



***In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of two types of oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against bacteria from shrimp ponds.**

Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de dos tipos de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) contra bacterias de estanques de camarón.

Gracia-Valenzuela, M. H.¹, Arias Moscoso, J. L.¹, Ochoa Meza, A. R.¹,
Escobedo-Bonilla, C. M.²

¹Tecnológico Nacional de México / I.T. Valle del Yaqui. Academia de Biología, Departamento de Ingenierías. Avenida Tecnológico Block 611, Bácum, Sonora, México. C.P. 85276. ²Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Unidad Sinaloa. Blvd. Juan de Dios Batiz Paredes 250, Col. San Joachin, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101.

Cite this paper/Como citar este artículo: Gracia-Valenzuela, M. H., Arias Moscoso, J. L., Ochoa Meza, A. R., Escobedo-Bonilla, C. M. (2022). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of two types of oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against bacteria from shrimp ponds. *Revista Bio Ciencias*, 9 e1344. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1344>



ABSTRACT

The antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils (OEOs) was evaluated against bacteria inhabiting shrimp ponds. One OEO had higher thymol content and another had higher carvacrol content, both compounds have antimicrobial properties. Bacterial isolates (n = 19) were collected in shrimp farms, from shrimp hepatopancreas, pond water and/or sediments. The genus *Pseudomonas* was the most frequent as it was found in four out of 13 sampled farms and was mainly isolated from hepatopancreas. All the isolates were used to evaluate the antimicrobial effect of five antibiotics and the two OEOs by inhibition zone tests. The antimicrobial activity of the two OEOs was statistically significant against seven bacterial species, compared to the other antibiotics ($p < 0.007143$). The

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 28th 2022.

Accepted/Aceptado: July 19th 2022.

Available on line/Publicado: August 16th 2022.

*Corresponding Author:

César Marcial Escobedo-Bonilla. Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Unidad Sinaloa. Blvd. Juan de Dios Batiz Paredes 250, Col. San Joachin, Guasave, Sinaloa, México. C.P. 81101. Phone: +52 (55) 5729 6000 ext. 87637. E-mail: cesar_escobedomx@yahoo.com

RESUMEN

La actividad antimicrobiana de aceites esenciales (OEOs por sus siglas en inglés) del orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) fue evaluada contra bacterias que viven en estanques de camarón. Un OEO tuvo mayor contenido de timol y el otro tuvo mayor contenido de carvacrol, ambos compuestos tienen propiedades antimicrobianas. Aislados bacterianos (n = 19) fueron recolectados en granjas camaronícolas, de hepatopáncreas de camarón, agua de estanque y/o sedimentos. El género *Pseudomonas* fue el más frecuente ya que se encontró en cuatro de 13 granjas, y fue aislada principalmente de hepatopáncreas. Todos los aislados se usaron para evaluar el efecto antimicrobiano de cinco antibióticos y los dos OEOs mediante pruebas de zona de inhibición. La actividad antimicrobiana de los dos OEOs fue estadísticamente significativa contra siete especies bacterianas, comparada con los otros antibióticos ($p < 0.007143$). Las especies bacterianas sensibles al OEO rico en timol fueron *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella spp.*, mientras que *Enterobacter cloacae*,

bacterial species sensitive to the thymol-rich OEO were *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris* and *Salmonella* spp., whereas *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* and *Salmonella typhi* were susceptible to the carvacrol-rich OEO. The thymol-rich OEO had significantly higher antibacterial effect than oxytetracycline, magnamycin, aviflox and enrofloxacin, whereas the carvacrol-rich OEO outperformed oxytetracycline and magnamycin. In conclusion, the two OEOs evaluated had higher antibacterial properties than most antibiotics used in this study.

KEY WORDS

Oregano essential oils, thymol, carvacrol, antimicrobial effect, shrimp farms.

Introduction

The Mexican oregano is a generic group of three different species of aromatic plants: *Lippia graveolens*, also known as *L. berlandieri*; *Poliomintha longiflora*, and *Monarda fistulosa* var. *menthifolia* (Cid-Pérez et al., 2015). The genus *Lippia* is the most cultivated of these oregano plants. This genus belongs to the Family Verbenaceae, which contains 35 genera, and around 1000 species that are mainly distributed in temperate and warm regions of the northern and southern hemispheres of the American continent (López-Villafranco et al., 2017). The genus *Lippia* includes about 200 species that are predominant in the tropical and subtropical regions of the American continent (González-Elizondo et al., 2011). In México, *Lippia* has 31 species (Huerta, 1997). It has been proposed that oregano plants of the genus *Lippia* are a complex of various close species including *L. graveolens*, *L. berlandieri*, *L. palmeri*, *L. alba* and other infraspecies located in the north and northwest, to the south of Mexico and even Central America (Pascual et al., 2001; Gonzalez-Elizondo et al., 2011; Cid-Pérez et al., 2015; Orona-Castillo et al., 2017; Calvo-Irabien, 2018). The species *L. graveolens* and *L. berlandieri* are considered as one species, or variants of different populations (Huerta, 1997; Gonzalez-Elizondo et al., 2011; Cid-Pérez et al., 2015; Calvo-Irabien, 2018). It is possible that this species is polymorphic, comprised of several populations with various habitat preferences and distinct morphological, phenological and phytochemical features (González-Elizondo et al., 2011). It also seems that this genus has a consistent chemical profile and pharmacological activities (Pascual et al., 2001).

Serratia marcescens y *Salmonella typhi* fueron susceptibles al OEO rico en carvacrol. El OEO rico en timol tuvo un efecto antibacterial significativamente mayor que la oxitetraciclina, magnamicina, aviflox y enrofloxacin, mientras que el OEO rico en carvacrol superó a la oxitetraciclina y magnamicina. En conclusión, los dos OEOs evaluados tuvieron mayores propiedades antibacteriales que la de varios de los antibióticos usados en este estudio.

PALABRAS CLAVE

Aceites esenciales de orégano, timol, carvacrol, efecto antimicrobiano, granjas camaronícolas.

Introducción

El orégano mexicano es un grupo genérico de tres especies distintas de plantas aromáticas: *Lippia graveolens*, también conocida como *L. berlandieri*; *Poliomintha longiflora*, y *Monarda fistulosa* var. *menthifolia* (Cid-Pérez et al., 2015). El género *Lippia* es el más cultivado de estas plantas de orégano. Este género pertenece a la Familia Verbenaceae, la cual contiene 35 géneros y alrededor de 1000 especies, que están distribuidas principalmente en regiones templadas y cálidas de los hemisferios norte y sur del continente americano (López-Villafranco et al., 2017). El género *Lippia* incluye cerca de 200 especies que son predominantes en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano (González-Elizondo et al., 2011). En México, *Lippia* tiene 31 especies (Huerta, 1997). Se ha propuesto que las plantas de orégano del género *Lippia* son un complejo de varias especies cercanas incluyendo a *L. graveolens*, *L. berlandieri*, *L. palmeri*, *L. alba* y otras infraespecies localizadas desde el norte y noroeste, hasta el sur de México y aún en centroamérica (Pascual et al., 2001; Gonzalez-Elizondo et al., 2011; Cid-Pérez et al., 2015; Orona-Castillo et al., 2017; Calvo-Irabien, 2018). Las especies *L. graveolens* y *L. berlandieri* son consideradas como una sola especie, o variantes de diferentes poblaciones (Huerta, 1997; Gonzalez-Elizondo et al., 2011; Cid-Pérez et al., 2015; Calvo-Irabien, 2018). Es posible que esta especie sea polimórfica, compuesta por varias poblaciones con diversas preferencias de hábitat y distintivas características morfológicas, fenológicas y fitoquímicas (González-Elizondo et al., 2011). También parece que este género tiene un perfil químico y actividades farmacológicas consistentes (Pascual et al., 2001).

Plants of the genus *Lippia* have different habitat preferences, going from a warm climate, gradients of dry and semi-dry climates, and a part of temperate climates. In México, they are found through the Gulf Coast, the Pacific region, the Yucatan peninsula, the arid zones of Tamaulipas and Hidalgo, and the Chihuahua desert. The form of the plant is variable, from xerophytic scrub, subtropical scrub, tropical deciduous forest (low jungle), chaparral, and acahuales derived from the tropical deciduous forest (medium jungle). They can also be the dominant form in the subtropical scrub at southern Durango and northern Zacatecas (González-Elizondo et al., 2011). The variety *L. berlandieri* is distributed in the central-east part of Mexico; the variety *L. graveolens*, is found in the north, and the variety *L. palmeri* locates in the northwest of the country (Huerta, 1997; Cid-Pérez et al., 2015).

The oregano essential oils (OEO) have recently been found to have antimicrobial activity due to the presence of chemicals such as *p*-cymene, which is the precursor of compounds such as thymol and carvacrol, that may be effective antimicrobials (Skandamis & Nychas, 2001; Gracia-Valenzuela et al., 2012; Gracia-Valenzuela et al., 2014; Quiroz-Velázquez et al., 2017). These compounds make up most of the antimicrobial molecules in this type of essential oils (Paredes-Aguilar et al., 2007), and they have shown potential to control pathogenic microorganisms affecting various farmed species of fish and crustaceans (Gracia-Valenzuela et al., 2012; 2014; Morales-Covarrubias et al., 2016; de Souza et al., 2017; Majolo et al., 2017; 2018; Marasca et al., 2020).

At present, most farmed fish, mollusks, and crustaceans can be affected by several types of pathogens causing disease and mortality (Sindermann, 1984; Lightner et al., 2012). Of these, bacteria are one of the most damaging, since they can be highly infectious and can cause massive mortalities. Hence, one main goal in aquaculture is to reduce the impact of infectious diseases and at the same time, diminishing the impact of chemicals on the aquatic environment and communities of animals and microorganisms living in it.

The use of chemicals and antibiotics to control microbial pathogens poses many risks to environmental and human health, including antibiotic resistance issues and environmental pollution (Pridgeon & Klesius,

Plantas del género *Lippia* tienen diferentes preferencias de habitat, desde climas cálidos, gradientes de climas secos y semi-secos, y una parte de climas templados. En México, se encuentran a través de la costa del Golfo, la región del Pacífico, la península de Yucatán, las zonas áridas de Tamaulipas e Hidalgo, y el desierto de Chihuahua. La forma de la planta es variable, desde matorral xerófilo, matorral subtropical, bosque tropical deciduo (selva baja), chaparral, y acahuales derivados del bosque tropical deciduo (selva media). Estas plantas también pueden ser la forma dominante en el matorral subtropical en el sur de Durango y norte de Zacatecas (González-Elizondo et al., 2011). La variedad *L. berlandieri* se distribuye en la parte central-este de México; la variedad *L. graveolens* se encuentra en el norte, y la variedad *L. palmeri* se localiza en el noroeste del país (Huerta, 1997; Cid-Pérez et al., 2015).

Los aceites esenciales de orégano (OEOs, por sus siglas en inglés) recientemente han sido reconocidos por tener actividad antimicrobiana debido a la presencia de químicos como el *p*-cymene, el cual es el precursor de compuestos como el timol y carvacrol, los cuales pueden ser antimicrobianos eficaces (Skandamis & Nychas, 2001; Gracia-Valenzuela et al., 2012; Gracia-Valenzuela et al., 2014; Quiroz-Velázquez et al., 2017). Estos compuestos constituyen la mayoría de las moléculas antimicrobianas en este tipo de aceites esenciales (Paredes-Aguilar et al., 2007), y han mostrado potencial para controlar microorganismos patógenos que afectan a varias especies cultivadas de peces y crustáceos (Gracia-Valenzuela et al., 2012; 2014; Morales-Covarrubias et al., 2016; de Souza et al., 2017; Majolo et al., 2017; 2018; Marasca et al., 2020).

Actualmente, la mayoría de peces moluscos y crustáceos cultivados pueden ser afectados por varios tipos de patógenos causantes de enfermedades y mortalidad (Sindermann, 1984; Lightner et al., 2012). De estos, las bacterias son uno de los más dañinos, puesto que pueden ser altamente infecciosos y causar mortalidades masivas. Por ello, un objetivo primordial en la acuicultura es reducir el impacto de las enfermedades infecciosas, y al mismo tiempo, disminuir el impacto de químicos en el ambiente acuático y a las comunidades de animales y microorganismos que viven en él.

El uso de químicos y antibióticos para controlar patógenos microbianos poseen muchos riesgos para el ambiente y la salud humana, incluyendo temas de resistencia a antibióticos y contaminación ambiental (Pridgeon & Klesius, 2012). En

2012). In aquaculture, the impact of drug-resistant bacteria on farmed tilapia in China has caused losses of 400 million US dollars, whereas, in Costa Rica, drug-resistant bacteria has caused 2.5 million US dollars losses in tilapia cultures (Oviedo-Bolaños *et al.*, 2021). Moreover, various bacterial species have been reported to show resistance to antibiotics, including *Enterobacter* (Cohen *et al.*, 2020), *Salmonella*, and *Vibrio* (Banerjee *et al.*, 2012). To fight bacterial pathogens affecting shrimp cultures, it is necessary to develop and test substances from natural sources, that are friendly to the environment and represent an alternative to the use of chemicals and antibiotics that are hazardous to fauna and beneficial microorganisms in the aquatic environment. These premises make the case for the search for products of natural origin derived from plants such as essential oils which contain active compounds with several biological properties, including antimicrobial activity. These natural products may contribute to reduce the negative impact of infectious diseases in aquaculture, and also curb the damaging effects to the aquatic environment caused by the presently used chemicals (Escobedo-Bonilla, 2021). Therefore, it is important to find and evaluate natural compounds with effective antimicrobial activity that may be used in aquaculture to maintain both aquatic animal health and preserve the environment (Citarasu, 2012; Zhu, 2020).

The present study aimed to determine *in vitro* the antimicrobial effect of two OEOs with different proportions of carvacrol and thymol on naturally-occurring bacteria from farmed shrimp from Sonora, Mexico.

Material and Methods

Morphological traits of Mexican oregano

Plants of the Mexican oregano *Lippia* complex, are aromatic shrubs measuring up to 2.5 m high and 1.20 m average foliage. They have branched stems with high numbers of leaves, which are the usable part of the plant. The smell and taste of the wild plants are robust and strong (Cid-Pérez *et al.*, 2015). The leaves are 1 to 3 cm long, and 0.5 to 1.5 cm wide, they are opposed, alternate, with oval shape, dark green color, serrated edges, rough texture with villi. The flowers are white and small forming inflorescences in clusters. The

acuicultura, el impacto de bacterias resistentes a antibióticos en tilapias cultivadas en China ha causado pérdidas de 400 millones de dólares americanos, mientras en Costa Rica, bacterias resistentes a antibióticos han causado pérdidas por 2.5 millones de dólares americanos en cultivos de tilapia (Oviedo-Bolaños *et al.*, 2021). Además, varias especies bacterianas han sido reportadas mostrando resistencia a antibióticos, incluyendo *Enterobacter* (Cohen *et al.*, 2020), *Salmonella* y *Vibrio* (Banerjee *et al.*, 2012). Con el fin de combatir patógenos bacterianos que afectan a los cultivos de camarón, es necesario desarrollar y evaluar sustancias de fuentes naturales, que sean amigables con el ambiente y representan una alternativa al uso de químicos y antibióticos que son riesgosos a la fauna y a microorganismos benéficos en el ambiente acuático. Estas premisas promueven la búsqueda de productos de origen natural derivados de plantas como los aceites esenciales, que contienen compuestos activos con un número de propiedades biológicas, incluyendo la actividad antimicrobiana. Estos productos naturales pueden contribuir a reducir el impacto negativo de enfermedades infecciosas en acuicultura, y también a reducir el efecto dañino al ambiente acuático causado por los químicos actualmente utilizados (Escobedo-Bonilla, 2021). Por lo tanto, es importante encontrar y evaluar compuestos naturales con actividad antimicrobiana efectiva que pueden ser usados en acuicultura para mantener tanto la salud de animales acuáticos y preservar el ambiente (Citarasu, 2012; Zhu, 2020).

El objetivo del presente estudio fue determinar *in vitro* el efecto antimicrobiano de dos OEOs con diferentes proporciones de carvacrol y timol sobre bacterias que aparecen naturalmente en camarones cultivados de Sonora, México.

Material y Métodos

Características morfológicas del orégano mexicano

Plantas del complejo del orégano mexicano *Lippia*, son arbustos aromáticos que miden hasta 2.5 m de alto y 1.20 m de follaje promedio. Tienen tallos ramificados con un gran número de hojas las cuales son la parte útil de la planta. El olor y sabor de las plantas silvestres es robusto y fuerte (Cid-Pérez *et al.*, 2015). Las hojas tienen de 1 a 3 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm de ancho, son opuestas, alternadas, de forma oval, con color verde oscuro, con las orillas serradas, textura rugosa con vellosidades. Las flores son blancas y

fruits are small capsules containing brown seeds, not bigger than 0.25 mm (Huerta, 1997).

Production of oregano essential oils (OEOs)

Culture fields of *Lippia berlandieri* from Salaises, Chihuahua were the origin of the vegetal material. Leaves were dried and ground to prepare the essential oils, according to the methods described by Paredes-Aguilar *et al.* (2007). Briefly, dry oregano leaves were used for hydro-distillation using a Clevenger-type distiller to produce the essential oils. The oils were separated by density using a separation funnel. The fractions containing different concentrations of thymol and carvacrol were obtained by placing the resulting essential oil into a flask coupled to a distillation column, and heating until boiling. Distillation was done until about 30% of the initial volume was left in the flask. The distilled solution was again distilled under the same conditions until the two fractions with different concentrations of thymol and carvacrol were obtained.

Analyses of the resulting fractions showed that OEO1 had higher thymol content (48 – 64% thymol, 23 – 26% carvacrol), whereas OEO2 had higher carvacrol content (3 – 6% thymol, 77 – 82% carvacrol) (Paredes-Aguilar *et al.*, 2007). These OEOs were stored at room temperature (28 ± 2 °C) until used in the experiments.

Bacteria isolates

Samples from shrimp, pond soil and water were collected in 13 shrimp farms in Sonora, México. On each farm, 130 shrimp with signs of bacterial infection were collected and transported to the laboratory to be processed for bacteriological analyses. At the laboratory, shrimp were externally sanitized with 70 % ethanol, and the hepatopancreas was aseptically removed. Organ tissues (≈ 50 mg) were homogenized and diluted with 45 ml of sterile 0.1% peptone water. Tenfold dilutions were prepared and plated in triplicate on Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose Agar (TCBS). Plates were incubated at 30 ± 2 °C for 24 h according to the method proposed by Gracia-Valenzuela *et al.* (2014). Sediments and water samples (one sample per pond) were also used to isolate bacteria. This type of sample was collected in sterile plastic bags, placed in coolers at 4 °C and transported to the laboratory, where the samples were processed to obtain bacterial

pequeñas formando inflorescencias en racimos. Las frutas son pequeñas cápsulas que contienen semillas cafés no mayores a 0.25 mm (Huerta, 1997).

Producción de los aceites esenciales de oregano (OEOs)

Campos de cultivo de *Lippia berlandieri* en Salaises, Chihuahua, fueron el origen del material vegetal. Las hojas fueron secadas y maceradas para preparar los aceites esenciales, de acuerdo a los métodos descritos por Paredes-Aguilar *et al.* (2007). Brevemente, las hojas de orégano secas fueron usadas para hidrodestilación usando un destilador tipo Clevenger con el fin de producir los aceites esenciales. Los aceites fueron separados por densidad usando un embudo de separación. Las fracciones que contienen diferentes concentraciones de timol y carvacrol fueron obtenidas colocando los aceites esenciales resultantes en un frasco acoplado a una columna de destilación y calentado hasta el hervor. Se hizo la destilación hasta que cerca del 30% del volumen inicial quedó en el frasco. La solución destilada fue nuevamente destilada bajo las mismas condiciones hasta que las dos fracciones con diferentes concentraciones de timol y carvacrol fueron obtenidas.

Los análisis de las fracciones resultantes mostraron que el OEO1 tenía mayor concentración de timol (48–64% timol, 23–26% carvacrol), mientras que el OEO2 tuvo mayor contenido de carvacrol (3 – 6% timol, 77 – 82% carvacrol) (Paredes-Aguilar *et al.*, 2007). Estos OEOs fueron almacenados a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) hasta su uso en los experimentos.

Aislados bacterianos

Muestras de camarón, suelo de estanque y agua fueron recolectados en 13 granjas de camarón en Sonora, México. En cada granja, 130 camarones con signos de infección bacteriana fueron recolectados y transportados al laboratorio para ser procesados para análisis bacteriológicos. En el laboratorio, los camarones fueron sanitizados externamente con etanol al 70%, y los hepatopancreas fueron removidos asepticamente. Los tejidos del órgano (≈ 50 mg) fueron homogenizados y diluidos con 45 mL de agua peptonada estéril (0.1%). Diluciones seriales de base 10 fueron preparados y sembrados por triplicado en placas de Agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares y Sacarosa (TCBS). Las placas fueron incubadas a 30 ± 2 °C por 24 h de acuerdo al método propuesto por Gracia-Valenzuela *et al.* (2014). Los sedimentos y muestras de agua (una muestra por

cultures as described above.

Determination of bacteria species

The genera and species of the cultured bacteria were determined by using the commercial kit API20E (BioMérieux, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the API 20E system involves 23 standardized biochemical tests to identify Gram-negative Enterobacteriaceae. This system can identify 108 genera and 104 species of bacteria. The system works as follows: a bacterial suspension is inoculated to each of the test tubes of the system, inducing different reactions to determine a specific biochemical property, revealed by a change of color (or not) in the reaction (after adding catalysts or not), giving a colorimetric interpretation of the bacterial species.

OEOs antibacterial activity

The evaluation of the antimicrobial activity of OEOs compared to antibiotics was done by the inhibition zone test as follows (Roque *et al.*, 2001). Plates with Mueller-Hinton medium added with 2.5% NaCl were inoculated with 100 µL of each bacterial suspension (n = 19) and evenly spread with a glass rod in order to get a uniform bacterial layer. Then, sterile paper circles (5 mm diameter) were individually saturated with 20 µL of each of the OEOs and placed on top of the culture medium. The same procedure was done with the antimicrobials: aviflox™ (AF), florfenicol™ (FF), magnamycine™ (MC), enrofloxacin™ (EF) and oxytetracyclin™ (OTC). For these antibiotics, a concentration of 50 µg/mL was used to saturate each paper disk. A saline solution (2.5 % NaCl) was used as negative control. The plate was incubated at 30 °C overnight and it was observed at 24 and 48 h post-incubation to determine the inhibition zones. The measurement of the diameter (mm) of the inhibition zones was done in triplicate and recorded. It was not possible to include positive controls of pure thymol or carvacrol molecules.

Statistical analyses

Differences between inhibition zone (mm) of the different antimicrobials tested were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test. Multiple comparison analysis between treatments was done with the Mann-Whitney U test (Zar, 1998), using the online

estanque) fueron usados para aislar bacterias. Este tipo de muestras fueron recolectadas en bolsas de plástico estériles, colocadas en hieleras a 4 °C, y transportadas al laboratorio, donde las muestras fueron procesadas para obtener cultivos bacterianos como se describió anteriormente.

Determinación de las especies bacterianas

Los géneros y especies de las bacterias cultivadas fueron determinadas usando el kit comercial API20E (BioMérieux, Francia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, el sistema API 20E involucra 23 pruebas bioquímicas estandarizadas para identificar bacterias Enterobacteriaceae Gram-negativas. Este sistema puede identificar 108 géneros y 104 especies de bacterias. El sistema funciona como sigue: una suspensión bacteriana es inoculada a cada uno de los tubos de prueba del sistema, induciendo diferentes reacciones para determinar una propiedad bioquímica específica, revelada por un cambio de color (o no) en la reacción (después de añadir un catalizador, o no), dando una interpretación colorimétrica de la especie bacteriana.

Actividad antibacteriana de los OEOs

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los OEOs comparado contra antibióticos, fue hecho por la prueba de la zona de inhibición como se describe a continuación (Roque *et al.*, 2001). Placas con medio Mueller-Hinton añadidos con 2.5 % NaCl fueron inoculados con 100 µL de cada suspensión bacteriana (n = 19) y distribuidos uniformemente con un filamento de vidrio con el fin de obtener una capa bacteriana uniforme. Luego, círculos de papel estéril (5 mm diámetro) fueron individualmente saturados con 20 µL de cada uno de los OEOs y colocados sobre el medio de cultivo. El mismo procedimiento fue hecho con los antimicrobianos: aviflox™ (AF), florfenicol™ (FF), magnamicina™ (MC), enrofloxacina™ (EF) y oxitetraciclina™ (OTC). Para estos antibióticos, una concentración de 50 µg/mL fue usada para saturar cada disco de papel. Una solución salina (2.5 % NaCl) fue usada como control negativo. La placa fue incubada a 30 °C por una noche y fue observada a las 24 y 48 h post incubación para determinar las zonas de inhibición. La medición del diámetro (mm) de las zonas de inhibición fue hecho en triplicado y registrado. No fue posible incluir controles positivos de moléculas puras de timol o carvacrol.

Análisis estadísticos

Las diferencias entre las zonas de inhibición (mm) de los diferentes antimicrobianos evaluados fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Análisis de

Kruskal-Wallis calculator (<https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>).

Results

Bacterial isolates

A total of 19 bacterial isolates belonging to seven genera (*Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter* and *Proteus*) and 10 species were obtained from shrimp hepatopancreas, water and/or sediments from the sampled farms (Figure 1). All the isolated bacterial species were gram-negative and were identified using the API20E system. The genera *Pseudomonas* and *Salmonella* had the highest frequency in the samples. These genera were mainly isolated from hepatopancreas. Conversely, *Proteus* was the genus with the lowest frequency. The frequency of these genera or species corresponds to the number of farms where they were found (Table 1 and Figure 1).

Evaluation of OEOs antimicrobial activity

The antimicrobial effect of OEOs evaluated as inhibition zone is shown in Table 2. Overall, the average inhibition halo size (mm) against all the bacteria species for each treatment were: OEO1 26.02, OEO2 23.30,

comparación múltiple entre tratamientos fue hecha con la prueba U de Mann-Whitney (Zar, 1998), usando el calculador Kruskal-Wallis en línea (<https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>).

Resultados

Aislados bacterianos

Un total de 19 aislados bacterianos pertenecientes a siete géneros (*Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter* and *Proteus*) y 10 especies fueron obtenidos de hepatopáncreas de camarón, agua y/o sedimentos de las granjas muestreadas (Figura 1). Todas las especies bacterianas aisladas fueron Gram-negativas y fueron identificadas usando el sistema API20E. Los géneros *Pseudomonas* y *Salmonella* tuvieron la mayor frecuencia en las muestras. Estos géneros fueron principalmente aislados del hepatopáncreas. En contraste, *Proteus* fue el género con la menor frecuencia. La frecuencia de estos géneros o especies corresponde al número de granjas donde fueron encontrados (Tabla 1 y Figura 1).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los OEOs

El efecto antimicrobiano de los OEOs evaluados como zona de inhibición está mostrado en la Tabla 2. En general, el tamaño promedio del halo de inhibición (mm) contra todas

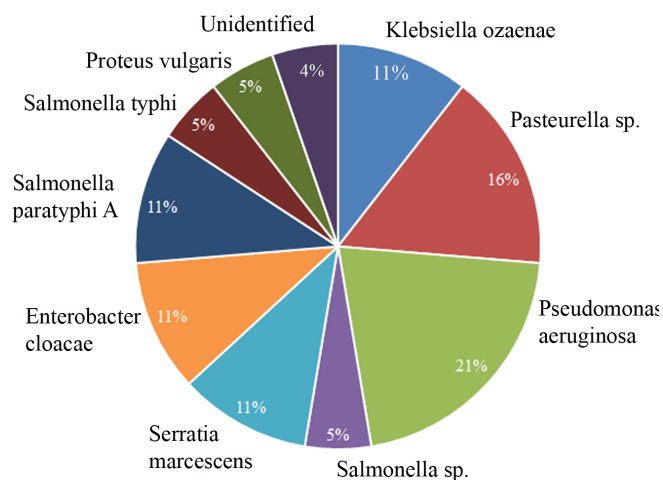


Figure 1. Frequency (%) of the bacterial isolates found in the 13 farms sampled.

Figura 1. Frecuencia (%) de los aislados bacterianos encontrados en las 13 granjas muestreadas.

Table 1.
Bacterial species found using the API20E system.

Tabla 1.
Especies bacterianas encontradas usando el sistema API20E

Isolate code	Genus and species	Species number	Frequency (number of farms found)
C-17	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2
C-15	<i>Klebsiella ozaenae</i>	2	2
C-19	<i>Pasteurella spp</i>	3	3
C-46	<i>Proteus vulgaris</i>	4	1
C-40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	4
C-6	<i>Salmonella spp.</i>	6	1
C-4	<i>Salmonella paratyphi A</i>	7	2
C-5	<i>Salmonella typhi</i>	8	1
C-18	<i>Serratia marcescens</i>	9	2
C-53	<i>Not identified</i>	10	1

Table 2.
Mann-Whitney U multiple comparisons between statistically significant test pairs.

Tabla 2.
Comparaciones múltiples de Mann-Whitney entre pares de prueba estadísticamente significativos.

Treatment pair	Difference	H value	Critical value	P value	Conclusion
OEO1 >> EF	5	10.0394	7.2367	0.001532	significant differences
OEO1 >> OTC	18	27.9712	7.2367	1.23E-07	significant differences
OEO1 >> MC	9	24.9826	7.2367	5.79E-07	significant differences
OEO1 >> AF	4	10.2807	7.2367	0.001344	significant differences
OEO2 >> OTC	15	27.9712	7.2367	1.23E-07	significant differences
OEO2 >> MC	6	19.3575	7.2367	0.00001084	significant differences
FF >> OTC	15	27.922	7.2367	1.26E-07	significant differences
FF >> MC	6	19.9707	7.2367	0.000007864	significant differences
EF >> OTC	13	27.9374	7.2367	1.25E-07	significant differences
EF >> MC	4	12.4108	7.2367	0.0004269	significant differences
OTC >> MC	9	26.2839	7.2367	2.95E-07	significant differences
OTC >> AF	14	27.9867	7.2367	1.22E-07	significant differences
MC >> AF	5	17.1745	7.2367	0.0000341	significant differences

* OEO 1: OEO rich in thymol; OEO 2: OEO rich in carvacrol; FF: florfenicol; EF: enrofloxacin; OTC: oxytetracycline; MC: magnamycin; AF: aviflox.

* OEO 1: OEO rico en timol; OEO 2: OEO rico en carvacrol; FF: florfenicol; EF: enrofloxacin; OTC: oxitetraciclina; MC: magnamicina; AF: aviflox.

florfenicol 22.89, enrofloxacin 21.85, oxytetracycline 8.35, magnamycin 16.96 and aviflox 22.19, respectively.

The Kruskal-Wallis analysis showed significant differences between treatments, although no significant differences were found between the antibacterial proficiency of thymol-rich OEO and carvacrol-rich OEO. Multiple comparisons using the Mann-Whitney U test showed significant differences ($p < 0.007143$) (using the Bonferroni correction) in size of inhibition halos between OEO1 and enrofloxacin, oxytetracycline, magnamycin and aviflox; whereas OEO2 had significant differences with oxytetracycline and magnamycin (Table 2).

The thymol-rich OEO1 had highest antimicrobial activity against *Serratia marcescens* (31 ± 1 mm), *Proteus vulgaris* (30 ± 1 mm), *Salmonella* spp. (29 ± 0.6 mm), *Salmonella paratyphi* (28 ± 1 mm), *Klebsiella ozaenae* (28 ± 1 mm), *Enterobacter cloacae* (27 ± 0.6 mm) and *Pasteurella* spp. (26 ± 1 mm). Likewise, the carvacrol-rich OEO2 had high antimicrobial activity against *Enterobacter cloacae* (28 ± 0.6 mm), *Serratia marcescens* (28 ± 0.6 mm), *Salmonella typhi* (26 ± 1 mm), *Salmonella* spp. (25 ± 0.6 mm), *Salmonella paratyphi* (25 ± 1), *Proteus vulgaris* (24 ± 1 mm), *Pasteurella* spp. (24 ± 0.6 mm) and *Klebsiella ozaenae* (23 ± 1 mm). The antibiotic aviflox had the highest activity against *Salmonella typhi* (28 ± 0.6 mm) and *Pasteurella* spp (26 ± 1). Enrofloxacin showed highest antibacterial activity against *Salmonella* spp. (28 ± 0.6 mm) and *Enterobacter cloacae* (27 ± 1 mm). Last, the antibiotic florfenicol showed highest activity against *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* (28 ± 0.6 mm, respectively) and *Pseudomonas aeruginosa* (26 ± 1 mm) (Table 3).

Discussion

The present study examined the antibacterial effect of two OEOs, one with higher thymol content and the other with higher carvacrol content on 10 bacteria species belonging to the gram-negative Enterobacteriaceae living in the aquatic environment of shrimp ponds. These extracts showed higher antibacterial activity than some commonly used antibiotics (Table 3).

las especies bacterianas para cada tratamiento fueron: OEO1 26.02, OEO2 23.30, florfenicol 22.89, enrofloxacin 21.85, oxitetraciclina 8.35, magnamicina 16.96 y aviflox 22.19, respectivamente.

El análisis Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos, aunque no se encontraron diferencias significativas entre la eficacia antibacteriana del OEO rico en timol y el OEO rico en carvacrol. Las comparaciones múltiples usando la prueba U de Mann-Whitney mostraron diferencias significativas ($p < 0.007143$) (usando la corrección de Bonferroni) en tamaño del halo de inhibición entre OEO1 y enrofloxacin, oxitetraciclina, magnamicina y aviflox; mientras que el OEO2 tuvo diferencias significativas con oxitetraciclina y magnamicina (Tabla 2).

El OEO1 rico en timol tuvo la mayor actividad antimicrobiana contra *Serratia marcescens* (31 ± 1 mm), *Proteus vulgaris* (30 ± 1 mm), *Salmonella* spp. (29 ± 0.6 mm), *Salmonella paratyphi* (28 ± 1 mm), *Klebsiella ozaenae* (28 ± 1 mm), *Enterobacter cloacae* (27 ± 0.6 mm) y *Pasteurella* spp. (26 ± 1 mm). De igual forma, el OEO2 rico en carvacrol tuvo alta actividad antimicrobiana contra *Enterobacter cloacae* (28 ± 0.6 mm), *Serratia marcescens* (28 ± 0.6 mm), *Salmonella typhi* (26 ± 1 mm), *Salmonella* spp. (25 ± 0.6 mm), *Salmonella paratyphi* (25 ± 1), *Proteus vulgaris* (24 ± 1 mm), *Pasteurella* spp. (24 ± 0.6 mm) y *Klebsiella ozaenae* (23 ± 1 mm). El antibiótico aviflox tuvo la mayor actividad contra *Salmonella typhi* (28 ± 0.6 mm) y *Pasteurella* spp (26 ± 1). La enrofloxacin mostró la mayor actividad antibacteriana contra *Salmonella* spp. (28 ± 0.6 mm) y *Enterobacter cloacae* (27 ± 1 mm). Por último, el antibiótico florfenicol mostró la más alta actividad contra *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* (28 ± 0.6 mm, respectivamente) y *Pseudomonas aeruginosa* (26 ± 1 mm) (Tabla 3).

Discusión

El presente estudio examinó el efecto antibacterial de dos OEOs, uno con mayor contenido de timol y el otro con mayor contenido de carvacrol sobre 10 especies bacterianas que pertenecen a las gram-negativas Enterobacteriaceae que viven en el ambiente acuático de los estanques de camarón. Estos extractos mostraron mayor actividad antibacterial que algunos de los antibióticos comúnmente usados (Cuadro 3).

Table 3.
Inhibition zones (average \pm standard deviation in mm) of bacteria isolates exposed to different antimicrobial products.

Tabla 3.
Zonas de inhibición (media \pm desviación estándar en mm) de los aislados bacterianos expuestos a diferentes productos antimicrobianos.

Isolate/species	OEO 1*	OEO2*	FF*	EF*	OTC*	MC*	AF*
<i>Enterobacter cloacae</i> 1	24 \pm 1	20 \pm 1	28 \pm 0.6	21 \pm 1	10 \pm 0.6	19 \pm 1	23 \pm 1
<i>Enterobacter cloacae</i> 2	27 \pm 0.6	28 \pm .6	24 \pm 1	27 \pm 1	10 \pm 0.6	15 \pm 1	24 \pm 0.6
<i>Klebsiella ozaenae</i> 1	28 \pm 0.6	23 \pm 1	23 \pm 1	21 \pm 0.6	6 \pm 0.6	15 \pm 0.6	22 \pm 1
<i>Klebsiella ozaenae</i> 2	28 \pm 1	23 \pm 0.6	20 \pm 0.6	22 \pm 1	8 \pm 0.6	10 \pm 1	23 \pm 0.6
<i>Pasteurella spp</i> 1	22 \pm 0.6	19 \pm 1	24 \pm 1	25 \pm 0.6	11 \pm 1	16 \pm 0.6	26 \pm 1
<i>Pasteurella spp</i> 2	24 \pm 1	24 \pm 0.6	22 \pm 0.6	21 \pm 1	12 \pm 0.6	18 \pm 1	20 \pm 1
<i>Pasteurella spp</i> 3	26 \pm 1	22 \pm 1	21 \pm 1	25 \pm 0.6	9 \pm 1	20 \pm 1	19 \pm 0.6
<i>Proteus vulgaris</i>	30 \pm 1	24 \pm 1	20 \pm 0.6	17 \pm 1	7 \pm 1	17 \pm 0.6	25 \pm 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	22 \pm 0.6	19 \pm 1	23 \pm 1	26 \pm 0.6	8 \pm 0.6	16 \pm 1	22 \pm 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2	22 \pm 0.6	23 \pm 0.6	26 \pm 1	17 \pm 0.6	10 \pm 0.6	24 \pm 1	21 \pm 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3	22 \pm 1	23 \pm 1	22 \pm 0.6	17 \pm 1	8 \pm 0.6	16 \pm 0.6	24 \pm 0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4	22 \pm 0.6	19 \pm 1	25 \pm 0.6	20 \pm 1	9 \pm 0.6	17 \pm 1	20 \pm 1
<i>Salmonella spp.</i>	29 \pm 0.6	25 \pm 0.6	17 \pm 0.6	28 \pm 0.6	7 \pm 0.6	17 \pm 0.6	20 \pm 0.6
<i>Salmonella paratyphi</i> 1	28 \pm 1	25 \pm 1	23 \pm 1	20 \pm 1	10 \pm 1	16 \pm 0.6	20 \pm 1
<i>Salmonella paratyphi</i> 2	28 \pm 0.6	23 \pm 0.6	20 \pm 1	20 \pm 1	9 \pm 0.6	20 \pm 0.6	25 \pm 1
<i>Salmonella typhi</i>	24 \pm 1	26 \pm 1	25 \pm 0.6	15 \pm 1	6 \pm 0.6	11 \pm 0.6	28 \pm 0.6
<i>Serratia marcescens</i> 1	31 \pm 0.6	28 \pm 0.6	22 \pm 1	26 \pm 0.6	6 \pm 1	19 \pm 1	20 \pm 1
<i>Serratia marcescens</i> 2	31 \pm 1	26 \pm 0.6	28 \pm 0.6	20 \pm 1	7 \pm 0.6	22 \pm 1	18 \pm 0.6
<i>Not identified</i>	23 \pm 0.6	19 \pm 0.6	25 \pm 1	26 \pm 1	7 \pm 0.6	15 \pm 1	20 \pm 1

* OEO 1: OEO rich in thymol; OEO 2: OEO rich in carvacrol; FF: florfenicol; EF: enrofloxacin; OTC: oxytetracycline; MC: magnamycin; AF: aviflox.

* OEO 1: OEO rico en timol; OEO 2: OEO rico en carvacrol; FF: florfenicol; EF: enrofloxacin; OTC: oxitetraciclina; MC: magnamicina; AF: aviflox.

The bacterial genera found using the API20E system included *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter* and *Proteus*. Most of these genera have previously been reported to occur in different aquatic environments such as coastal and brackish water (Cohen *et al.*, 2020), coastal and marine waters (Joyner *et al.*, 2014), fresh- and marine water (Singh & Kulshreshtha, 1992), water and soil (Wareth & Neubauer, 2021), shrimp digestive tract (Buglione *et al.*, 2010), and digestive tract of other animals (Drzewiecka, 2016).

Many of these bacteria genera and/or species have been reported to display some degree of antibiotic resistance.

Los géneros bacterianos encontrados usando el sistema API20E incluyeron a *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Proteus*. La mayoría de estos géneros han sido reportados previamente que ocurren en diferentes ambientes acuáticos como el costero y de agua salobre (Cohen *et al.*, 2020), aguas costeras y marinas (Joyner *et al.*, 2014), agua dulce y marina (Singh & Kulshreshtha, 1992), agua y sedimento (Wareth & Neubauer, 2021), tracto digestivo del camarón (Buglione *et al.*, 2010), y tracto digestivo de otros animales (Drzewiecka, 2016).

Muchos de estos géneros de bacterias y/o especies han sido reportadas que presentan algún grado de resistencia

Such species have developed and/or acquired various extended-spectrum β -lactamase enzymes, which inhibit β -lactam antibiotics such as penicillins, cephalosporins, and carbapenems. Genes responsible for enzyme inactivation are often located on mobile genetic elements and provide a risk of transfer to other bacteria (Wareth & Neubauer, 2021).

Among the species reported to contain or produce the carbapenemase- and extended-spectrum β -lactamase include *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella oxytoca* (Cohen et al., 2020). Other species are *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. (Wareth & Neubauer, 2021). In addition, other genera reported in the present study have also been shown to display antibiotic resistance. Examples are the *Salmonella enterica* serovar Corvallis isolated from water in two shrimp farms and showed resistance to erythromycin. Two other *S. enterica* serovar Corvallis isolates from another shrimp farm were resistant to oxolinic acid, sulphonamides, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, ampicillin, doxycycline hydrochloride, erythromycin and chloramphenicol. Nonetheless, they were sensitive to nitrofurantoin and norfloxacin (Banerjee et al., 2012).

Several *Vibrio* species have also been reported to display antibiotic resistance. Water-isolated *V. mimicus* was resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim, sulphonamides, and ampicillin. Isolates of *V. cholerae* were resistant to ampicillin; whereas isolates from shrimp were resistant to doxycycline hydrochloride, ampicillin and tetracycline. An isolate of *V. cholerae* was resistant to doxycycline hydrochloride and tetracycline. Isolates of *V. mimicus* from shrimp and water, and *V. vulnificus* from shrimp, were resistant to ampicillin. Likewise, most *Vibrio* isolates showed resistance to ampicillin, followed by resistance to tetracycline and doxycycline. Two farms had a higher presence of antibiotic-resistant bacteria (one to four antibiotics) than another farm (one to two antibiotics). The species *V. cholerae* showed the widest antibiotic-resistant pattern (Banerjee et al., 2012). Another foodborne bacterial disease of concern is caused by *Salmonella enterica*, not only for its impact on human health but also for the emergence and spread of antibiotic resistant variants worldwide (Santos et al., 2019).

a antibióticos. Tales especies han desarrollado y/o adquirido varias enzimas de espectro extendido de las β -lactamasas, que inhiben los antibióticos β -lactam tales como las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos. Los genes responsables para la inactivación de enzimas a menudo se localizan en elementos genéticos móviles y son un riesgo de transferencia a otras bacterias (Wareth & Neubauer, 2021).

Entre las especies reportadas que contienen o producen las carbapenemasas y β -lactamasas de espectro extendido se incluyen *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca* (Cohen et al., 2020). Otras especies son *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp. (Wareth & Neubauer, 2021). En adición, otros géneros reportados en el presente estudio también han sido mostrados que presentan resistencia a antibióticos. Ejemplos son la *Salmonella enterica* serovar Corvallis aislada del agua en dos granjas de camarón y mostraron resistencia a la eritromicina. Otros dos aislados de *S. enterica* serovar Corvallis de otra granja de camarón fueron resistentes al ácido oxolinico, sulfonamidas, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprima, ampicilina, hidrocloreto de doxiciclina, eritromicina y cloranfenicol. No obstante, estas fueron sensibles a nitrofurantoina y norfloxacin (Banerjee et al., 2012).

Varias especies de *Vibrio* también han sido reportadas que presentan resistencia a antibióticos. La especie *V. mimicus* aislada de agua fue resistente a sulfametoxazol/trimetoprima, sulfonamidas y ampicilina. Aislados de *V. cholerae* fueron resistentes a ampicilina; mientras que vibrios aislados de camarón fueron resistentes al hidrocloreto de doxiciclina, ampicilina y tetraciclina. Un aislado de *V. cholerae* fue resistente al hidrocloreto de doxiciclina y tetraciclina. Aislados de *V. mimicus* de camarón y agua, y *V. vulnificus* de camarón, fueron resistentes a ampicilina. De igual manera, muchos aislados de *Vibrio* mostraron resistencia a ampicilina, seguidos por resistencia a tetraciclina y doxiciclina. Dos granjas tuvieron mayor presencia de bacterias resistentes a antibióticos (uno a cuatro antibióticos) que otra granja (uno a dos antibióticos). La especie *V. cholerae* mostró el más amplio patrón de resistencia a antibióticos (Banerjee et al., 2012). Otra enfermedad bacteriana de consideración en alimentos es causada por *Salmonella enterica*, no solamente por su impacto en la salud humana sino también por la emergencia y dispersión de variantes resistentes a antibióticos a nivel mundial (Santos et al., 2019).

Since the number of multidrug-resistant bacteria species continues to rise and are present in various aquatic environments, strategies to reduce their impact on aquaculture and to restrict their threat to aquatic animal health are urgently needed. Some of such strategies include the use of natural products from plants or seaweeds, which have antimicrobial and growth-promoting properties. Moreover, they represent environmental-friendly alternatives to antibiotic use (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2015; Escobedo-Bonilla, 2021). For example, various plant-derived extracts have been tested against several bacterial pathogens. Such plant extracts include concoctions from barks, stems and roots of *Zingibe officinale*, *Mentha piperita*, *Abarema cochliacarpus*, *Syzygium cordatum*, among others. The precise antimicrobial mechanisms of most plant bioactive components are not yet clarified. Nonetheless, some mechanisms have been suggested such as the disruption of pathogen membranes, interruption of DNA/RNA synthesis and function, interference with intermediary metabolism, coagulation of cytoplasmic constituents, and the interruption of normal cell communication (Santos *et al.*, 2019).

Previously, other studies have used OEOs to evaluate their antibacterial activity *in vitro* against bacteria of the genera *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Vibrio* (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012). Their efficacy was assessed *in vivo* inoculating shrimp with different species of *Vibrio* and then treating them with each of the OEO obtaining promising results (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2014). In the present study, these OEOs showed high efficacy against *Enterobacteriaceae in vitro*. The size of the inhibition halos produced by the two OEOs was similar according to the statistical analysis. The OEO with higher thymol content showed higher average inhibition halos (26.02 mm) than the OEO containing a higher amount of carvacrol (23.30 mm). These two products had higher mean inhibition halo size than the commercial antibiotics tested. The least effective antibiotics were oxytetracycline and magnamycin (Table 3). These results suggest that the two OEOs assayed in this work had antibacterial properties against the tested species of the *Enterobacteriaceae*, many of which are becoming global threats to human and animal health, due to their multidrug resistance variants.

In conclusion, the antibacterial effect of two OEOs, one with higher thymol content and other with higher

Puesto que el número de especies de bacterias multiresistentes a antibióticos continúa aumentando y están presentes en varios ambientes acuáticos, las estrategias para reducir su impacto en la acuicultura y para restringir su amenaza a la salud de animales acuáticos son urgentemente necesarias. Algunas de tales estrategias incluyen el uso de productos naturales de plantas o algas, las cuales tienen propiedades antimicrobianas y estimulantes de crecimiento. Más aún, ellos representan alternativas amigables con el ambiente al uso de antibióticos (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2015; Escobedo-Bonilla, 2021). Como ejemplo, varios extractos derivados de plantas han sido evaluados contra diversos patógenos bacterianos. Tales extractos de plantas incluyen formulados de cortezas, tallos y raíces de plantas como *Zingibe officinale*, *Mentha piperita*, *Abarema cochliacarpus*, *Syzygium cordatum*, entre otras. Los mecanismos antimicrobianos precisos de muchos de los componentes de activos de plantas todavía no están aclarados. Sin embargo, algunos mecanismos han sido sugeridos, como la ruptura de membranas de los patógenos, interrupción de la síntesis y función de DNA/RNA, interferencia con intermediarios del metabolismo, coagulación de constituyentes citoplásmicos, y la interrupción de la comunicación normal de la célula (Santos *et al.*, 2019).

Previamente, otros estudios han usado OEOs para evaluar su actividad antibacterial *in vitro* contra bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012). Su eficacia fue evaluada *in vivo* inoculando camarones con diferentes especies de *Vibrio* y luego tratándolos con cada uno de los OEO obteniendo resultados promisorios (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2014). En el presente estudio, estos OEOs mostraron alta eficacia contra *Enterobacteriaceae in vitro*. El tamaño de los halos de inhibición producidos por los dos OEOs fueron similares de acuerdo a los análisis estadísticos. El OEO con mayor contenido de timol mostró un promedio mayor de halo de inhibición (26.02 mm) que el OEO que contiene mayor cantidad de carvacrol (23.30 mm). Estos dos productos tuvieron un tamaño promedio mayor de halos de inhibición que los antibióticos comerciales evaluados. Los antibióticos menos efectivos fueron oxitetraciclina y magnamicina (Cuadro 3). Estos resultados sugieren que los dos OEOs evaluados en este trabajo tuvieron propiedades antibacterianas contra las especies de *Enterobacteriaceae* evaluadas, muchas de las cuales están volviéndose amenazas globales a la salud humana y animal, debido a sus variantes multiresistentes a antibióticos.

En conclusión, el efecto antibacterial de dos OEOs, uno con mayor contenido de timol y otro con mayor contenido

carvacrol content on 10 gram-negative species of the Enterobacteriaceae, showed higher antibacterial activity *in vitro* than some commonly used antibiotics in aquaculture. The bacterial genera and species found in this study are normally found in marine and brackish aquatic environments, including the shrimp digestive tract. Many of these bacteria have been reported to display some degree of multidrug resistance to antibiotics such as penicillins, cephalosporins, and carbapenems. Therefore, strategies based on natural products with antimicrobial properties to reduce their impact on aquatic animal health are urgently needed. The antimicrobial activity of two OEOs *in vitro* was very effective against 10 bacterial species of Enterobacteriaceae. These natural compounds were significantly efficient to inhibit bacterial growth compared to antibiotics commonly used in aquaculture operations and human health.

Acknowledgments

This work was financially supported by the project 5912.16-P (Tecnológico Nacional de México) given to the first author, and the preparation and writing of the manuscript were supported with the project SIP20210092 (IPN) granted to the corresponding author.

Conflicts of Interest:

The authors declare no conflict of interest.

Referencias

- Banerjee, S., Ooi, M.C., Shariff, M., & Khatoon, H., (2012). Antibiotic resistant *Salmonella* and *Vibrio* associated with farmed *Litopenaeus vannamei*. *The Scientific World Journal*, 2012. 130136-130136. <https://doi.org/10.1100/2012/130136>
- Buglione, C. C. B., Do Nascimento Vieira, F., Pedreira Mourão, J. L., Santiago Pedrotti, F., Jatoba, A., & Laterça Martins, M. (2010). Experimental infection with different bacterial strains in larvae and juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in Santa Catarina State, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 32(3), 291-296. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v32i3.5471>
- Calvo-Irabien, L. M. (2018). Native Mexican aromatic flora and essential oils: Current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. *Industrial Crops and Products*, 111, 807-822. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.044>
- Cid-Pérez, T. S., Nevárez-Moorillón, G. V., Torres-Muñoz, J. V., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* and *Poliomntha longiflora*) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 551-560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00063-8>
- Citarasu, T., (2012). Natural antimicrobial compounds for use in aquaculture. in: Austin, B. (Ed.), *Infectious disease in aquaculture. Prevention and control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 419-456. <https://doi.org/10.153>

de carvacrol sobre 10 especies gram-negativas de las Enterobacteriaceae, mostraron mayor actividad antibacterial *in vitro* que algunos de los antibióticos usados comúnmente en acuicultura. Las especies y géneros bacterianos encontrados en este estudio se encuentran normalmente en ambientes acuáticos marinos y salobres, incluyendo el tracto digestivo del camarón. Muchas de estas bacterias han sido reportadas que presentan algún grado de multiresistencia a antibióticos como las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos. Por lo tanto, estrategias basadas en productos naturales con propiedades antimicrobianas para reducir su impacto en la salud de animales acuáticos son urgentemente necesarios. La actividad antimicrobiana de dos OEOs *in vitro* fue muy eficaz contra 10 especies bacterianas de Enterobacteriaceae. Estos compuestos naturales fueron significativamente eficientes para inhibir crecimiento bacteriano comparado con antibióticos comúnmente usados en operaciones de acuicultura y salud humana.

Agradecimientos

Este trabajo fue financieramente apoyado por el Proyecto 5912.16-P (Tecnológico Nacional de México) dado al primer autor, y la preparación y escritura del manuscrito fue apoyado con el proyecto SIP20210092 (IPN) otorgado al autor de correspondencia.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

[3/9780857095732.3.419](https://doi.org/10.1186/s13756-020-00826-2)

- Cohen, R., Paikin, S., Rokney, A., Rubin-Blum, M., & Astrahan, P., (2020). Multidrug-resistant Enterobacteriaceae in coastal water: an emerging threat. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9,169. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00826-2>
- De Souza, R. C., Da Costa, M. M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Schmidte, D., Caron, B. O., & Copattia, C., (2017). Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis*, 113, 29 - 33. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.013>
- Drzewiecka, D. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microbial Ecology*, 74, 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>
- Escobedo-Bonilla, C. M., (2021). Properties of Mexican oregano (*Lippia* spp.) essential oils and their use in aquaculture. *Science of Spices & Culinary Herbs. Latest Laboratory. Pre-clinical, and Clinical Studies*. 4(52), 93-144. <https://doi.org/10.2174/9789814998123121040006>
- Huerta, C. (1997). Oregano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas*. 3, 8-13.
- González Elizondo, M. S., González Elizondo, M., López Enríquez, I. L., Tena Flores, J. A., Retana Rentería, F. I., Ruacho González, L. & González Güereca, M. C. (2011). *Lippia graveolens* H.B.K. ¿especie o complejo de especies? In: Pérez Santiago, G., Alejandro Iturbide, G., González Castillo, M. P. & González Güereca M. C. (Eds.) El orégano Mexicano: estado actual del conocimiento. Instituto Politécnico Nacional, Durango, Mexico, pp. 11-22. <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8455>
- Gracia-Valenzuela, M. H., Orozco-Medina, C., & Molina-Maldonado, C. (2012). Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica*, 22 (3), 201-206. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972012000300002&lng=es&nrm=iso
- Gracia-Valenzuela, M. H., Vergara-Jimenez, M. J., Baez-Flores, M. E., & Cabrera-Chávez, F. (2014). Antimicrobial effect of dietary organo essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. *Archives of Biological Sciences*, 66 (4), 1367-1370. <https://doi.org/10.2298/ABS1404367G>
- Joyner, J., Wanless, D., Sinigalliano, C.D., & Lipp, E.K., (2014). Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Applied Environmental Microbiology*, 80 (5), 1679-1683. <https://doi.org/10.1128/AEM.02755-13>
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C., Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., Mohny, L. L., Nunan, L. M., & Navarro, S. A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110 (2), 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- López-Villafranco, M. E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Rodríguez, S., & Xolalpa-Molina, S. (2017). Las Verbenaceae empleadas como recurso herbolario en Mexico: una revisión etnobotánica-médica. *Polibotánica*, (44), 195-216. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.15>
- Majolo, C., Barros Da Rocha, S.I., Campos Chagas, E., Maia Chaves, F.C., & Ribeiro Bizzo, H. (2017). Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 48 (5), 2380-2387. <https://doi.org/10.1111/are.13073>.
- Majolo, C., Pilarski, F., Maia Chaves, F. C., Ribeiro Bizzo, H., & Campos Chagas, E. (2018) Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 30 (5), 388-397. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1487343>
- Marasca, S., Battisti, E. K., Durigon, E. G., Peixoto, N. C., Uczay, J., Baldisserotto, B., Schmidt, D., Loro, V. L., Leitemperger, J. W., Salvador, M. J., & Lazzari, R. (2020). Growth, hematology, metabolism, and oxidative parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed diets containing *Lippia alba* leaf. *Aquaculture*, 529, 735730. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735730>
- Menanteau-Ledouble, S., Krauss, I., Santos, G., Fibi, S., Weber, B., & El-Matbouli, M. (2015). Effect of a phytogetic feed additive on the susceptibility of *Onchorhynchus mykiss* to *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115 (1), 57–66. <https://doi.org/10.3354/dao02875>.
- Morales-Covarrubias, M. S., García-Aguilar, N., Bolán-Mejía, M. C. & Puello-Cruz, A. C.(2016). Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured

- at low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122, 57-65. <https://doi.org/10.3354/dao03060>
- Orona-Castillo, I., Salvador-Almazán, A.J., Espinoza-Arellano, J. J., & Vázquez, C. (2017). Recolección y comercialización del orégano (*Lippia* spp) en el semidesierto mexicano, un caso de estudio: Reserva Ecológica Municipal Sierra y Cañón de Jimulco, Mexico. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 41, 684-685. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14153918003>
- Oviedo-Bolaños, K., Rodríguez-Rodríguez, J. A., Sancho-Blanco, C., Barquero-Chanto, J. E., Peña-Navarro, N., Escobedo-Bonilla, C. M., & Umaña-Castro, R. (2021). Molecular identification of *Streptococcus* sp. and antibiotic resistance genes present in Tilapia farms (*Oreochromis niloticus*) from the Northern Pacific region, Costa Rica. *Aquaculture International*, 29, 2337-2355. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00751-0>
- Paredes-Aguilar, M. C., Gastelum-Franco, M. G., Silva-Vázquez, R., & Nevarez-Moorillon, G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Shauer) sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3), 261-267. <https://doi.org/10.35196/rfm.2007.3.261>
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76 (3), 201-214. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H., (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews* 7 (48), 1 - 16. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127048>
- Quiroz-Velázquez, J. D. C., Sánchez-Varela, A., Torres-Ortega, J. A., García-Olivares, J. G., Salazar-Bravo, A., & Hernández-Mendoza, J. L. (2017) Cuantificación por HPLC del contenido de timol y carvacrol en *Lippia graveolens* HBK s.l., nativa de Reynosa, Tamaulipas, México. *Revista Boliviana de Química*, 34 (1), 1 - 6. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426351311005>
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolán-Mejía, M. C., & Gomez-Gil, B. (2001). *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17 (5), 383-387. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00308-9](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00308-9)
- Santos, S. A. O., Martins, C., Pereira, C., Silvestre, A. J. D., & Rocha, S. M., (2019). Current challenges and perspectives for the use of aqueous plant extracts in the management of bacterial infections: The Case-Study of *Salmonella enterica* Serovars. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, 20 (4), 940. <https://doi.org/10.3390/ijms20040940>.
- Sindermann, C. J. (1984). Disease in marine aquaculture. *Helgolander Meeresunters* 37, 505-530. <https://doi.org/10.1007/BF01989327>
- Singh, B. R., & Kulshreshtha, S. B. (1992). Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of *Klebsiella pneumoniae* from seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 16 (4), 349-352. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90037-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90037-4)
- Skandamis, P. N. & Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (6), 1011-1022. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01467.x>
- Wareth, G. & Neubauer, H., (2021). The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation. *Veterinary Research*, 52 (1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00875-w>
- Zar, J.H. (1998). *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall.
- Zhu, F. (2020). A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture*. 526, 735422. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>