antibióticos, particularmente sustancias antimicrobianas naturales y potenciadores inmunitarios (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2017).

Las plantas medicinales han sido utilizadas en el tratamiento de diversas enfermedades ancestralmente, notándose mayor atención a su uso frente a infecciones difíciles (Tasdelen *et al.*, 2009). Las sustancias derivadas de plantas además de la acción antimicrobiana directa presentan otros efectos benéficos a nivel del rendimiento animal, mejora de la palatabilidad y conservación del alimento, por su acción antioxidante (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2017). Notándose que, en las dos últimas décadas se ha venido investigando el uso de AE frente a patógenos que afectan a peces (Hayatgheib *et al.*, 2020).

Desde este enfoque, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de tres aceites esenciales, de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a cepas patogénicas de *Aeromonas spp.* Para ello, inicialmente se realizó el análisis de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con el fin de conocer la composición química de los aceites esenciales en estudio (García *et al.*, 2010).

La técnica GC-MS combina el alto poder de resolución de la cromatografía de gases para separar moléculas relacionadas estrechamente y la capacidad de la espectrometría de masas para proporcionar datos precisos para la identificación y cuantificación de los componentes presentes en cada aceite esencial (Honour, 2006).

Los principales componentes encontrados en el AE de muña en estudio coinciden con los encontrados en Ecuador por Malagón *et al.*

(2003), específicamente pulegona y carvacrol, excepto que el principal componente es mentona, en lugar de la isomentona. A su vez, Fuertes *et al.* (2001), si bien determinaron a pulegona y mentona como componente mayoritario del AE de muña procedente de tres regiones peruanas, no identificaron al Carvacrol como un componente principal. De la misma forma, en Venezuela Mora *et al.* (2009) determinaron que el componente primario del AE de muña fue la pulegona y en segundo lugar mentona. A su vez, en Junín – Perú, Cano *et al.* (2008), identificaron pulegona y mentona dentro de los principales componentes del AE de muña. En este contexto, Fournet *et al.* (1996) mencionan que los compuestos mentona, isomentona y pulegona, generalmente están presentes en el aceite de *Minthostachys andina*, aunque en diferentes proporciones. En contraste, Torrenegra *et al.* (2016) en su estudio realizado en Colombia, establecieron como compuesto primario del AE de muña el carvacrol con un porcentaje de abundancia relativa de 21.24 %.

Para el caso del AE de molle, sus principales componentes guardan similitud con los descritos por otros autores en estudios previos. Martins *et al.* (2014), encontraron  $\beta$ -mirceno, D-limoneno,  $\alpha$ -felandreno como los principales constituyentes del AE de molle procedente de Portugal. En Túnez, también se han identificado entre los componentes del AE de molle  $\beta$ -Mirceno,  $\alpha$ -Felandreno y D-Limoneno, no obstante, se evidenció su variación en porcentaje de la muestra según la temporada de cosecha (Hosni, *et al.*, 2011). En Turquía, si bien Deveci *et al.* (2010) identificaron  $\alpha$ -felandreno (6.94%), limoneno (2.98%) y mirceno (0.47%) estos no

correspondían a los componentes principales del AE de molle. Cabe mencionar que en el estudio de la composición química del AE de molle, la presencia de los monoterpenos es muy variable (De Mendonça *et al.*, 2012) tal es el caso de Do Prado *et al.* (2018), quienes identificaron como uno de los componentes dominantes del AE de molle procedente de Brasil al monoterpeno  $\beta$ -mirceno, sin embargo, no reportaron la presencia de  $\alpha$ -Felandreno o D-Limoneno.

La tercera sustancia en estudio fue el AE de limón, cuyo principal componente también ha sido encontrado por diferentes investigadores, quienes catalogaron al D-Limoneno como el monoterpeno más abundante en el AE de *C. aurantifolia*, seguido del  $\gamma$ -Terpineno (Gamarra *et al.*, 2009; Asnaashari *et al.*, 2010; Baba *et al.*, 2016; Lemes *et al.*, 2018; Adokoh *et al.*, 2019). El D-Limoneno es uno de los compuestos que contribuyen al alto aroma del aceite esencial de limón y su proporción en la composición de la muestra es equivalente al grado de madurez de la fruta (Gamarra *et al.*, 2009). Con respecto al  $\alpha$ -Terpineol, Spadaro *et al.* (2012) mencionan que su presencia en la muestra varía según el procedimiento de extracción, encontrándose generalmente en AE procesados industrialmente, como es el caso del AE de limón en estudio.

La disponibilidad de estos compuestos se ve directamente afectada por factores como las condiciones climáticas, estacionales y geográficas del lugar de cultivo (Condò *et al.*, 2018), edad (Torrenegra *et al.*, 2016) género y especie de las plantas (Baptiste *et al.*, 2020), período y hora de cosecha (Fournet *et al.*, 1996) así como la técnica de extracción y conservación de

los aceites esenciales (Pellegrini *et al.*, 2014).

Con respecto al estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de los aceites esenciales de plantas, la literatura refiere una gran variedad de técnicas (Valgas *etal.*, 2007; Das *et al.*, 2010; Prabuseenivasan *et al.*, 2016), los cuales están basados en métodos estándar aprobados por organizaciones como el Comité Nacional de Ciencias de Laboratorio Clínico (NCCCLS, por sus siglas en inglés) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés) (Das *et al.*, 2010). Estas pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se clasifican ampliamente en métodos de difusión y dilución (Das *et al.*, 2010). Particularmente los métodos de difusión incluyen la técnica de difusión en disco y la difusión en pozo.

En la presente investigación primero se realizó la evaluación del espectro de actividad antimicrobiana mediante el ensayo cualitativo de difusión en pozo de agar y posteriormente, se evaluó su efecto con más detalle mediante la prueba de dilución en caldo, ensayo cuantitativo que permitió determinar la Concentración mínima inhibitoria y la Concentración mínima bactericida. Al respecto, la presente investigación es la primera en aplicar las pruebas de difusión y dilución para la evaluación de la susceptibilidad de *Aeromonas spp.* frente a los aceites esenciales de muña, molle y limón en Perú.

La elección de la variante de difusión de pozo en agar, del método de difusión, se realizó en base al criterio de Rojas *et al* (2005), quienes



determinaron que la difusión en pozo de agar presentó mayor sensibilidad en comparación con el método Kirby-Bauer en la determinación de actividad antimicrobiana en plantas medicinales. (Rojas *et al.*, 2005).

En base a ello, estudios previos han demostrado, mediante la prueba de difusión en pozo, que *Aeromonas* spp fueron sensibles a diferentes aceites esenciales de plantas. Hossain *et al.* (2017) demostraron, mediante la prueba de difusión en pozo, que las cepas de *A. hydrophila* y *A. dhakensis* sí presentaban susceptibilidad antimicrobiana frente al AE de lavanda a concentraciones de 5 hasta 50 % v/v, notando halos de inhibición entre 7 a 25 mm. Tales resultados guardan relación con lo obtenido tras la prueba de difusión en pozo, donde se demostró que las cepas de *A. salmonicida* fueron susceptibles a los AE de muña, molle y limón a 5, 10 y 15% v/v.

En tal sentido, si bien todos los AE en estudio tuvieron actividad inhibitoria aceptable en comparación con similares estudios en otras especies de *Aeromonas*, la concentración 5% v/v resultó en los rangos de inhibición más bajos respecto a las concentraciones 10 y 15% v/v. En especial el AE de molle 5% v/v, que obtuvo una media equivalente a una actividad moderada según el criterio de clasificación de Bansemir *et al.* (2006).

De la misma forma Condò *et al.* (2018), evidenciaron que el AE de comino y anís verde generaron una actividad mínima frente a cepas de *A. hydrophila*, mientras que el AE de canela mostró una actividad significativa contra *A. hydrophila*, con halos de inhibición de 18 mm. Valor

que corresponde a una actividad de inhibición fuerte (Bansemir *et al.*, 2006), y que a su vez es muy aproximado a la media de los resultados obtenidos con el AE de muña al 15% v/v.

Con respecto a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de limón frente a las cepas de *A. salmonicida*, se observó un efecto antibacteriano moderado similar a los resultados del estudio de Öntaş *et al.* (2016), quienes reportaron halos de inhibición de  $12.33 \pm 0.33$  a  $17 \pm 0.57$  mm, enfrentando cepas de *A. hydrophila* contra al AE de cáscara de limón al 5 y 10% en Turquía, bajo el método de difusión. De igual forma, los AE de *Citrus aurantium* y *C. limon* expresaron halos de inhibición de  $12 \pm 1.00$  y  $12.33 \pm 0.58$  mm de diámetro, respectivamente, sobre *A. salmonicida* (Klūga *et al.* 2021).

En suma, los resultados del ensayo de difusión en pozo demuestran que los AE de muña, molle y limón reducen, en diferente grado, la proliferación de cepas de *Aeromonas* spp., evidenciando así una potencial alternativa frente al uso de antibióticos tradicionales. Es preciso decir que, si bien autores como Hayatgheib *et al.* (2020) han determinado el efecto antibacteriano de AE de canela, orégano y clavo contra cepas de *A. salmonicida*, la actividad antibacteriana *In vitro* de los aceites esenciales de muña y molle frente a cepas patogénicas de *Aeromonas* spp. aún no había sido reportada.

Otra de las clasificaciones de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es el método de dilución, categoría en la cual se agrupan las

técnicas de dilución en agar, microdilución en caldo y macrodilución en caldo (Das *et al.*, 2010). Los métodos de dilución permiten medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *In vitro*, definiendo la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo analizado (CMI) (Balouri *et al.*, 2016).

En el presente estudio se optó por realizar el ensayo de microdilución en caldo ya que, frente a los otros dos métodos antes mencionados, tiene como principales ventajas la miniaturización de la prueba, reproductibilidad, requerimiento de menor espacio y materiales en los ensayos (Balouri *et al.*, 2016). El método de microdilución se realizó siguiendo las pautas del CLSI, a fin de desarrollar un ensayo con enfoque estandarizado (Balouri *et al.*, 2016).

Para la lectura de la prueba de microdilución se siguió la metodología descrita por Eloff *et al.* (1998); la cual consiste en que a través de las sales de tetrazolio se indica el crecimiento bacteriano. Ello se explica ya que la solución incolora actúa como aceptor de electrones, reduciéndose a un producto coloreado en presencia de microorganismos o permaneciendo incoloro en su defecto (Eloff *et al.*, 1998). Este tipo de métodos colorimétricos optimizan la valoración de crecimiento en los pozos, facilitando la lectura de las pruebas de microdilución (Balouri *et al.*, 2016).

Según los resultados obtenidos, se demostró actividad bacteriostática y bactericida del aceite esencial de muña frente a las 34 cepas de *Aeromonas*

*spp.*, detectándose cepas bacterianas con CMI y CMB  $\leq 0.156\%$  v/v. Similar a nuestro trabajo, Hayatgheib *et al.* (2020) encontraron una fuerte actividad de los AE de canela, orégano y clavo contra *A. salmonicida*, mientras que, Majolo *et al.* (2016), demostraron la actividad bactericida y bacteriostática de los AE de *Lippia alba*, *L. origanoides* y *L. sidoides* inhibiendo el crecimiento de *A. hydrophila*.

Si bien las 34 cepas de *Aeromonas spp.* en estudio mostraron susceptibilidad frente al aceite esencial de muña, a través del método de microdilución en caldo; los valores de Concentración mínima inhibitoria (CMI) oscilaron entre concentraciones de 0.625 y 0.156% v/v. Encontrando que, el 53% de las cepas presentó una CMI de 0.625 % v/v, mientras que el 35% mostró efecto inhibitorio a 0.156% v/v. Cabe mencionar que la menor CMI registrada correspondía a cepas procedentes de Junín y Cajamarca.

Por otro lado, los resultados de la Concentración mínima bactericida (CMB), evidenciaron que el 47% de las cepas presentaron una CMB de 0.625 % v/v, mientras que el 38% tuvo efecto inhibitorio a 0.313% v/v. detallándose que, la menor CMB registrada, 0.156% v/v, correspondía a cepas procedentes de Junín.

En un estudio similar, Hossain *et al.* (2017) determinaron, mediante la prueba de microdilución en caldo, que las cepas de *A. hydrophila* y *A. dhakensis* frente al AE de lavanda presentaban una CMI 0.5 a 1% v/v, mientras que la CMB osciló entre 0.5 - 2 % v/v. Carhuapoma *et al.* (2009) determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración

mínima bactericida (CMB) del AE de muña frente a *H. pylori*, resultando en 2 µg/mL. Los autores atribuyen la actividad antibacteriana del aceite a la alta presencia de fenoles en el AE de muña (Carhuapoma *et al.*, 2009). Al respecto, autores como Cano *et al.* (2008) sugieren que la presencia de monoterpenos como pulegona, mentona, limoneno y mirceno en el AE de las plantas son los responsables de la actividad antimicrobiana, específicamente contra hongos (Cano *et al.* 2008).

Como se mencionó anteriormente, el AE de muña en estudio, estuvo conformado principalmente por las cetonas isomentona y pulegona, y por el fenolcarvacrol. La isomentona es una forma enantiómera del mentona (Jung *et al.*, 2012), mientras que la pulegona es un precursor de la mentona (Aviv *et al.*, 1978); utilizados como fragancias y saborizante en la industria de cosméticos, fármacos y alimentos (Jung *et al.*, 2012). Mora *et al.*, 2009 sugieren que trans-mentona y pulegona desempeñen un papel importante en la actividad antibacteriana del AE de *M. mollis*, que mostraron el mismo tipo de propiedades inhibitoras contra las bacterias de prueba. Al respecto, Jung *et al.* (2012) informaron que entre los mecanismos de acción de la isomentona se menciona que esta cetona exhibe actividad captadora de radicales libres.

Por otro lado, el carvacrol es un monoterpeno, utilizado también como aromatizante, con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antihepatotóxico, antiparasitarias e insecticidas (Nostro *et al.*, 2012). Particularmente el carvacrol, se ha estudiado extensamente por sus efectos antimicrobianos. Las CIM

informadas para carvacrol incluyen 13,3 a 20 mM (0,2a 0,3%), 250 a 500 g / ml (0,025 a 0,05%), 0,25 a 1,0 g / l (0,02 a 0,1%) y 0,4 a 0,8% para diversos patógenos. (Thormar, 2011). Diferentes autores mencionan que el carvacrol influye en la membrana celular alterando la composición de ácidos grasos, afectando la fluidez y permeabilidad de la membrana e induciendo a la pérdida de la capacidad de generar ATP de las células bacterianas, así mismo podría actuar como intercambiador de protones, reduciendo el gradiente de pH a lo largo de la membrana. (Tariq *et al.*, 2019; Thormar, 2011; Torrenegra *et al.*, 2016).

La literatura refiere que la presencia de fenoles, como el carvacrol, en los aceites esenciales provee de mayor actividad antibacteriana frente a aceitesesenciales que contienen cetonas, ya que muestran actividad aún más débil (Tariq *et al.*, 2019). En ese contexto, se podría considerar que la presencia de carvacrol sería uno de los responsables de la fuerte actividad antibacteriana del aceite esencial de muña frente a las cepas patogénicas de *Aeromonas spp.* Sin embargo, bajo este criterio no se puede dejar de atribuir la actividad antibacteriana del AE de muña al isomentona y pulegona, los otros dos componentes principales del AE (Ginovyan *et al.*, 2017).

La importancia del presente estudio radica en la identificación de productos naturales biodisponibles en la región, en este caso aceites esenciales, que puedan ser empleados como potenciales agentes antibacterianos contra uno de los géneros bacterianos más frecuentes en el cultivo de trucha arcoíris. Sin embargo, la información obtenida debe ser complementada con estudios *In Vivo* para la evaluación de los efectos del

uso del aceite esencial en los organismos acuáticos. En este contexto, la información obtenida permite valorizar desde otra perspectiva los recursos nativos del país, dando una posible alternativa ante la presencia de patógenos con resistencia antimicrobiana.

Si bien el estudio se desarrolló realizó *In Vitro*, una de las limitantes encontradas fue la reproducibilidad de estas pruebas empleadas (difusión y dilución), porque están sujetas a las variaciones que van desde la experiencia, adiestramiento e interpretación del personal ejecutor del manejo en laboratorio, así como la procedencia y condiciones de conservación de cada uno de los materiales empleados durante la ejecución de las diferentes pruebas de laboratorio. No obstante, esto se pudo superar realizando el estudio por triplicado. El realizar tanto las pruebas de difusión como de dilución permitió obtener resultados más precisos, realizando un screening para selección del aceite con mayor efecto antibacteriano, y obteniendo resultados sobre efecto bacteriostático y bactericida con las pruebas de dilución.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que los tres aceites esenciales evaluados presentan una potencial actividad antibacteriana y que el AE de muña tiene efecto bactericida frente a las cepas patogénicas de *Aeromonas spp.*

## IX. CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) muestran diferente composición química que varían en cantidad y orden de importancia.
- El aceite esencial de muña presentó mayor actividad antimicrobiana *In vitro*, que los aceites esenciales de molle y limón, frente a la totalidad de aislados patogénicos de *Aeromonas spp* evaluadas.
- Mediante la técnica de microdilución en caldo, se determinó que los 34 aislados de *Aeromonas spp.* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú presentan susceptibilidad tanto bacteriostática como bactericida frente al aceite esencial de muña.



## X. RECOMENDACIONES

- Para el estudio de los aceites esenciales como alternativa al uso de antimicrobianos, sería conveniente estandarizar los métodos de estudio *In Vitro*, para que la información generada por las investigaciones pueda ser comparada e interpretada bajo los mismos criterios.
- A fin de obtener más detalle respecto a la susceptibilidad de las cepas evaluadas, se recomienda realizar la identificación molecular por especies bacterianas del género *Aeromonas spp.*
- Los resultados obtenidos *In vitro* requieren ser analizados *In vivo* a fin de establecer el margen de seguridad, efectos secundarios y determinar su efectividad en peces afectados con cepas patogénicas de *Aeromonas spp.*

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Approved Guideline VET03-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI.
2. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Informational supplement VET03/04-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI.
3. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2018. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. (Internet). (Acceso 31 de marzo 2019). Disponible en: <http://www.fao.org/3/i9540es/I9540ES.pdf>
4. [PRODUCE] Ministerio de la producción. 2017. Anuario estadístico pesquero y acuícola. (Internet). (Acceso 31 de marzo 2019). Disponible en: [http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca\\_2017.pdf](http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf)
5. Adel M, Safari R, Ghitanchi A, Zorriehzahra M. 2016. Chemical composition and *In vitro* antimicrobial activity of some Iranian medical herbs against *Yersinia ruckeri*. Iran J Fish Sci. 15(3): 1108-1123. (Internet). (Acceso 01 de abril 2019). Disponible en: <http://aquaticcommons.org/id/eprint/22936>
6. Nostro A, Papalia T. 2012. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current

Progress and Future Prospectives. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 7(1), 28–35. doi:10.2174/157489112799829684

7. Ashrafi B, Ramak P, Ezatpour B, Talei G. 2017. Investigation on chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic properties of essential oil from *Dracocephalum kotschyi* Boiss. Afr J Tradit Complement Altern Med. 14(3): 209–217. doi:10.21010/ajtcam.v14i3.23
8. Asnaashari S, Delazar A, Habibi B, Vasfi R, Nahar L, Hamedeyazdan S, Sarker SD. 2010. Essential Oil from *Citrus aurantifolia* prevents ketotifen-induced weight-gain in mice. Phytotherapy Research, 24(12): 1893–1897. doi:10.1002/ptr.3227
9. Aviv D, Galun E. 1978. Biotransformation of Monoterpenes by Mentha Cell Lines: Conversion of Pulegone to Isomenthone. Planta Medica, 33(01): 70–77. doi:10.1055/s-0028-1097361
10. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, Rafatullah M, Ganash M, Kamal MA, Ashraf GM. 2018. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. Curr Drug Metab. 19(13): 1100-1110. doi: 10.2174/1389200219666180723144850.
11. Baba E, Acar Ü, Öntaş C, Kesbiç OS, Yılmaz S. 2016. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. Aquaculture, 465:13–18.

doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.023

12. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446–475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
13. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda S K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
14. Bandeira G, Pês TS, Saccol EMH, Sutili FJ, Rossi W, Murari AL, Heinzmann BM, Pavanato MA, Vargas AC, Silva LL, Baldisserotto B. 2017. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Ind Crops Prod*, 97:484-491. doi:10.1016/j.indcrop.2016.12.040
15. Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist U. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1): 7984. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.051
16. Baptiste J, Michel P, Fekam F. 2020. Essential Oil's Chemical Composition and Pharmacological Properties. El-Shemy H. *Essential Oils - Oils of Nature*. Egipto: Intechopen, 1-23doi:10.5772/intechopen.86573
17. Baser KHC, Buchbauer G. 2020. *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. Tercera edición. Florida: CRC Press. 1098p.
18. Baydar H, Sağdıç O, Özkan G, Karadoğan 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.  
doi:10.1016/s0956-7135(03)00028-8

19. Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet D, Daniel P. 2014. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: Presence and antibiotic susceptibility. *Dis. Aquat. Organ.* 109(2):117-26. doi: 10.3354/dao02725
20. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. 2008. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública*, 25(3): 298-301
21. Carhuapoma M, López S, Roque M, Velapatiño B, Bell C, Whu D. 2009. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “RUYAQ MUÑA”. *Ciencia e Investigación*, 12(2): 83-89.
22. Chamorro E, Zambón S, Morales W, Sequeira A, Velasco G. 2012. Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. *Salih B. Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. Intechopen. 308-324. doi:10.5772/33201
23. Chauhan N, Malik A, Sharma S. 2017. Repellency potential of essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Environ Sci Pollut Res*, 25(5): 4707–4714. doi:10.1007/s11356-017-0363-x
24. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. 2017. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4: 58. doi:10.3390/medicines4030058

25. Condò C, Anacarso I, Sabia C, Iseppi R, Anfelli I, Forti L, de Niederhäusern S, Bondi M, Messi P. 2018. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. *Natural Product Research*. doi: 10.1080/14786419.2018.1490904
26. Da Cunha JA, Heinzmann BM, Baldisserotto B. 2018. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens - A review. *Journal of Applied Microbiology*, 125(2): 328–344. doi:10.1111/jam.13911
27. Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2): 1–7. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.025
28. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(2): 104-111, 18. doi: 10.5897/JMPR09.030
29. De Mendonça PM, Rodilla JM, Díez D, Elder H, Guala MS, Silva LA, Pombo EB. 2012. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*, 17(10): 12023-36. doi: 10.3390/molecules171012023.
30. Deveci O, Sukan A, Tuzun N, Hames E. 2010. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *J. Med. Plant. Res.*

- 4(21): 2211-2216. doi: 10.5897/JMPR10.326Do Prado A, Garces H, Bagagli E, Rall V, Furlanetto A, Fernandes A, Furtado F. 2018. *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. Journal of Applied Microbiology: doi:10.1111/jam.14157
- Dosoky N, Setzer W. 2018. Biological Activities and Safety of Citrus spp. Essential Oils. International Journal of Molecular Sciences, 19(7): 1966. doi:10.3390/ijms19071966
31. Ekici S, Diler Ö, Didinen BI, Kubilay A. 2011. Antibacterial activity of essential oils from medicinal plants against bacterial fish pathogens. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 17(Suppl A): 47-54. doi: 10.9775/kvfd.2010.3224
32. Eloff, JN. 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. Planta Med. 64: 711-713. doi: 10.1055/s-2006-957563
33. Faleiro M L, Miguel M G, Ladeiro F, Venancio F, Tavares R, Brito JC, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. Letters in Applied Microbiology, 36(1): 35–40. doi:10.1046/j.1472-765x.2003.01259.x
34. Feuereisen MM, Zimmermann BF, Schulze-Kaysers N, Schieber A. 2017. Differentiation of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and Peruvian Peppertree (*Schinus molle* L.) Fruits by UHPLC–UV–MS Analysis of Their Anthocyanin and Biflavonoid Profiles. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(26): 5330–5338. doi:10.1021/acs.jafc.7b00480

35. Fournet A, Rojas de Arias A, Charles B, Bruneton J. 1996. Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(3): 145–149. doi:10.1016/0378-8741(96)01406-7
36. Fuertes C, Chipana Y. 2001. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación*. (Internet). (Acceso 31 de marzo 2019). Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3389>
37. Gamarra FMC, Sakanaka LS, Tambourgi EB, Cabral FA. 2006. Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1): 147–151. doi:10.1590/s0104-66322006000100016
38. Garcia A, Barbas C. 2010. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) - Based metabolomics. *Metabolic Profiling. Methods Mol Biol*. 708:191-204. doi: 10.1007/978-1-61737-985-7\_11
39. García J, Ulloa J, Mendoza S. 2021. Bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala. 35. 1-14. doi.org/10.15359/ru.35-2.4
40. Ginovyan M, Petrosyan M, Trchounian A. 2017. Antimicrobial activity of



some plant materials used in Armenian traditional medicine. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1):50. doi:10.1186/s12906-017-1573-y

41. Gonçalves RB, De Oliveira WF, Marques DSC, Dos Santos MT, De Carvalho Elbal, Coelho LCBB. 2019. The genus *Aeromonas*: A general approach. Microbial Pathogenesis, 130:81-94. doi:10.1016/j.micpath.2019.02.036
42. Görmez Ö, Diler Ö. 2017. Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Essential Oils Against Fish Pathogens. Yalvac Academy Journal, 2(1), 112-122. (Internet). (Acceso 04 de abril 2019). Disponible en: <http://dergipark.org.tr/yalvac/issue/32621/343198>
43. Hayatgheib N, Fournel C, Calvez S, Pouliquen H, Moreau E. 2020. *In vitro* antimicrobial effect of various commercial essential oils and their chemical constituents on *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Journal of Applied Microbiology, 129(1):137-145. doi:10.1111/jam.14622
44. Hoie S, Heum M, Thoresen OF. 1997. Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Aeromonas salmonicida* ss *salmonicida* in Atlantic salmon *Salmo salar*. Diseases of Aquatic Org, 30: 27-35. Doi: 10.3354/dao030027
45. Honour JW. 2006. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Methods Mol Biol. 324:53-74. doi: 10.1385/1-59259-986-9:53
46. Hosni K, Jemli M, Dziri S, M'rabet Y, Ennigrou A, Sghaier A, Sebei H. 2011. Changes in phytochemical, antimicrobial and free radical scavenging

activities of the Peruvian pepper tree (*Schinus molle* L.) as influenced by fruit maturation. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1622–1628. doi:10.1016/j.indcrop.2011.06.004

47. Hossain S, Heo H, De Silva B, Wimalasena S, Pathirana, Heo G. 2017. Antibacterial activity of essential oil from lavender (*Lavandula angustifolia*) against pet turtle-borne pathogenic bacteria. *Laboratory Animal Research*, 33(3): 195. doi:10.5625/lar.2017.33.3.195

48. Hurtado CL. 2019. Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Aeromonas salmonicida* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de cuatro regiones de la sierra del Perú. Tesis de maestría. Recuperado de: <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/7237>

49. Ji L, Sun G, Li J, Wang Y, Du Y, Li X, Liu Y. 2017. Effect of dietary  $\beta$ -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 64: 56–67. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.015

50. Jung E, Byun S, Kim S, Kim M, Park D, Lee J. 2012. Isomenthone protects human dermal fibroblasts from TNF- $\alpha$ -induced death possibly by preventing activation of JNK and p38 MAPK. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10): 3514–3520. doi:10.1016/j.fct.2012.07.002

51. Kim J, Choresca C, Shin P, Han J, Jun J, Park S. 2013. Biological Control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Infection in Rainbow Trout

(*Oncorhynchus mykiss*) Using Aeromonas Phage PAS-1. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(1): 81–86. doi:10.1111/tbed.12088

52. Klūga A, Terentjeva M, Vukovic NL, Kačániová M. 2021. Actividad antimicrobiana y composición química de aceites esenciales contra microorganismos patógenos de peces de agua dulce. *Plantas*, 10 (7): 1265. <https://doi.org/10.3390/plants10071265>
53. Lalitha MK. 2017. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. (Internet). (Acceso 02 de abril 2019). Disponible en: [https://www.biodiamed.gr/wpcontent/uploads/2017/06/Manual\\_on\\_Antimicrobial\\_Susceptibility\\_Testing.pdf](https://www.biodiamed.gr/wpcontent/uploads/2017/06/Manual_on_Antimicrobial_Susceptibility_Testing.pdf).
54. Lee SM, Park SY, Kim MJ, Cho EA, Jun CH, Park CH, Rew JS. 2018. Key lime (*Citrus aurantifolia*) inhibits the growth of triple drug resistant *Helicobacter pylori*. *Gut Pathogens*, 10(1):16. doi:10.1186/s13099-018-0244-y
55. Lemes RS, Alves, C, Estevam E, Santiago M, Martins C, Santos T, Miranda M. 2018. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2):1285–1292. doi:10.1590/0001-3765201820170847
56. Lim S, Jang E, Lee S, Yoo B, Kim SK, Kim TH. 2013. Antibiotic resistance in bacteria isolated from freshwater aquacultures and prediction of the persistence and toxicity of antimicrobials in the aquatic environment. *Journal*

of Environmental Science and Health, Part B, 48(6), 495–504. doi:10.1080/03601234.2013.761911

57. Luís Â, Duarte A, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. 2015. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79: 274–282. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.055
58. Majolo C, Da Rocha I, Chagas C, Chaves M, Bizzo R. 2016. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 48(5), 2380–2387. doi:10.1111/are.13073
59. Malagón O, Vila R, Iglesias J, Zaragoza T, Cañigüeral S. 2003. Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6): 527–531. doi:10.1002/ffj.1262
60. Martins M, Arantes S, Candeias F, Tinoco MT, Cruz-Morais J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1): 485–492. doi:10.1016/j.jep.2013.10.063
61. Mateo EC, Castro T, Sierralta V, Mateo DR. 2016. Bacteriological and histopathological study of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Peru. *Journal of Fish Diseases*, 40(7): 941–946. doi:10.1111/jfd.12555
62. Menanteau-Ledouble S, Krauss I, Goncalves, R, Weber B, Santos G, El-Matbouli M. 2017. Antimicrobial effect of the Biotronic® Top3 supplement

and efficacy in protecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from infection by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Research in Veterinary Science, 114: 95–100.doi: 10.1016/j.rvsc.2017.03.010

63. Menanteau-Ledouble S, Krauss I, Santos G, Fibi S, Weber B, El-Matbouli M. 2015. Effect of a phytogenic feed additive on the susceptibility of *Oncorhynchus mykiss* to *Aeromonas salmonicida*. Dis Aquat Organ, 115:57-66. doi: 10.3354/dao02875.
64. Montesinos JA. 2018. Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del Lago Titicaca. Tesis de maestría. Recuperado de: <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/3862>
65. Mora FD, Araque M, Rojas LB, Ramírez R, Silva B, Usubillaga A. 2009. Chemical composition and *In Vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. Natural Product Communications, 4(7): 1934578X0900400. doi: 10.1177/1934578x0900400726
66. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals, 6(12): 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451).
67. Noga, E. 2010. Fish disease, diagnosis and treatment. 2nd edition. Wiley Blackwell, USA.
68. Öntaş C, Baba E, Kaplaner E, Küçükaydin S, Öztürk M, Ercan M. 2016. Antibacterial Activity of *Citrus limon* Peel Essential Oil and *Argania spinosa*

- Oil Against Fish Pathogenic Bacteria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22 (5): 741-749. doi: 10.9775/kvfd.2016.15311
69. Park YJ, Baskar T, Yeo SK, Arasu M, Al-Dhabi N, Lim SS, Park SU. 2016. Composition of volatile compounds and *in vitro* antimicrobial activity of nine *Mentha* spp. *Springer Plus*, 5(1): 1628. doi:10.1186/s40064-016-3283-1
70. Pauer D, Park S, Roca M, Salazar A. 2019. Diferencias en la presencia de alcaloides y fenoles de cinco muestras de muña de expendio informal procedentes de mercados populares en Lima - Perú. *Horizonte Médico*, 18(3): 25-29. doi: org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.05
71. Pellegrini MC, Alvarez MV, Ponce AG, Cugnata N M, De Piano FG, Fuselli SR. 2014. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6): 458 - 465. doi:10.1080/10412905.2014.947387
72. Piotrowska, Marta; Popowska, Magdalena. 2014. The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. *Annals of Microbiology*, 64(3), 921–934. doi:10.1007/s13213-014-0911-2
73. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39 .doi:10.1186/1472-6882-6-39
74. Quendera AP, Barreto A, Semedo-Lemsaddek T. 2018. Antimicrobial activity of essential oils against foodborne multidrug-resistant enterococci and

aeromonads in planktonic and biofilm state. Food Science and Technology International. doi:10.1177/1082013218799027

75. Rojas J, García A, López A. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Universidad de Santiago de Chile. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4(2): 28-32. (Internet). (Acceso 12 de mayo 2020). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85640204>
76. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 88(2-3): 199–204. doi:10.1016/s0378-8741(03)00212-5
77. Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, Aligiannis N, Graikou K, Chinou I. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. Food Chemistry, 119(1): 311–316. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.06.028
78. Skwor T, Stringer S, Haggerty J, Johnson J, Duhr S, Johnson M, Seckinger M, Stemme M. 2019. Prevalence of potentially pathogenic antibiotic resistant *Aeromonas* spp. in treated urban wastewater effluents compared to recipient riverine populations: A three-year study. Applied and Environmental Microbiology. doi:10.1128/AEM.02053-19
79. Snuossi M, Trabelsi N, Ben Taleb S, Dehmeni A, Flamini G, De Feo V. 2016. *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* Essential oils:

composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules*, 21(10): 1414. doi: 10.3390/molecules21101414

80. Spadaro F, Costa R, Circosta C, Occhiuto F. 2012. Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil. *Nat Prod Commun*, 7(11):1523-1526. doi:10.1177/1934578x1200701128

81. Starliper CE, Ketola HG, Noyes AD, Schill WB, Henson FG, Chalupnicki MA, Dittman DE. 2015. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1): 89 – 97. doi:10.1016/j.jare.2013.12.007

82. Suárez LY, Yañez LF. 2018. Extracción de ADN de bacterias conservadas en el banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Campos Elíseos. *Respuestas*, 23: 24-28. doi.org/10.22463/0122820X.1496

83. Supattapone SY, Supattapone S, Cramer RA. 2016. The effect of reducing agents on challenge of rainbow trout with *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 40(3): 437–441. doi:10.1111/jfd.12511

84. Sutili FJ, Gatlin DM, Heinzmann BM, Baldisserotto B. 2017. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3): 716–726. doi:10.1111/raq.12197

85. Tariq S, Wani S, Rasool W, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant



- microbial pathogens. *Microb Pathog.* 134: 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580.
86. Tasdelen N, Tanriverdi Y, Coban A, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. 2009. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia*, 80(1): 48–50. doi:10.1016/j.fitote.2008.09.006
87. Thirugnanasampandan R, Gunasekar R, Gogulramnath M. 2015. Chemical composition analysis, antioxidant and antibacterial activity evaluation of essential oil of *Atalantia monophylla* Correa. *Phcog Res*, 7: 52-56. doi:10.4103/0974-8490.152009
88. Thormar H. 2011. Lipids and essential oils as antimicrobial agents. Iceland. John Wiley & Sons, Ltd. 305p
89. Torrenegra M, Granados C, Durán M, León G, Yáñez X, Martínez C, Pájaro N. 2016. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. Universidad de Los Llanos Meta, Colombia. *Orinoquia*, 20: 69-74. (Internet). (Acceso 31 de marzo 2019). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89647074008>
90. Torrenegra ME, Pájaro NP, León G. 2017. Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 46(2): 160-175. <https://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67934>
91. Tukmechi A, Ownagh A, Mohebbat A. 2010. *In vitro* antibacterial activities of ethanol extract of Iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria

(*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* & *Streptococcus iniae*). Brazilian Journal of Microbiology, 41 (4): 1086-1092. doi:10.1590/s1517-83822010000400030

92. Valderrama K, Saravia M, Santander J. 2017. Phenotype of *Aeromonas salmonicida* sp. *salmonicida* cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein (Crp) mutants and its virulence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Diseases, 40(12): 1849–1856. doi:10.1111/jfd.12658)
93. Valgas C, Souza SM, Smânia EFA, Smânia Jr A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology, 38(2): 369–380. doi:10.1590/s1517-83822007000200034
94. Villumsen KR, Koppang EO, Christensen D, Bojesen AM. 2017. Alternatives to mineral oil adjuvants in vaccines against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout offer reductions in adverse effects. Scientific Reports, 7(5930). doi:10.1038/s41598-017-06324-7
95. Yildirim AB, Turker H. 2018. Antibacterial Activity of Some Aromatic Plant Essential Oils Against Fish Pathogenic Bacteria. LimnoFish, 4(2):67-74 doi: 10.17216/limnofish.379784
96. Zepeda AP, Vega V, Ortega C, Rubio M, de Oca DM, Soriano E. 2017. Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). Acta Tropica, 169: 122–124. doi:10.1016/j.actatropica.2017.02.013