



DOCINADE

Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo
Énfasis en Gestión de Recursos Naturales

Tesis de Doctorado

**Potencial de los extractos vegetales de *Lippia alba*
(Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (1925) y *Lippia*
graveolens Kunth (1818) en la prevención de
infecciones por bacterias patógenas Gram-negativa
en los cultivos de tilapia en Guatemala.**

Josué R. García Pérez

Dr. Juan B. Ulloa Rojas
Director de Tesis

Dra. Susana E. Mendoza Elvira
Asesor de Tesis

Dr. Juan F. Pérez Sabino
Asesor de Tesis

Ciudad de Guatemala, Guatemala, septiembre del 2023

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Jose Pablo Jiménez Madrigal
Representante de la Dirección de Posgrados TEC

Dr. David A. Valverde Barquero
Coordinador General DOCINADE

Dr. Juan B. Ulloa Rojas
Director de tesis

Dra. Susana E. Mendoza Elvira
Miembro del Comité Asesor de Tesis

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
Miembro del Comité Asesor de tesis

Josué Rodolfo García Pérez
Sustentante

Tabla de contenidos

Declaración de autenticidad.....	6
Agradecimientos.....	7
Dedicatoria	8
Resumen	9
Palabras claves	10
Abstract	11
Keywords.....	12
1. Introducción	13
2. Objetivos.....	18
3. Síntesis.....	19
4. Artículo 1	25
5. Comunicación corta 1	44
6. Artículo 2	47
7. Artículo 3	69
8. Artículo 4	90
7. Discusión global.....	119
8. Conclusiones y recomendaciones.....	127
8. Referencias.....	129
9. Anexos.....	134

Índice de figuras

Principales patologías externas: ulcera cutánea con áreas hiperémicas en diversas partes del cuerpo.....	33
Principales patologías internas: hígado friable y decolorado, vasculitis en hígado, congestión y hemorragia intestinal.....	33
Análisis de correspondencia entre las bacterias patógenas aisladas y la signología externa e interna más común.	34
Antimicrobial activity of different organic extracts and essential oil from <i>L. graveolens</i> and <i>L. alba</i> against <i>Aeromonas</i> spp.....	57
Antimicrobial activity of <i>L. graveolens</i> and <i>L. alba</i> against <i>Aeromonas</i> spp., resistance to oxytetracycline.....	58
GC chromatogram of essential oils from <i>Lippia graveolens</i> collected from: a) El Progreso (I: cis-Dihydro-β-terpineol), b) Chiquimula (II: Carvacrol) and c) Zacapa (III: Thymol) departments.....	77
Biochemical parameters (mean ± SEM) from juvenile tilapia of the GIFT strain (<i>O. niloticus</i>) fed different <i>L. graveolens</i> essential oil inclusion levels for 30 days.....	101
The activity of digestive enzymes (U mg protein-1) (mean ± SEM) of juvenile tilapia of the GIFT strain (<i>O. niloticus</i>) fed different levels of essential of <i>L. graveolens</i> essential oil for 30 days.....	105
Survival rate obtained in different groups of juvenile tilapia of the GIFT strain (<i>O. niloticus</i>) fed with different essential oil inclusion levels of <i>L. graveolens</i> after challenge with <i>A. hydrophila</i>	106

Índice de tablas

Signología macroscópica externa e interna más frecuente, en los aislamientos bacterianos.....	31
Susceptibilidad bacteriana a los antibióticos de mayor uso en acuicultura en Guatemala.....	35
Susceptibilidad bacteriana del extracto de <i>L. graveolens</i> y el antibiótico de mayor uso en la acuicultura guatemalteca.	45
Yield extraction for <i>L. graveolens</i> and <i>L. alba</i> with different extraction methods.....	54
Antimicrobial potential of <i>L. graveolens</i> and <i>L. alba</i> against <i>Aeromonas</i> spp.	55
Composition of essential oils (%) in <i>L. graveolens</i> and <i>L. alba</i>	59
Chemical composition (%) of the three chemotype essential oils from <i>Lippia graveolens</i>	78
<i>Antibacterial activity of the three chemotype essential oils from L. graveolens against A. hydrophila</i>	82
Growth performance and feeding utilization in juvenile tilapia of the GIFT variety (<i>O. niloticus</i>) fed different of essential oil of inclusion levels of <i>L. graveolens</i> for 30 days.....	99
Hematological parameters of juvenile tilapia of the GIFT strain (<i>O. niloticus</i>) fed different inclusion levels of <i>L. graveolens</i> essential oil for 30 days.....	102
Morphological erythrocytes analysis of juvenile tilapia of the GIFT variety (<i>O. niloticus</i>) fed different inclusion levels of essential oil from <i>L. graveolens</i> for 30 days.....	103
Morphological analysis (mean \pm SEM) of the liver and intestine of juvenile tilapia of the GIFT variety (<i>O. niloticus</i>) fed different levels of essential oil from <i>L. graveolens</i> for 30 days.....	104

Declaración de autenticidad

Yo Josué Rodolfo García Pérez, estudiante del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo, declaro que la Tesis Doctoral que presento para su exposición y defensa titulada “Potencial de los extractos vegetales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (1925) y *Lippia graveolens* Kunth (1818) en la prevención de infecciones por bacterias patógenas Gram-negativa en los cultivos de tilapia en Guatemala” y comité asesor de tesis son el Dr. Juan B. Ulloa Rojas (director de tesis), Dra. Susana E. Mendoza Elvira (asesor) y el Dr. Juan Francisco Pérez Sabino (asesor), es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo. Este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Ciudad de Guatemala, Guatemala a 22 de septiembre de 2023.

Josué Rodolfo García Pérez



Agradecimientos

Agradezco a la Universidad de San Carlos de Guatemala por cofinanciar mi estudio de doctorado. Me complace que mi doctorado haya dado lugar a resultados interesantes por los que quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi Tutor de Tesis, Juan Ulloa Rojas, por comprometerse a apoyarme, guiarme y alentarme a pesar de los desafíos que surgieron debido a la pandemia Covid-19 y la poca ayuda de mi lugar de trabajo. Además, agradezco al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Profesor-Investigador de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México, así como a la Dra. Paula Gabriela Vissio y a la Dra. Daniela Irina Pérez Sirkin, Profesoras e investigadoras del Laboratorio de Neuroendocrinología del Crecimiento y la Reproducción de la Universidad de Buenos Aires, quienes fueron de gran ayuda en el ensayo *In vivo* a través de sus enseñanzas y apoyo. Valoro sinceramente su contribución y apoyo a mi doctorado.

Además, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi esposa, Elisa Blanda, por su incansable aliento y apoyo durante mi trayecto de estudios. Los recuerdos de las tardes que dedicamos juntos a realizar biometrías y a limpiar el sistema RAS, que construimos con tenacidad, quedarán grabados en mi memoria. Su compromiso inquebrantable, incluso mientras estaba embarazada de seis meses, es admirable. Estaré eternamente agradecido por su presencia constante y por su amor incondicional, que fueron fundamentales para mi éxito académico.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres, José García y Guadalupe Pérez, y a mi hermano, Carlos García, por brindarme apoyo moral y aliento.

Dedicatoria

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi padre José Guadalupe García Cermeño, quien falleció durante el desarrollo de mis estudios. Gracias por todo papá, y especialmente por enseñarme que el éxito viene solo a través del esfuerzo y la lucha continua, a pesar de las adversidades que la vida nos pone en nuestro camino.

Además, deseo dedicar este trabajo a mi esposa Elisa y mi hijo José Riccardo, ya que a lo largo de este proceso han sido mis mayores motivaciones para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Esta tesis no solo es una prueba de mi esfuerzo y dedicación, sino también una muestra de mi amor y compromiso con ustedes y con su futuro. Cada página escrita y cada hora dedicada a este trabajo han sido pensando en ustedes y en cómo puedo ayudarlos a construir un mejor futuro. Espero que este trabajo sea un legado para ti José Riccardo, que te puedas sentir orgulloso de compartir con tus amigos y, sobre todo, que te inspire a perseverar en tus metas con pasión y determinación.

Resumen

La industria acuícola de tilapia en Guatemala ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años, alcanzando una producción de alrededor de 16,000 toneladas métricas (TM) en 2021. Sin embargo, este crecimiento ha venido acompañado de desafíos, especialmente en relación con enfermedades bacterianas que afectan a los organismos acuáticos. La alta densidad de siembra, el manejo deficiente de los sistemas de cultivo, las condiciones ambientales cambiantes, la calidad del agua y la nutrición deficiente pueden debilitar el sistema inmunológico de los organismos acuáticos, volviéndolos más susceptibles a infecciones bacterianas. Los antibióticos han sido la terapia convencional para controlar estas enfermedades, pero su uso excesivo ha generado resistencia bacteriana y plantea riesgos ambientales y de salud.

La etnobotánica se ha propuesto como una alternativa para controlar patógenos en la acuicultura de manera más sostenible. Las plantas de la familia Verbenaceae, como *Lippia* spp., son conocidas por sus propiedades antibacterianas. Por lo tanto, el siguiente trabajo doctoral se dividió en tres capítulos, con el fin de evaluar la efectividad de *L. graveolens* y *L. alba*, a nivel *in vitro* e *in vivo*.

En el primer capítulo, se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de los patógenos bacterianos y su resistencia a los antimicrobianos en los cultivos de tilapia en Guatemala. Se realizaron muestreos en los principales centros de producción de tilapia, se evaluaron los signos clínicos más comunes que afectan a los peces en cultivo, se aislaron los patógenos primarios y se realizaron pruebas de sensibilidad frente a los antibióticos más utilizados en la acuicultura guatemalteca. Los resultados revelaron que las especies de mayor frecuencia son *Aeromonas hydrophila* y *A. sobria*, se detectó que estas cepas bacterianas presentaron una preocupante resistencia a los antibióticos oxitetraciclina y fosfomicina, lo que evidenció el uso indiscriminado de estos medicamentos en Guatemala.

El segundo capítulo evaluó la capacidad antimicrobiana que poseen los extractos y aceites esenciales de las plantas: *L. alba* y *L. graveolens* obtenidos, por medio de diversas metodologías y diferentes solventes de extracción. La actividad antimicrobiana se evaluó utilizando *A. hydrophila* y *A. sobria* como modelos biológicos, dado que fueron las bacterias más prevalentes en los sistemas acuícolas de Guatemala durante el período de 2018-2019.

Los resultados revelaron que el aceite esencial de *L. graveolens* demostró ser altamente efectivo en la inhibición del crecimiento bacteriano, evidenciado por la formación de halos de inhibición significativos. Los extractos obtenidos a través de diversas técnicas también mostraron actividad antibacteriana, aunque en menor medida en comparación con el aceite esencial. En contraste, *L. alba* mostró una actividad antibacteriana limitada, siendo el aceite esencial la única forma de extracto que generó un efecto significativo. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *L. graveolens* de diferentes quimiotipos en Guatemala, encontrando que el quimiotipo con mayor contenido de timol fue el más efectivo contra *A. hydrophila*, no se evidencia efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos por la combinación de los destinos quimiotipos.

Finalmente, en el capítulo tres se realizó un estudio en el que se incorporó el aceite esencial de *L. graveolens* quimiotipo timol en la dieta de juveniles de tilapia, con el fin de evaluar los efectos sobre el crecimiento, utilización del alimento, parámetros hematobioquímicos, histomorfometría del intestino y el hígado, enzimas digestivas y desafío bacteriano con la bacteria *A. hydrophila*. Los resultados mostraron que la incorporación del aceite esencial de *L. graveolens* quimiotipo timol mejoró el crecimiento, la utilización del alimento y la salud de los peces, sin efectos adversos en la histología hepática e intestinal. Además, se observó un aumento en la actividad de las enzimas digestivas y una mayor resistencia a la infección por *A. hydrophila*.

El presente trabajo doctoral se centró en abordar los desafíos de las enfermedades bacterianas en la acuicultura de tilapia en Guatemala. Demostró que el aceite esencial de *L. graveolens*, rico en timol, puede ser una alternativa efectiva y sostenible para reducir el uso de antibióticos, mejorar el crecimiento y la salud de los peces, y aumentar la resistencia a las infecciones. Sin embargo, es importante la necesidad de regulaciones gubernamentales para controlar el uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura y promover alternativas más seguras y sostenibles.

Palabras claves

Acuicultura, tilapia, orégano, aceite esencial, Guatemala, *Aeromonas*

Abstract

The Guatemala tilapia aquaculture industry has significant growth in recent years, reaching a production of around 16,000 MT in 2021. However, this growth has been accompanied by challenges, especially concerning bacterial diseases affecting aquatic organisms. High stocking density, poor management, fluctuation of environmental conditions, water quality, and inadequate nutrition can weaken the immune system of aquatic organisms, making them more susceptible to bacterial infections. Antibiotics have been the conventional therapy for controlling these diseases, but their excessive use has led to bacterial resistance and poses environmental and health risks.

Ethnobotany has been proposed as an alternative to more sustainable pathogen control in aquaculture. Plants in the Verbenaceae family, such as *Lippia* spp., are known for their antibacterial properties. Therefore, the following doctoral work was divided into three chapters to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effectiveness of *L. graveolens* and *L. alba*.

In the first chapter, a comprehensive assessment of bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia farming in Guatemala was carried out. Sampling was carried out on the major tilapia production farms, common clinical signs affecting cultured fish were evaluated, primary pathogens were isolated, and sensitivity tests were performed against the most used antibiotics in Guatemalan aquaculture. The results revealed that the most frequent species were *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria*, and these bacterial strains exhibited resistance to oxytetracycline and fosfomicin antibiotics, indicating the indiscriminate use of these medications in Guatemala.

The second chapter evaluated the antimicrobial capacity of extracts and essential oils of *L. alba* and *L. graveolens*, using different extraction methodologies and different solvents. Antimicrobial activity was assessed using *A. hydrophila* and *A. sobria* as biological models, as they were the most prevalent bacteria in Guatemalan aquaculture systems during the 2018-2019 period. The results showed the essential oil of *L. graveolens* was highly effective in inhibiting bacterial growth, as evidenced by the formation of significant inhibition zones. Extracts obtained through various techniques also showed antibacterial activity, although less than essential oil. In contrast, *L. alba* exhibited limited antibacterial activity, with essential oil being the only extract form that generated a significant effect.

Furthermore, the antimicrobial activity of *L. graveolens* essential oils of different chemotypes was evaluated in Guatemala, revealing that the chemotype with the highest thymol content was the most effective against *A. hydrophila*, with no synergistic, additive, or antagonistic effects observed through the combination of different chemotypes.

Finally, in the third chapter, a study was conducted in which the essential oil of the *L. graveolens* chemotype thymol was incorporated into the diet of juvenile tilapia to assess the effects on growth, feed utilization, hematobiochemical parameters, intestinal and liver histomorphometry, digestive enzymes, and bacterial challenge with *A. hydrophila*. The results showed that the incorporation of the essential oil of *L. graveolens* thymol chemotype improved growth, feed utilization, and fish health, without adverse effects on liver and intestinal histology. Additionally, an increase in digestive enzyme activity and greater resistance to *A. hydrophila* infection were observed.

This doctoral work focused on the challenges of bacterial diseases in the aquaculture of tilapia in Guatemala. It showed that the essential oil of *L. graveolens*, with a high amount of thymol, can be an effective and sustainable alternative to reduce antibiotic use, improve fish growth and health, and improve resistance to infections. However, there is a need for government regulations to control the indiscriminate use of antibiotics in aquaculture and promote safer and more sustainable alternatives.

Keywords

Aquaculture, tilapia, oregano, essential oil, Guatemala, *Aeromonas*

1. Introducción

Durante las últimas cinco décadas, la acuicultura a nivel mundial ha experimentado un crecimiento notable. La producción acuícola ha aumentado significativamente, pasando de alrededor de 3.7 millones TM en 1970 a más de 126 millones TM en 2021. En el año 2020, la acuicultura contribuyó en un estimado del 49.2% a la producción mundial de animales acuáticos, consolidándose como una industria clave en la producción de alimentos (FAO, 2022). Este sector ha sido capaz de responder a la creciente demanda de productos pesqueros, ayudando a satisfacer las necesidades alimentarias de una población global en constante aumento (Edwards, 2015; Calixto et al., 2020). Se estima que la producción de la acuicultura continental de peces es dominada principalmente por el grupo de carpas (*Cyprinus spp*) con un 57.8%, seguido por el grupo de las tilapias (*Oreochromis spp*) con un 11.2 %, siendo este último grupo el de mayor importancia para la región Latinoamérica.

En Centroamérica, la producción de tilapia ha experimentado un crecimiento lento en comparación con los países asiáticos. Según datos de la FAO (2022), la producción centroamericana pasó de 13,260 TM en el año 2000 a 70,976.85 TM en 2021. Sin embargo, el comercio de la tilapia se ha expandido con rapidez, especialmente en los mercados norteamericanos de filetes frescos y congelados (Zimmermann, 2008; López-Paredes et al. 2020). En cuanto a los mayores productores de tilapia en presentación entera en la región centroamericana, Honduras lidera la lista con un 41.8%, seguido de Guatemala con un 22.5%, juntos representan cerca del 64.4% de la producción total de tilapia en la región.

En Guatemala, la acuicultura se inicia en el año 1954 con el Programa de Piscicultura Rural, en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO); aunque formalmente, la producción acuícola comienza a desarrollarse en 1990. Para finales del 2001, la producción en Guatemala se incrementó de manera exponencial, y actualmente, se estima que esta es cercana a 16,000 TM anuales.

La intensificación de la producción acuícola alrededor del mundo ha generado problemas ecológicos y patológicos. A nivel ecológico, se observan problemas como la reducción de los niveles de oxígeno disuelto en el agua, la acumulación de materia orgánica en el lecho acuático y el aumento de nutrientes (nitrógeno y fósforo) que promueven la eutrofización de los cuerpos de agua (Islam, 2005; Schwitzguébel & Wang, 2007; Tello et al., 2010).

Además, mayor competencia en el uso del agua, escapes accidentales de animales a ambientes naturales donde compiten por recursos con especies autóctonas, así como la proliferación de patógenos (por ejemplo, bacterias, virus y hongos) (Iwama, 1991; David et al., 2015; Edwards, 2015; Calixto et al., 2020). Estos impactos han afectado las poblaciones silvestres de organismos acuáticos, disminuyendo su abundancia y diversidad. Además, el deterioro del hábitat puede ocasionar la muerte de peces y otros organismos, afectando su calidad de vida y su capacidad reproductiva. También han afectado directamente la calidad del agua (Silva et al., 2013).

Por otra parte, a nivel mundial, las bacterias son el grupo de patógenos que representa una de las mayores amenazas para el éxito en la producción acuícola. En los sistemas de producción de tilapia en Guatemala, se reportan mortalidades por patógenos bacterianos entre el 20% y el 30%. En algunos casos extremos, se ha llegado a registrar hasta el 90% de mortalidad. Las familias bacterianas más frecuentemente encontradas en estos casos son: Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae, Pasteurellaceae, Aerococcaceae, Comamonadaceae, Streptococcaceae, Alteromonadaceae y Enterobacteriaceae (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015). Dentro de las bacterias más predominantes a nivel mundial se encuentran: *Aeromonas hydrophila*, *A. liquifaciens*, *A. punctata*, *A. sobria*, *Edwardsiella tarda*, *Flexibacter columnaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Streptococcus iniae* y *S. agalactiae* (Plumb & Hanson, 2010; Chitmanat, et al., 2016; Mzula, et al., 2020).

La prevención y control de enfermedades se han convertido en la prioridad para la sostenibilidad de esta industria acuícola. En la praxis tradicional, para controlar las mortalidades elevadas, se utilizan medicamentos de uso veterinario de amplio espectro, ya sea suministrados en el medio de cultivo y/o a través del alimento, con el fin de controlar y prevenir la infección de diversos patógenos bacterianos. A nivel global se utilizan diversos antibióticos, siendo los más comunes, en los países de mayor producción, la oxitetraciclina, sulfadiazina y florfenicol, y con menor frecuencia: enrofloxacin, eritromicina, sulfametoxazol, sulfadimidina y trimetoprim, entre otros (Mo et al., 2017). El uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos (antibióticos) en la acuicultura, resulta en la contaminación del agua y sedimentos, promoviendo una presión selectiva y creando reservorios de bacterias resistentes a los medicamentos (Espinosa & Bermúdez, 2012).

En América Latina, se han registrado casos de contaminación de la biota por contaminantes emergentes (antibióticos), con énfasis en Brasil y México. En estos países se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la bioacumulación de dichas sustancias en peces comestibles y su impacto directo en la salud humana. Los resultados revelan la presencia de fluoroquinolonas, quinolonas y tetraciclinas por encima del límite de detección en tejidos de tilapia del Nilo. Específicamente, los antibióticos oxitetraciclina (OXTC), enrofloxacin (ENRO) y florfenicol (FFC), han sido identificados como los más comunes (Reichert et al., 2019).

La acuicultura guatemalteca al igual que la del resto del mundo, está afrontando serios problemas sanitarios, por la aparición de nuevos agentes bacterianos y resistentes a los antibióticos disponibles. En la última década, se ha incrementado la tendencia al uso de productos ecológicos. De hecho, los consumidores prefieren, con mayor frecuencia, productos de sistemas donde se hayan reemplazado los antibióticos por agentes antimicrobianos naturales (Gabriel, 2019; Zhu, 2020; Dawood et al., 2022).

Una de las terapias alternativas más utilizadas a nivel mundial es el uso de fitoterapéuticos o también conocidos como fitobióticos. En general estos compuestos contienen sustancias activas como glucósidos, ácidos orgánicos, polisacáridos, alcaloides, taninos y flavonoides (Dawood et al., 2022), que están estrechamente relacionados con muchas funciones en los animales acuáticos; como la mejora en la respuesta inmunológica, el metabolismo, crecimiento, asimilación de nutrientes, entre otras funciones (Citarasu, 2010; Gabriel, 2019; Dawood et al., 2022). Los fitobióticos presentan varias ventajas, como una baja residualidad y menor contaminación ambiental. Además, todavía no se ha demostrado que su uso provoque resistencia antimicrobiana o que cause enfermedades por el consumo de estos (Zhu, 2020). Por lo tanto, el uso de fitobióticos puede reemplazar gradualmente a las drogas químicas sintéticas y las hormonas como aditivos en las dietas de los organismos acuícolas, promoviendo así una acuicultura verde donde los productos hidrobiológicos sean más seguros para el consumo humano.

En América Latina, en diversos países se han utilizado extractos de plantas medicinales, condimentarias y aromáticas en la acuicultura como parte de prácticas de manejo y cuidado de los organismos acuáticos, siendo los países pioneros Brasil, México, Cuba, Perú y Chile (Ruiz-Delgado, 2020).

Se estima que se ha evaluado el efecto terapéutico y profiláctico de más de 40 productos vegetales en especies acuáticas, tanto de consumo, como de ornato, demostrado que los extractos de plantas medicinales tienen propiedades beneficiosas para los organismos acuáticos, promoviendo su salud y bienestar (Ruiz-Delgado, 2020). Dichos productos vegetales se han utilizado en la acuicultura con el propósito de mejorar la resistencia a enfermedades, fortalecer el sistema inmunológico, estimular el crecimiento, mejorar la utilización de los nutrientes y el desarrollo adecuado de los peces y otros organismos acuáticos (Dawood et al., 2022).

Estos avances en la utilización de productos vegetales en la acuicultura muestran un enfoque más natural y sostenible para el manejo de enfermedades y el fortalecimiento de las poblaciones acuáticas. Además, destacan la importancia de la investigación científica y la colaboración internacional en el desarrollo de prácticas acuícolas más saludables y respetuosas con el ambiente. A pesar de los beneficios potenciales de las plantas medicinales en la acuicultura, existe una deficiencia en la investigación de su uso en este campo en países como Guatemala. A nivel regional, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo en una escala pequeña, específicamente a nivel de laboratorio. Estos estudios han demostrado la eficacia de varios productos en condiciones experimentales. Sin embargo, aún persiste la incertidumbre acerca de si estos resultados pueden replicarse en granjas acuícolas comerciales, donde factores bióticos y abióticos pueden influir en su efectividad (Burt, 2004; Nazzaro et al., 2013; Reyes-Jurado et al., 2015; Höferl et al., 2020). Además, la falta de transferencia de los hallazgos científicos sobre las plantas medicinales y su uso en la acuicultura dificulta la implementación de estas alternativas en la práctica. Tal es el caso de la planta conocida como orégano de las Familias: Lamiaceae y Verbenaceae, la cual a nivel mundial tiene descritas más de 40 especies, aunque las dos especies más comunes son el orégano mediterráneo del género *Origanum* y el orégano mexicano del género *Lippia*. Este último es el más utilizado en Centro y Sudamérica (Pascual et al., 2001). En Guatemala se han reportado aproximadamente 13 especies, siendo *L. graveolens*, *L. alba*, *L. salamensis*, *L. chiapasensis*, *L. dulcis* y *L. cardiostegia* las de mayor distribución y uso en la medicina alternativa (Standley & Williams, 1970). Etnobotánicamente, *L. graveolens* se conoce como orégano mexicano, es un arbusto esbelto perenne aromático de hasta 2 m de altura, tiene ramas cortas y pilosas, con hojas en los pecíolos, generalmente de 5 a 10 mm de largo (Standley & Williams, 1970).

Este arbusto tiene inflorescencias en espigas capitadas axilares, caracterizadas por flores blancas, sésiles y zigomorfas, hermafroditas y autocompatibles (Ocampo-Velázquez et al. 2009).

En la mayoría de las especies del género *Lippia*, todas las partes de la planta contienen aceites esenciales, sin embargo, el mayor contenido de estos se encuentra en las hojas o partes aéreas (Pascual et al., 2001). En general, *L. graveolens* se obtiene principalmente de poblaciones silvestres, que crecen en diversas condiciones ecológicas, desde tierras semiáridas hasta subhúmedas. En Guatemala se han identificado tres quimiotipos del aceite esencial de *L. graveolens*: carvacrol, timol y un quimiotipo menor llamado sesquiterpeno: (*E*)-cariofileno también conocido como quimiotipo mixto debido a su variabilidad de metabolitos (Salgueiro et al., 2003; Pérez-Sabino et al., 2012), lo cual puede ocasionar diversos resultados en las pruebas microbiológicas.

Los compuestos carvacrol y timol se han investigado en todo el mundo como fuente de compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, antioxidantes y una función potencial en la prevención de enfermedades de los peces (Leyva- López et al., 2017; García-Pérez et al., 2019; Bautista-Hernández et al., 2021). Ambos han sido probados para la inhibición de bacterias Gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*) y bacterias Gram-negativas (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*), entre otras (Hernández et al., 2009; Arana-Sánchez et al., 2010; Castellanos-Hernández et al., 2020; Martínez et al., 2021). Desafortunadamente, el género *Lippia* presenta una variabilidad morfológica y polimorfismo químico, que afecta principalmente a la composición del aceite esencial (Tezara et al., 2014), por lo cual su uso como bactericida podría generar resultados distintos al comparar los distintos reportes en la literatura.

Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de terapias alternativas para el control de enfermedades por bacterias patógenas Gram-negativas, en la producción de tilapia, a través de la incorporación de extractos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown y *Lippia graveolens* (Kunth) de forma *in vitro* e *in vivo*. Con el fin de promover una alternativa segura y sostenible para mejorar la salud y el crecimiento de los peces, validando a nivel de laboratorio el uso de este producto natural para transferirlo a la acuicultura guatemalteca.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de los extractos vegetales de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown y *Lippia graveolens* (Kunth), para prevenir la infección por las bacterias patógenas Gram-negativas de mayor frecuencia en los cultivos de tilapia de Guatemala

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar las bacterias patógenas Gram-negativas más frecuentes en los cultivos de tilapia de Guatemala.
2. Determinar la capacidad antimicrobiana (*in vitro*) de los extractos *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown y *Lippia graveolens* (Kunth), sobre las bacterias patógenas Gram-negativas de mayor frecuencia en los cultivos de tilapia de Guatemala.
3. Determinar la efectividad de la incorporación del extracto vegetal, con mayor capacidad antimicrobiana en la dieta de tilapias infectadas.

3. Síntesis

La industria acuícola de tilapia en Guatemala ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años, produciendo alrededor de 16,000 TM de tilapia en 2021, según datos de la FAO (2022). Este crecimiento promedio de 28.51% desde el año 2000 ha generado una importante fuente de proteína animal y una fuente de ingresos para la población guatemalteca. Sin embargo, junto con el crecimiento de la producción acuícola, han surgido una serie de desafíos, tanto de naturaleza ecológica como patológica. En particular, los problemas patológicos representan una preocupación significativa en el sector acuícola. La alta densidad de siembra, el manejo deficiente de los sistemas de cultivo, las fluctuaciones ambientales, la mala calidad del agua y la mala nutrición pueden debilitar el sistema inmunológico de los organismos acuáticos, volviéndolos más susceptibles a infecciones bacterianas, especialmente por patógenos facultativos y oportunistas (García-Pérez et al., 2021).

En los últimos años, la industria del cultivo de tilapia en Guatemala y a nivel mundial se ha visto significativamente afectada por el surgimiento de enfermedades infecciosas, especialmente de origen viral y bacteriano, siendo las bacterias más citadas: *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *Lactococcus garvieae*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella noatunensis subsp. orientalis*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda*, *E. anguillarum*, *E. piscicida*, *Aeromonas hydrophila*, *A. liquifaciens*, *A. punctata*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. shuberti*, *A. dhakensis* (Plumb & Hanson, 2010; Dong et al., 2014, 2015, 2019; Chitmanat, et al., 2016; Mzula, et al., 2020; García-Pérez et al., 2021).

Durante las últimas décadas, los enfoques convencionales para controlar las enfermedades en la acuicultura han tenido un éxito limitado en la prevención, el control y el tratamiento de las enfermedades de los peces u otros organismos. En la práctica tradicional, para reducir altas mortalidades, controlar y prevenir la infección por diversos patógenos bacterianos, se ha utilizado un amplio número de medicamentos veterinarios de amplio espectro (Espinosa & Bermúdez, 2012; Rico et al., 2013; Mo et al., 2017), siendo los antibióticos más utilizados: florfenicol, la oxitetraciclina, la enrofloxacina, el cloranfenicol, la eritromicina y la trimetoprima + sulfametoxazol (Valladao, Gallani & Pilarski, 2014; Mo et al., 2017).

A pesar de que se ha comprobado durante los últimos años que dichos productos son altamente peligrosos para el medio ambiente y los seres vivos, ya que pueden bioacumularse en los tejidos de los organismos, lo cual provoca riesgo para el consumidor final (Love et al., 2011).

Siguen siendo la terapia por excelencia para controlar enfermedades de origen bacteriano en la acuicultura. Por lo que el abuso y uso indiscriminado ha estado generando bacterias patógenas resistentes a los medicamentos.

En Guatemala solo existen un antibiótico registrado para el uso en la producción de tilapia; oxitetraciclina (Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación [MAGA], 2023). El número reducido de opciones para tratar las enfermedades bacterianas permite un abuso de este, provocando que los productores cada vez utilizan mayor cantidad para tratar organismos enfermos, o bien utilizan antibióticos recomendados para otras especies, e inclusive medicamentos para otras industrias pecuarias como lo es la gentamicina y fosfomicina. En el caso de esta última, fue utilizada durante muchas décadas para la industria del camarón en Guatemala, y en la actualidad se observa resistencia a las bacterias *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens* y *B. pseudomalle*, aisladas de los sistemas acuícolas de tilapia (García-Pérez et al., 2021). Esto evidencia el uso excesivo de los antibióticos en la acuicultura de Guatemala y, por lo tanto, sugiere la necesidad de implementar regulaciones por parte del gobierno para evitar el incremento de la resistencia bacteriana generada por el uso de los métodos tradicionales de control, o bien de crear y promover nuevas alternativas para el control bacteriano.

Con el fin de reducir el uso de antibióticos en la acuicultura a nivel mundial, la etnobotánica ha sido propuesta como una herramienta adicional para el control de patógenos resistentes y no resistentes (Olusola et al., 2013; Ham et al., 2020). Las plantas medicinales y sus extractos han sido ampliamente utilizados, debido a que sus componentes fitoquímicos, como flavonoides, terpenos, taninos, alcaloides y cumarinas, entre otros, son recomendados para el tratamiento y profilaxis de diferentes patógenos en la industria acuícola. La mayoría de estos productos naturales son amigables con el ambiente, ya que son biodegradables en comparación con los productos sintéticos, como los antibióticos. Además, es menos probable que fomenten resistencia en las bacterias, debido a su alta variabilidad en su composición química (Olusola et al., 2013).

Por lo tanto, los fitobióticos podrían ser una alternativa para los productores de pequeña y mediana escala en Guatemala, ayudando a reducir el uso de antibióticos en la producción acuícola. A lo largo del tiempo se ha encontrado que muchas plantas de la familia Verbenaceae poseen efectos antibacterianos, tal es el caso del género *Lippia* spp que comprende 200 especies ampliamente distribuidas en América (Zoghbi et al., 1998).

En Guatemala se han identificado aproximadamente 13 especies, siendo *L. graveolens* (Khunth) y *L. alba* (Mill) las más comunes. Etnobotánicamente, *L. graveolens* se conoce como orégano mexicano, y se obtiene principalmente de poblaciones silvestres, que crecen en diversas condiciones ecológicas, desde tierras semiáridas hasta subhúmedas.

A nivel mundial el orégano pertenece al género *Origanum*, que ha sido evaluado como aditivo en el alimento para tilapia, y se ha demostrado que puede mejorar diferentes aspectos de la producción acuícola, como el crecimiento, la respuesta inmunológica y la resistencia a enfermedades (Alarcon-Rojo et al., 2017; Leyva-López et al., 2017; Abdel-Latif et al., 2020; Alagawany et al., 2020). El efecto se atribuye a metabolitos secundarios como timol y carvacrol.

En general existe información limitada sobre la efectividad de *L. graveolens* en la acuicultura, pero siendo su componente principal el timol (formula: $C_{10}H_{14}O$), este puede funcionar no solo como antimicrobiano sino también como promotor del estado de salud y crecimiento en los organismos acuáticos, principalmente tilapia. Por lo tanto, el objetivo del trabajo doctoral fue investigar la eficacia de las plantas del género *Lippia* más abundantes en Guatemala como aditivos en la alimentación de juveniles de tilapia. A través de la mejora en los rendimientos productivos y el estado de salud de los organismos para prevenir la infección por *A. hydrophila*, la cual es la bacteria patógena más común en sistemas de producción acuícola. El trabajo doctoral se estructuró en tres capítulos:

Capítulo 1:

El primer capítulo consta de un artículo científico, en el cual se determinó la prevalencia y resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas más comunes de los cultivos de tilapia en Guatemala en el período de 2018 - 2019. En dicho artículo, se evidenció que la mayoría de los signos clínicos que afectan a los organismos en cultivo, los cuales están en proceso de infección bacteriana son: úlceras cutáneas, áreas hiperémicas, melanización corporal, hígado pálido y friable, vasculitis en hígado, congestión y hemorragia intestinal.

Se aislaron un total de 16 cepas de bacterias patógenas de los organismos que presentaron alguna patología relacionada con enfermedades bacterianas. El género más común fue *Aeromonas* (70%: 3 spp), seguido de *Plesiomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Streptococcus* (6%: 1 sp). Además, se observó que las cepas bacterianas aisladas mostraron resistencia hacia los antibióticos oxitetraciclina (25%) y fosfomicina (25%), evidenciado el uso indiscriminado de los antibióticos permitidos en Guatemala.

Capítulo 2:

El segundo capítulo consta de una comunicación corta y dos artículos científicos, por medio de los cuales se demostró la capacidad antimicrobiana que poseen los extractos y aceites esenciales de las plantas: *L. alba* y *L. graveolens* obtenidos, por medio de diversas metodologías y diferentes solventes de extracción, y de materia prima proveniente de poblaciones silvestres de *L. graveolens* y de un cultivo de *L. alba*. Es importante destacar que la comunicación corta se utilizó como un pre-ensayo para estandarizar la metodología de trabajo en laboratorio, en lo que respecta a la obtención de diferentes extractos y la realización de ensayos antimicrobianos. La metodología en extenso del procedimiento microbiológico en detalle se presenta en el anexo 4.

En el artículo dos se evalúa la capacidad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos mediante la técnica de percolación con tres tipos de solventes y la técnica de extracción con fluido supercrítico de CO₂; así como, de los aceites esenciales, los cuales se obtuvieron mediante la técnica de hidrodestilación. La actividad antimicrobiana se determinó a través de una evaluación simple antimicrobiana con *A. hydrophila* y *A. sobria* como modelo biológico, las cuales fueron las bacterias de mayor prevalencia en los sistemas acuícolas en Guatemala durante el 2018-2019.

En general se observó que el aceite esencial de *L. graveolens* mostró mayor efectividad para inhibir patógenos bacterianos (100%) que cualquier extracto, generando un diámetro de zona de inhibición que osciló entre 25.20 y 36.94 mm. Los extractos obtenidos por la técnica de fluido supercrítico y de percolación con acetato de etilo y ciclohexano presentaron la misma efectividad (78%). El extracto crudo obtenido con etanol al 95% mostró un efecto antimicrobiano limitado (22%), presentando el menor halo de inhibición (rango de 8.34 a 9.57 mm). Mientras que con *L. alba* se obtuvo una menor actividad antibacteriana, siendo el aceite esencial el único que presentó una actividad importante, con 67% efectividad y halos de inhibición que oscilaron entre 10.68 a 16.29 mm.

En el tercer artículo se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *L. graveolens* extraídos de diversos quimiotipos pertenecientes a tres áreas de Guatemala. Los aceites esenciales fueron evaluados contra la bacteria *A. hydrophila*, resistente a la oxitetraciclina, bacteria de mayor patogenicidad y prevalencia en los cultivos de tilapia en Guatemala durante el 2018-2019. Para determinar la efectividad de *L. graveolens*, se evaluaron los aceites esenciales de cada quimiotipo encontrado, así como la combinación de estos.

En general se encontraron tres quimiotipos de *L. graveolens* en Guatemala, siendo el componente principal para el quimiotipo I: Cis-dihidro- β -terpineol (8.84 %), para el II: Carvacrol (51.82 %) y para el III: Timol (79.62 %). Se observó que el mejor quimiotipo para inhibir el crecimiento bacteriano fue el quimiotipo III (timol) con una concentración inhibitoria mínima (CMI) y mínima bactericida de 92.4-184.8 $\mu\text{g/mL}$. Además, los resultados indicaron que la combinación de quimiotipos de *L. graveolens* no tuvo un efecto sinérgico o aditivo.

Capítulo 3:

El capítulo tres contiene un artículo científico que se encuentra en proceso de publicación. Se incorporó aceite esencial de la planta *L. graveolens* quimiotipo timol, a la dieta de juveniles de tilapia con el fin de evaluar su efecto en el crecimiento, la utilización del alimento, los parámetros hematobioquímicos, la histomorfometría del intestino e hígado, las enzimas digestivas y el desafío bacteriano utilizando *A. hydrophila* como modelo biológico.

En este estudio se evidenció que después de 30 días de alimentación, la inclusión de aceite de orégano posee un efecto positivo en los parámetros de crecimiento y utilización de alimento con los tratamientos de 300 - 1200 mg/kg, mejorando el crecimiento y utilización de alimento. Además, no se encontró evidencia de algún efecto adverso en la histología hepática e intestinal de los peces que se alimentaron con el aceite esencial de *L. graveolens* hasta una concentración de 1,200 mg/kg, aunque se observó que en algunos tratamientos los niveles de enzimas del hígado tienden a aumentar; manteniéndose dentro de los valores normales reportados para el uso de fitobióticos en diversas especies acuícolas. También, se observó que la concentración de 1,200 mg/kg de aceite esencial tiene un efecto positivo sobre el aumento de la actividad de las enzimas intestinales, especialmente las proteasas ácidas, las quimotripsinas y las lipasas. Finalmente, se demostró que la incorporación de aceite esencial de *L. graveolens* en la dieta disminuyó la mortalidad en comparación con el grupo control, durante el desafío bacteriano.

Por lo tanto, este estudio demuestra que la inclusión del aceite esencial de *L. graveolens* quimiotipo timol, puede mejorar la salud de los peces, la utilización del alimento y el crecimiento, así como la resistencia bacteriana.

4. Artículo 1

Patógenos bacterianos y su resistencia a los antimicrobianos en los cultivos de tilapia en Guatemala.

Bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala.

Josué García-Pérez ¹, josgar85@gmail.com, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-6899-8036>

Juan B. Ulloa-Rojas ², juan.ulloa.rojas@una.cr, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0003-4464-1136>

Susana Mendoza-Elvira ³, seme@unam.mx, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0003-3672-6471>

¹Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. Calle 15, Avenida 14., 1 km Sur de la Basílica de los Ángeles., Provincia de Cartago, Cartago, 30101, Costa Rica, E-mail: josgar85@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6899-8036>

²Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2V2R+C4G, Heredia Province, Heredia, Costa Rica, juan.ulloa.rojas@una.cr, <https://orcid.org/0000-0003-4464-1136>.

³Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México, Av. Primero de Mayo S/N, Sta Maria Guadalupe las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, México, seme@unam.mx, <https://orcid.org/0000-0003-3672-6471>

Resumen

Este estudio muestra el trabajo realizado durante el año 2018-2019, donde se identificaron los principales patógenos bacterianos que afectan a los cultivos de la tilapia en Guatemala, al mismo tiempo se evaluó la resistencia a los antibióticos de mayor uso en la industria acuícola de esta zona. Se recolectaron peces con peso de 50 a 1,000 g, en diversos centros de producción. Por cada organismo se registró la signología macroscópica externa e interna más frecuente, posteriormente se aislaron muestras bacteriológicas de fluido sanguíneo, úlceras y otras áreas hemorrágicas, riñón anterior, bazo, meninges, hígado y corazón.

Las bacterias patógenas aisladas fueron identificadas a nivel de especie, a través de pruebas bioquímica. Finalmente se evaluó la susceptibilidad con los antibióticos: oxitetraciclina (40 µg), florfenicol (40 µg), enrofloxacina (40 µg) y fosfomicina (40 µg) por el método de difusión de disco. Los organismos evidenciaron en su mayoría úlceras cutáneas, áreas hiperémicas, melanización corporal, hígado pálido y friable, vasculitis en hígado, congestión y hemorragia intestinal. Se lograron aislar 16 cepas bacterianas patógenas para la tilapia, los géneros más frecuentes fueron: *Aeromonas* (70%: 3 spp), seguido por *Plesiomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Streptococcus* (6%: 1 sp). Se observó que las cepas bacterianas aisladas mostraron resistencia hacia los antibióticos oxitetraciclina (25%) y fosfomicina (25%). Todas las cepas bacterianas aisladas evidenciaron sensibilidad a florfenicol y enrofloxacina. La determinación de los patógenos más frecuentes, así como su resistencia antimicrobiana en la industria acuícola, es el primer reporte que se genera para Guatemala.

Palabras clave: Acuicultura; antibióticos; antimicrobiano; bacteria; *Oreochromis*.

Abstract

The aim of this study was to identify the main bacterial pathogens corresponding to tilapia aquaculture in Guatemala during 2018-2019 and at the same time, their resistance to the most widely used antibiotics in the aquaculture industry of this zone. Fish with a weight of 50 to 1,000 g were collected in different production centers. For each organism, the most frequent external and internal macroscopic signs were recorded; later, bacteriological samples of blood fluid, ulcers and other hemorrhagic areas, anterior kidney, spleen, meninges, liver, and heart were isolated. The isolated pathogenic bacteria were identified at the species level, through biochemical tests. Finally, the susceptibility with oxytetracycline (40 µg), florfenicol (40 µg), enrofloxacin (40 µg), and fosfomycin (40 µg) were evaluated by the disk diffusion method. The most common clinical signals were skin ulcers, hyperemic areas, body melanization, pale and soft liver, liver vasculitis, congestion, and gut hemorrhages. There were isolated from tilapia samples 16 pathogen bacteria strain. The most frequently bacteria genera were *Aeromonas* (70%: 3 spp), followed by *Plesiomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, and *Streptococcus* (6%; 1 sp). Four antibiotics of commercial use in Guatemalan aquaculture were tested amongst all bacteria genera, resulting in resistance to oxytetracycline (25%) and phosphomycin (25%).

All bacteria isolated showed sensitivity to florfenicol and enrofloxacin. This is the first report related to bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala.

Key words: Aquaculture; antibiotics; antimicrobial; bacteria; *Oreochromis*.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura a nivel mundial ha crecido a lo largo de los últimos 60 años, y el cultivo de tilapia se ha convertido en una actividad acuícola de gran importancia comercial (Fitzsimmons, 2013). La producción mundial de tilapia ha crecido aproximadamente 4.7% anualmente desde el año 2000. Para el año 2016, se reportó una producción de 5,897,652 t, siendo los principales países productores China, Egipto, Indonesia, Brasil, Filipinas y Tailandia, entre otros (FAO, 2015). En Guatemala, la industria acuícola en el 2017 produjo alrededor de 9,753 TM de tilapia, evidenciando un crecimiento del 3.9% anual desde el año 2010 (FAO, 2018).

El aumento de la producción acuícola ha sido acompañado por el desarrollo de problemas ecológicos y patológicos, siendo este último el de mayor preocupación en el sector acuícola. La alta densidad de siembra, manejo deficiente de los peces, fluctuaciones en los factores ambientales, mala calidad de agua y una mala nutrición, contribuyen a que los organismos se encuentren inmunológicamente suprimidos, siendo susceptibles a infecciones bacterianas, por patógenos facultativos u oportunistas.

Las bacterias de mayor frecuencia, en los sistemas acuícolas se clasifican como bacterias Gram-negativas, ocasionando en su mayoría el síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana, y como bacterias Gram-positivas, que en su mayoría causan infecciones granulomatosas.

Dentro de las bacterias más predominantes a nivel mundial se pueden encontrar: *Aeromonas hydrophila*, *A. liquifaciens*, *A. punctata*, *A. sobria*, *Edwardsiella tarda*, *Flexibacter columnaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Streptococcus iniae* y *S. agalactiae* (Mzula, et al., 2020; Chitmanat, et al., 2016; Plumb & Hanson, 2010).

En los sistemas de producción de tilapia en Guatemala se reportan mortalidades por patógenos bacterianos entre 20% - 30%; y en algunos casos extremos se llega a obtener hasta 90% de mortalidad, siendo las familias bacterianas de mayor presencia: Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae, Pasteurellaceae, Aerococcaceae, Comamonadaceae, Streptococcaceae, Alteromonadaceae y Enterobacteriaceae (Marroquín-Mora & García-Pérez, 2015).

La prevención y control de las enfermedades se han convertido en la prioridad para la sostenibilidad de esta industria acuícola. En la praxis tradicional, para evitar mortalidades, se utilizan medicamentos de uso veterinario de amplio espectro, suministrados en el medio de cultivo y a través del alimento, con el fin de controlar y prevenir la infección de diversos patógenos bacterianos. A nivel global se utilizan diversos antibióticos, siendo los más comunes oxitetraciclina, sulfadiazina y florfenicol, los cuales han sido reportados en los países de mayor producción, y con menor frecuencia: enrofloxacina, eritromicina, sulfametoxazol, sulfadimidina y trimetoprim, entre otros (Mo et al., 2017). El uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos (antibióticos) provenientes de la acuicultura, resulta en la contaminación de agua y sedimento, promoviendo una presión selectiva y creando reservorios de bacterias resistentes a los medicamentos (Espinosa, & Bermúdez, 2012).

Desafortunadamente, la información disponible sobre los diversos patógenos bacterianos presentes en los cultivos de tilapia en Guatemala es muy limitada. Tampoco se cuenta con datos de sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos utilizados en la industria en el país, con el fin de generar directrices de uso responsable de los antibióticos. Por lo tanto, el presente estudio tiene como finalidad identificar los patógenos bacterianos de mayor prevalencia, y determinar su resistencia antimicrobiana a los antibióticos disponibles para la industria acuícola en Guatemala.

METODOLOGÍA

Aislamiento e identificación de las bacterias patógenas

Durante los años 2018-2019 se realizaron muestreos por conveniencia en diez centros de producción de tilapia. Las granjas visitadas se encuentran en los departamentos de: Escuintla, Santa Rosa, Retalhuleu, Zacapa, Izabal y Petén.

Las visitas fueron programadas únicamente cuando se presumía presencia de brotes infecciosos. Se evaluaron organismos de *Oreochromis* spp., con un rango de peso de 50 a 1,000 g. En cada unidad de producción se seleccionaron diez organismos con signología clínica de enfermedad bacteriana. Los organismos seleccionados fueron sacrificados acorde al Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Artículo 7.4.6, Literal 1), de la Organización Mundial de Sanidad Animal.

Se registró la signología macroscópica externa e interna por cada organismo evaluado, con el fin de determinar la frecuencia de signos clínicos y el agente etiológico causante de la enfermedad. Se realizó una tabla de frecuencia para determinar las siguientes signologías: Melanización corporal (MC), Exoftalmia uni / bilateral (EX), Áreas hiperémicas (AH), Úlcera cutánea (UC), Licuefacción focalizada del músculo (LFM), Palidez de branquias (PB); Congestión branquial (CB), Ascitis (AS), Congestión en estómago (CE); Congestión y hemorragia intestinal (CHI), Pericarditis (PR), Esplenomegalia (ES), Granulomas en bazo (GB), Centros melanomacrófagos (CM), Vasculitis en hígado (VH), Hígado friable (HF), Palidez en hígado (PH) e Hiperemia renal (HR), por cada lote de organismos evaluados. Luego se clasificó la frecuencia de signos externos e internos como: Sin presencia de signos clínicos (- / 0%), poca frecuencia de signos clínicos (+ / 1 - 33% frecuencia), frecuencia media o intermedia de signos clínicos (++) / 34 - 66% frecuencia), y alta frecuencia de signos clínicos (+++) / 67 - 100% frecuencia).

Posteriormente, se realizó la desinfección superficial de los organismos con etanol 70%, y se procedió a realizar la necropsia para tomar muestras bacteriológicas de fluido sanguíneo, úlceras y otras áreas hemorrágicas, riñón anterior, bazo, meninges, hígado y corazón. Las muestras fueron sembradas inicialmente en agar tripticosa soja enriquecido con sangre de carnero al 5% e incubadas por un período de 24 horas a temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Al finalizar el periodo de incubación, se seleccionaron las colonias bacterianas predominantes, las cuales fueron identificadas a nivel de especie, a través de pruebas bioquímica API20E, API 20NE y API STREP (bioMérieux S.A). Las bacterias identificadas fueron conservadas bajo el protocolo descrito por Liao & Shollenberger (2003), en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X.

Actividad antibacteriana con antibióticos de uso comercial en acuicultura de Guatemala

La susceptibilidad a los antibióticos fue determinada por el método de difusión de disco con los antibióticos de mayor uso en acuicultura en Guatemala: oxitetraciclina (40 µg), florfenicol (40 µg), enrofloxacin (40 µg) y fosfomicina (40 µg) de acuerdo con la metodología establecida por Alderman & Smith (2001). Se realizaron cultivos puros por 18 h con las bacterias patógenas previamente aisladas, las cuales fueron suspendidas en PBS 1X, hasta alcanzar una concentración bacteriana de $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, se inoculó 100 µL de cada una de las suspensiones bacterianas preparadas y se esparció de forma uniforme en placas de agar Mueller-Hinton, la siembra fue por triplicado, y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se colocaron sensidiscos de los antibióticos, teniendo una distancia aproximada de 2 cm, entre cada uno. Las placas fueron incubadas durante un periodo de 24 horas a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Pasado el tiempo de incubación se midió el área de inhibición y las bacterias fueron clasificadas como: resistentes (R) o sensibles (S), de acuerdo con el antibiótico utilizado.

Análisis de datos

Se realizó estadística descriptiva para determinar la frecuencia y detección de las diversas bacterias patógenas aisladas. Se realizó un análisis de correspondencia para explorar la relación entre las variables "Bacterias patógenas aisladas" y "Signología clínica frecuente". El análisis estadístico fue realizado con el programa estadístico Past V.3 (Hammer, Harper & Ryan, 2004).

RESULTADOS

Se evaluaron un total de 80 peces con signología clínica de enfermedad bacteriana. En total se aislaron 16 bacterias patógenas, de las cuales 15 aislamientos resultaron bacterias Gram-negativa (G-) y solo un aislamiento Gram-positiva (G+). Las bacterias más representativas fueron *Aeromonas sobria* (6 aislamientos: 38%), seguido por *Aeromonas hydrophila* (4 aislamientos: 26%), para el resto de las bacterias solamente se aisló una cepa correspondiente al 6% poblacional (Tabla 1).

Tabla 1. Signología macroscópica externa e interna más frecuente, en los aislamientos bacterianos.

Código	Bacteria	Signología*																	
		MC	EX	AH	UC	LFM	PB	CB	AS	CE	CHI	PR	ES	GB	CM	VH	HF	PH	HR
MX02	<i>Aeromonas hydrophila</i>	++	-	+++	+++	-	++	++	+++	++	+	-	++	-	++	++	++	++	++
MX14	<i>A. hydrophila</i>	++	+	++	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	++	++	-
MX15	<i>A. hydrophila</i>	+	+	+++	++	-	++	++	++	+	++	-	++	+	++	++	+	+	+
MX30	<i>A. hydrophila</i>	++	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	-
MX01	<i>A. sobria</i>	+	-	+++	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	++
MX06	<i>A. sobria</i>	++	+	++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	++	++	-
MX07	<i>A. sobria</i>	++	++	+++	+++	-	++	++	+++	++	++	-	++	-	++	++	++	++	++
MX09	<i>A. sobria</i>	+	-	++	++	-	++	++	++	+	++	-	++	-	++	+++	++	++	+
MX10	<i>A. sobria</i>	+	-	+	+++	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+++	+++	-
MX11	<i>A. sobria</i>	++	-	+++	+++	-	-	++	+	-	++	-	-	-	++	++	++	++	-
MX23	<i>A. veronii</i>	++	-	+++	+++	-	-	++	++	-	++	-	-	-	+	++	++	++	-

MX20	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+++	-	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
MX31	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-
MX16	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	++	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-
MX21	<i>Shewanella putrefaciens</i>	+++	-	++	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-
MX18	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+

Nota: *Signología: Melanización corporal (MC); Exoftalmia uni / bilateral (EX); Áreas hiperémicas (AH); Úlcera cutánea (UC), Licuefacción focalizada del músculo (LFM); Palidez de branquias (PB); Congestión branquial (CB); Ascitis (AS); Congestión en estómago (CE); Congestión y hemorragia intestinal (CHI); Pericarditis (PR); Esplenomegalia (ES); Granulomas en bazo (GB); Centros melanomacrófagos (CM); Vasculitis en hígado (VH); Hígado friable (HF); Palidez en hígado (PH); Hiperemia renal (HR); sin presencia (- : 0%), poco frecuente (+ : 1 -33% frecuencia), medianamente frecuente (++ : 34 - 66% frecuencia), muy frecuente (+++ : 67 - 100% frecuencia). Fuente propia de la investigación.

Las principales patologías externas observadas en los peces enfermos fueron úlceras cutáneas con áreas hiperémicas en diversas partes del cuerpo, seguido de melanización corporal total, ascitis y congestión branquial (Figura 1). Mientras que las patologías internas macroscópicas más comunes fueron: hígado friable y pálido, vasculitis en hígado, congestión y hemorragia intestinal y centros melanomacrófagos en bazo (Figura 2).

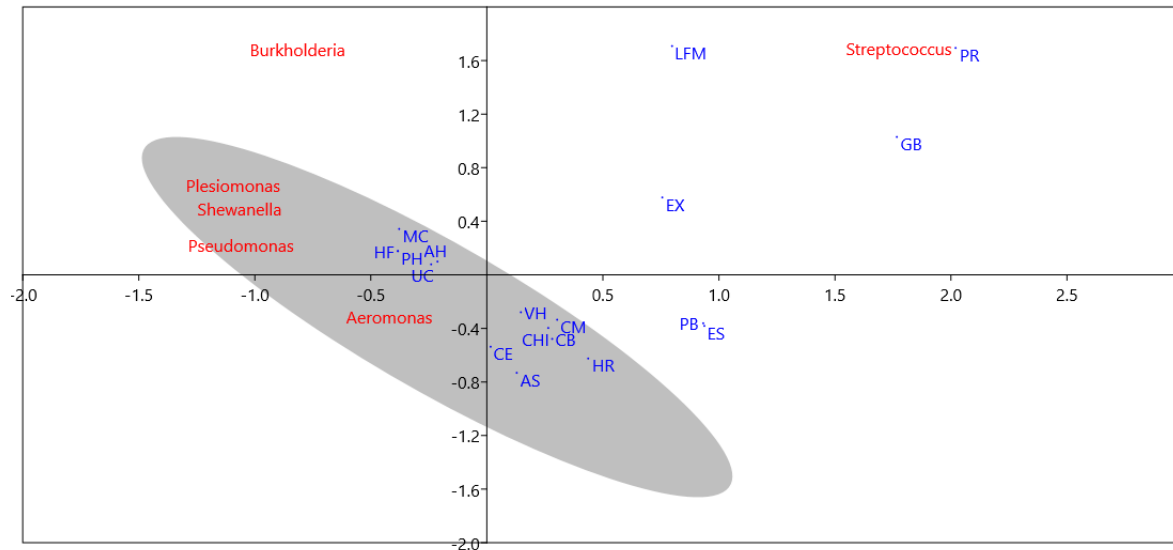


Figura 1. *Principales patologías externas: úlcera cutánea con áreas hiperémicas en diversas partes del cuerpo. Nota: Fuente propia de la investigación.*



Figura 2. *Principales patologías internas: hígado friable y decolorado, vasculitis en hígado, congestión y hemorragia intestinal. Nota: Fuente propia de la investigación.*

En general se observa que los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Shewanella* presentan una estrecha relación con la signología de úlceras cutáneas, áreas hiperémicas, melanización corporal, hígado pálido y friable. Estos géneros corresponden al grupo catalogado como Septicemia Hemorrágica Bacteriana (SHB). Mientras que el género *Streptococcus* se relaciona más a los signos de pericarditis, granulomas en bazo, licuefacción focalizada del músculo y exoftalmia; esta bacteria corresponde al grupo de bacterias granulomatosas (Gráfica 1).



Gráfica 1. Análisis de correspondencia entre las bacterias patógenas aisladas y la signología externa e interna más común. *Signología: Melanización corporal (MC); Exoftalmia uni / bilateral (EX); Áreas hiperémicas (AH); Úlcera cutánea (UC), Licuefacción focalizada del músculo (LFM); Palidez de branquias (PB); Congestión branquial (CB); Ascitis (AS); Congestión en estómago (CE); Congestión y hemorragia intestinal (CHI); Pericarditis (PR); Esplenomegalia (ES); Granulomas en bazo (GB); Centros melanomacrófagos (CM); Vasculitis en hígado (VH); Hígado friable (HF); Palidez en hígado (PH); Hiperemia renal (HR). Fuente propia de la investigación.

Para todos los géneros de bacterias evaluados, la resistencia fue mayor a la oxitetraciclina (25%) y fosfomicina (25%). Todas las bacterias fueron sensibles al florfenicol y la enrofloxacin (Tabla 2). No se observó múltiple resistencia a los antibióticos en las bacterias aisladas. Las bacterias que presentaron resistencia a la oxitetraciclina fueron *A. sobria* (3 aislamientos) y *A. hydrophila* (1 aislamiento) y en el caso de la fosfomicina fueron *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens* y *B. pseudomallei*.

Tabla 2. Susceptibilidad bacteriana a los antibióticos de mayor uso en acuicultura en Guatemala

Bacterias	ID	ENR		FLOR		MAG		OXI	
		AI (mm)	S/R	AI (mm)	S/R	AI (mm)	S/R	AI (mm)	S/R
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MX02	27 ± 1	S	28 ± 1	S	24 ± 1	S	24 ± 1	S
<i>A. hydrophila</i>	MX14	26 ± 1	S	26 ± 1	S	27 ± 1	S	21 ± 1	S
<i>A. hydrophila</i>	MX15	20 ± 1	S	25 ± 1	S	22 ± 1	S	10 ± 0	R
<i>A. hydrophila</i>	MX30	32 ± 2	S	33 ± 1	S	10 ± 1	R	22 ± 2	S
<i>A. sobria</i>	MX01	17 ± 1	S	27 ± 1	S	22 ± 1	S	12 ± 0	R
<i>A. sobria</i>	MX06	27 ± 1	S	30 ± 0	S	22 ± 1	S	13 ± 0	R
<i>A. sobria</i>	MX07	30 ± 1	S	28 ± 1	S	24 ± 1	S	13 ± 1	R
<i>A. sobria</i>	MX09	37 ± 1	S	31 ± 0	S	27 ± 1	S	26 ± 1	S
<i>A. sobria</i>	MX10	18 ± 0	S	26 ± 1	S	28 ± 1	S	27 ± 1	S
<i>A. sobria</i>	MX11	36 ± 1	S	31 ± 1	S	26 ± 1	S	28 ± 1	S
<i>A. veronii</i>	MX23	36 ± 1	S	34 ± 1	S	21 ± 1	S	22 ± 1	S
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	MX20	31 ± 1	S	26 ± 1	S	0 ± 0	R	21 ± 1	S
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	MX31	35 ± 2	S	36 ± 1	S	24 ± 1	S	22 ± 2	S

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MX16	30 ± 1	S	35 ± 1	S	13 ± 1	R	24 ± 1	S
<i>Shewanella putrefaciens</i>	MX21	31 ± 1	S	38 ± 1	S	11 ± 0	R	21 ± 1	S
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MX18	29 ± 1	S	32 ± 1	S	17 ± 1	S	29 ± 1	S

Nota: AI: área de inhibición (mm); ENR: enrofloxacin (5 µg); FLOR: florfenicol (30 µg); MAG: fosfomicina (40 µg); OXI: oxitetraciclina (40 µg); S: sensible; R: resistente. Fuente propia de la investigación.

DISCUSION

En Guatemala durante 2018, la acuicultura alcanzó una producción de 26,360 TM (FAO, 2018), siendo dominada por el cultivo de camarón con un 62%, seguido por el cultivo de tilapia (*Oreochromis* spp) con un 37%. El crecimiento exponencial de la producción de tilapia ha provocado la intensificación de los sistemas de cultivo, conllevando a la aparición de brotes bacterianos nuevos o patógenos bacterianos existentes con resistencia a la gama de antibióticos disponibles en el mercado.

Actualmente no existen reportes sobre los diversos agentes bacterianos que afectan a la industria de la tilapia en Guatemala. Este es el primer estudio que recopila la información de los patógenos bacterianos más recurrentes en el periodo 2018-2019. Se detectaron 16 bacterias patógenas en la tilapia, siendo el género más frecuente *Aeromonas*, seguido por *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Shewanella* y *Streptococcus*. Todos los géneros son considerados como limitantes en la salud acuícola, contribuyendo a las pérdidas económicas a nivel mundial (Dong et al., 2017; Figueiredo et al., 2012; Shuxia & Levin, 2010; Sierralta-Chichizola, Mayta-Huatuco, & León-Quispe, 2016; Zhigang et al., 2015). Las afecciones detectadas fueron atribuidas a exposiciones prolongadas a estrés provocado por manejo deficiente y factores ambientales desfavorables. De acuerdo con Akinbowale, Peng y Barton (2006), estos factores predisponen a los peces a infecciones bacterianas.

El género *Aeromonas* presentó la mayor distribución y frecuencia en los sistemas de cultivos evaluados. La signología clínica observada concuerda con lo descrito por Ashiru et al., (2011); Austin & Austin (2012); Noga (2010); Shayo, Mwita, & Hosea (2012), quienes también observaron lesiones ulcerativas, vascularización, ruptura de aletas, necrosis en el área opercular y base craneal.

A. hydrophila y *A. sobria*, fueron las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia en las granjas evaluadas, por lo que se estima que son bacterias con un alto potencial de causar un impacto negativo a los cultivos de tilapia a nivel nacional, ya que son bacterias oportunistas e inmunosupresores (Raj et al., 2019). En países como Malasia, Egipto y Pakistán se reporta el aislamiento de las mismas bacterias en sistemas de producción de tilapia, provocando impactos negativos (Dong et al., 2017; Li & Cai, 2011; Shayo et al., 2012).

Por otra parte, *B. pseudomallei*, *P. shigelloides*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens* y *S. agalactiae*, se observaron con menor frecuencia de aislamiento. Los peces infectados con estas bacterias presentaron diversos signos, incluyendo: lesiones ulcerativas, vascularización, ascitis, hiperemia renal, atrofia hepática, esplenomegalia, pericarditis con necrosis multifocal. Estos signos clínicos coinciden con la sintomatología descrita por varios autores (Abdel-Tawwab et al., 2010; Anshary et al., 2014; Austin & Austin, 2012; Buller, 2004; Hernández, Figueroa, & Iregui, 2009; Sierralta-Chichizola, et al., 2016; Shayo et al., 2012; Zhigang, et al., 2015). Los problemas asociados con estas bacterias se vuelven serios cuando la homeostasis se rompe dentro del sistema de cultivo, principalmente con *S. agalactiae* que es considerada un patógeno que produce una enfermedad crónica (Aisyhah et al., 2014; Anshary et al., 2014; Noga, 2010).

No se encontraron bacterias como *Flavobacterium columnare*, *Vibrio* spp, *Francisella* spp, *Lactococcus garvieae*, entre otras bacterias, como lo reportan varios autores (Dong et al., 2015; Meyburgh, Bragg, & Boucher, 2017), lo cual se atribuye al efecto de la temporalidad, sistema de cultivo, manejo, especies, entre otros factores, que ayudan a modificar la diversidad de la comunidad bacteriana externa presente.

La resistencia bacteriana en acuicultura se reporta desde la década de los 80's (Brown 1989) y avanza con rapidez, debido al uso indiscriminado de los antibióticos y la reducción de sustancias permitidas. En Guatemala solo existen dos antibióticos registrados para el uso en la producción de tilapia; oxitetraciclina y florfenicol.

El número reducido de opciones para tratar las enfermedades bacterianas permite un abuso en el uso de los mismos, ya que los productores cada vez utilizan mayor cantidad para tratar organismos enfermos. Además, son utilizados como preventivos y modulan las poblaciones bacterianas de los sistemas de producción.

Los resultados del presente estudio demuestran que *A. sobria* y *A. hydrophila* presentaron resistencia a oxitetraciclina, coincidiendo con lo reportado por otros autores en diversos países (Igbinosa et al., 2017; Monteiro, et al., 2016). Por lo tanto, se infiere que la resistencia del género *Aeromonas* spp a oxitetraciclina se evidencia en el uso intensivo del antibiótico para el manejo y control de enfermedades bacterianas.

Cabe resaltar que el género *Aeromonas* posee genes de resistencia móviles como plásmidos, transposones e integrones, los cuales facilitan su rápida transferencia entre bacterias de los genes de resistencia para antibióticos de uso comercial (Jacobs, & Chenia, 2007; Stratev & Odeyemi, 2016).

Por otra parte, antibióticos que no están permitidos para la producción de tilapia, pero si para producción de camarón como la fosfomicina, también muestra resistencia a las bacterias *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens* y *B. pseudomallei*.

Estos datos evidencian el uso excesivo de los antibióticos en la acuicultura en general de Guatemala, por lo tanto, sugieren la necesidad de regulaciones por parte del gobierno para evitar el incremento de la resistencia bacteriana frente a los métodos tradicionales de control, o bien de crear nuevas alternativas para el control bacteriano.

CONCLUSIÓN

Las enfermedades bacterianas son importantes para el cultivo de tilapia, debido a que pueden generar pérdidas de hasta el 100% de la población en cultivo. En el presente estudio se muestra un primer análisis sobre la diversidad de los patógenos bacterianos, su relación con los signos clínicos, así como la sensibilidad de los antibióticos más utilizados en la industria acuícola en Guatemala. Se pudo determinar que las unidades de producción presentan a *Aeromonas* como el grupo bacteriano más diverso y frecuente, seguido por *Burkholderia*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, y *Streptococcus*. Los organismos evidenciaron en su mayoría úlceras cutáneas, áreas hiperémicas, melanización corporal, hígado pálido y friable, vasculitis en hígado, congestión y hemorragia intestinal. De las bacterias evaluadas, la resistencia mayor fue obtenida con la oxitetraciclina (25%) y fosfomicina (25%), mientras que todas las cepas bacterianas fueron sensibles a florfenicol y enrofloxacin.

En Guatemala solo se encuentran registrados legalmente los antibióticos oxitetraciclina y florfenicol para el uso en los cultivos de tilapia, por lo tanto, en el manejo de las enfermedades bacterianas se utilizan altas dosis de oxitetraciclina y florfenicol, lo cual evidencia que se está promoviendo la resistencia al antibiótico oxitetraciclina, primordialmente.

La resistencia a oxitetraciclina es una amenaza cada vez más grave para la industria acuícola, la cual requiere de acciones inmediatas. En los cultivos de tilapia en Guatemala se deben adoptar protocolos adecuados para el control y manejo de las enfermedades bacterianas, reduciendo el uso de los antibióticos, y promoviendo el uso adecuado de los mismos. Se deben establecer estrategias adecuadas para mitigar la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos, a través de enfoques biológicos alternativos para la producción acuícola sostenible.

El uso de plantas medicinales o sus extractos, pueden considerarse como estrategias respetuosas con el medio ambiente y con los organismos de cultivo, que puede ayudar a prevenir, controlar enfermedades de origen bacteriano, fortalecer el sistema inmunológico de los organismos de cultivo y favorecer las condiciones de la microbiota de ambientes acuáticos.

Aunque el uso de plantas medicinales ha mostrado resultados prometedores en otros países, se necesita estudios adicionales, particularmente con el recurso vegetal disponible en Guatemala, para formular estrategias sobre la base de su composición química y mecanismo de acción.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto de doctorado del primer autor. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo. Financiado por la Universidad de San Carlos de Guatemala cohorte 2017.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores no declaran ningún conflicto de interés.

DECLARACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

El porcentaje total de contribución para la conceptualización, preparación y corrección de este artículo fue el siguiente: J.G.P. 50 %, J.U.R. 25 % y S.M.E. 25 %.

DECLARACIÓN DE DISPONIBILIDAD DE LOS DATOS

Los datos que respaldan los resultados de este estudio serán puestos a disposición por el autor correspondiente [J.G.P], previa solicitud razonable.

REFERENCIAS

- Abdel-Tawwab, M.; Ahmad, M. H.; Seden, M. E.; & Sakr, S. F. M. (2010). Use of Green Tea, *Camellia sinensis* L., in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), against *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(2), 203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00360.x>
- Aisyhah, M. A. S.; Amai, M. N. A.; Zamri-Saad, M.; Siti-Zahrah, A.; & Shaquinah, N. N. (2014). *Streptococcus agalactiae* isolates from cultured fishes in Malaysia manifesting low resistance pattern towards selected antibiotics. *Journal of Fish Diseases*, 38(12), 1093–1098. <https://doi.org/10.1111/jfd.12351>
- Akinbowale, O. L.; Peng, H.; & Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal Applied Microbiology*, 100(5), 1103–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x>
- Alderman, D.; & Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196(3-4), 211–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00535-X)
- Anshary, H.; Kurniawan, R. A.; Sirwualan, S.; Ramli, R.; & Baxa, D. V. (2014). Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *SpringerPlus*, 3(627), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-627>
- Ashiru, A. W.; Uaboi-Egbeni, P. O.; Oguntowo, J. E.; & Idika, C. N. (2011). Isolation and antibiotic profile of *Aeromonas* species from Tilapia fish (*Tilapia nilotica*) and Catfish (*Clarias betrachus*). *Pakistan Journal Nutrition*, 10(10), 982–986. <https://10.3923/pjn.2011.982.986>
- Austin, B.; & Austin, D.A. (2012). *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 5th edn. Netherlands: Springer.
- Brown, J. H. (1989). Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture*, 20(2), 34 - 43.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual*. United Kingdom: CABI, Publishing.

- Chitmanat, C.; Lebel, P.; Whangchai, N.; Promya, J.; & Lebel, L. (2016). Tilapia diseases and management in river-based cage aquaculture in northern Thailand. *Journal of Applied Aquaculture*, 28(1), 9–16. <https://doi.org/10.1080/10454438.2015.1104950>
- Dong, H. T.; Nguyen, V. V.; Le, H. D.; Sangsuriya, P.; Jitrakorn, S.; Saksmerprome, V.; Senapin, S.; & Rodkhum, C. (2015). Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Aquaculture*, 448(1), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.027>
- Dong, H. T.; Techatanakitarnan, C.; Jindakittikul, P.; Thaiprayoon, A.; Taengphu, S.; Charoensapsri, W.; Khunrae, P.; Rattanarojpong, T.; & Senapin, S. (2017). *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 40(10), 1395–1403. <https://doi.org/10.1111/jfd.12617>
- Espinosa, A.; & Bermúdez, M. C. (2012). La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Centro de Investigaciones para el Desarrollo*, 2, 219–232.
- FAO. (2015). The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA) 2015. [En línea]: Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
- FAO. (2018). FishStat fishery statistical collections: aquaculture production (2017). [En línea]: Disponible en <http://www.fao.org/fhishery/statitics/software/fishstat/>
- Figueiredo, H. C. P.; Nobrega-Netto, L.; Leal, C. A. G.; Pereira, U. P.; Mian, G. F. (2012). *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) farms. *Brazilian Journal Microbiology*, 43(2), 576–580. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000200019>
- Fitzsimmons, K. (2013). The success story of the Tilapia industry; current and future trends of the US seafood market. [En línea]: Disponible en: https://www.ctahr.hawaii.edu/sustainag/workshop/downloads/tilapia/3_Weidenbach.pdf
- Hammer, O.; Harper, D. A.; & Ryan, P. D. (2004). PAST, Paleontological statistics version 2.08 [Internet] Disponible en <http://folk.uio.no/ohammer/past>
- Hernández, E.; Figueroa, J.; & Iregui C. (2009). Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *Journal of Fish Diseases*, 32(3), 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00981.x>

- Igbinosa, I. H.; Beshiru, A.; Odjadjare, E. E.; Ateba, C. N.; & Igbinosa, E. O. (2017). Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. *Microbial Pathogenesis*, *107*, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.037>
- Jacobs, L.; & Chenia, H. Y. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(3), 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030>.
- Li, Y.; & Cai, S. H. (2011). Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Current Microbiology*, *62*(2), 623–627. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9753-8>
- Liao, C. H.; & Shollenberger, L. M. (2003). Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, *37*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>
- Marroquín-Mora, C.; & García-Pérez, J. (2015). *Evaluación in vitro de extractos de plantas medicinales y probióticos como posibles agentes antimicrobianos para el control de las infecciones bacterianas más comunes en tilapia Oreochromis spp.* Guatemala, Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación.
- Meyburgh, C. M.; Bragg, R. R.; & Boucher, C. E. (2017). *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, *123*, 67–79. <https://doi.org/10.3354/dao03083>
- Mo., W. Y.; Chen, Z.; Leung, H. M.; & Leung, A. O. W. (2017). Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*, 8978–8989. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5607-z>
- Monteiro, S. H.; Garcia, F.; Gozi, K. S.; Romera, D. M.; Francisco, J. G.; Moura-Andrade, G. C. R.; & Tornisielo, V. L. (2016). Relationship between antibiotic residues and occurrence of resistant bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in cage-farm. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *51*(12), 817–823. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1208457>

- Mzula, A.; Wambura, P. N.; Mdegela, R. H.; & Shirima, G. M. (2020). Present status of aquaculture and the challenge of bacterial diseases in freshwater farmed fish in Tanzania; A call for sustainable strategies. *Aquaculture and Fisheries*, (In press). <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.05.003>
- Noga, E. J. (2010). *Fish disease: Diagnosis and treatment* (2nd ed.). Iowa: John Wiley and Sons.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2013). Código sanitario para los animales acuáticos. Decimosexta edición, ISBN 978-92-9044-918-8. [En línea]: Disponible en <https://www.oie.int/doc/ged/D12819.PDF>
- Plumb, J. A.; & Hanson, L. A. (2010). *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Raj, N. S.; Swaminathan, T. R.; Dharmaratnam, D. A.; Raja, S. A.; Ramraj, D.; & Lal, K. K. (2019). *Aeromonas veronii* caused bilateral exophthalmia and mass mortality in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in India. *Aquaculture*, 512(13), 1–8. <https://10.1016/j.aquaculture.2019.734278>
- Shayo, S. D.; Mwitwa, C. J.; & Hosea, K. M. (2012). Virulence of *Pseudomonas* and *Aeromonas* bacteria recovered from *Oreochromis niloticus* (Perege) from Mtera hydropower Dam; Tanzania. *Annals of Biological Research*, 3(11), 5157–5161.
- Shuxia, L.; & Levin, R. E. (2010). *Shewanella* in a tilapia fish farm. *Journal of Fisheries Sciences*, 4(2), 159–170. <https://10.3153/jfscm.2010016>
- Ierralta-Chichizola, V.; Mayta-Huatuco, E.; & León-Quispe, J. (2016). Primer Registro de *Plesiomonas shigelloides* como Patógeno Oportunista de Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en una Piscigranja de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(3), 565–572. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i3.11996>.
- Stratev, D.; & Odeyemi. O. A. (2016). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 9(5), 535–544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>
- Zhigang, L.; Ke, X.; Lu, M.; Gao, F.; Cao, J.; Zhu, H.; & Wang, M. (2015). Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Acta Microbiologica SINICA*, 55(1), 96–106.

5. Comunicación corta 1

Actividad antibacteriana de *Lippia graveolens* contra bacterias patógenas Gram-negativa de tilapia

Josué García-Pérez*, Juan Ulloa, Francisco Pérez & Susana Mendoza

Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala

Edificio T-14, ciudad Universitaria, zona 12, Guatemala, Guatemala.

Email: josgar85@gmail.com

La presente investigación pretende implementar tecnologías que impliquen una producción amigable con el medio ambiente y que no posean riesgos para la salud humana. A través de la incorporación de extractos vegetales de *Lippia graveolens* (Kunth), para la prevención de infecciones por bacterias patógenas Gram-negativas en los cultivos de tilapia de Guatemala.

Para ello, se recolecto tres kilogramos de hoja sin frutos y sin flor de *L. graveolens* en el municipio Río Hondo, departamento de Zacapa, Guatemala. El material vegetal fue secado y molido a un tamaño de 300-500 μm . La obtención de los extractos vegetales se realizó a través de tres metodologías: 1. Metodología de percolación: extracción secuencial utilizando ciclohexano, acetato de etilo y etanol 95%, 2. Metodología de fluido súper crítico: etanol al 95% como co-solvente y dióxido de carbono (CO_2) como solvente a presión 1,300 psi y 3. Hidrodestilación directa: agua como agente extractor de aceites esenciales (Sarker & Nahar, 2012).

Para evaluar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos realizados, se utilizaron cepas bacterianas Gram-negativa más frecuentes aisladas en los centros de producción de tilapia en Guatemala durante el periodo 2017-2018. Para la evaluación in vitro se utilizó la modificación del protocolo de Alderman & Smith (2001) difusión en disco. Donde se inoculo una alícuota de 20 μL de la solución de trabajo de cada uno de los extractos en discos en blancos, como control positivo se utilizó oxitetraciclina y como control negativo se inocularon con cada uno de los solventes utilizados para la obtención de los extractos.

En total se colectaron 18 bacterias patógenas, de las cuales 28% fueron clasificados como bacterias Gram-positivas y 72% como bacterias Gram-negativas. Las especies bacterianas con mayor frecuencia fueron *Aeromonas sobria* (33%) y *Aeromonas hydrophila* (17%). En general los extractos de *L. graveolens* inhibieron todas las cepas bacterianas (Tabla 1).

El extracto menos efectivo fue por el método de percolación con etanol como solvente, seguido por el solvente ciclo hexano. Por el contrario, el extracto que mayor área de inhibición presento fue por hidrodestilación directa (aceite esencial). Los rangos del halo de inhibición fue 25.08 – 28.40 mm para *A. sobria* y 25.87 – 28.67 mm para *A. hydrophila*.

Tabla No. 1: Susceptibilidad bacteriana del extracto de *L. graveolens* y el antibiótico de mayor uso en la acuicultura guatemalteca.

ID	Bacteria	Área de inhibición (mm)								
		C ₆ H ₁₂	C ₄ H ₈ O ₂	ETOH ₉₅	FSC	AE	OTC	CNT		
MX 10		00 ± 00b	08.83	±	00 ± 00b	08.54	± 26.88	± 27.63	± 00	±
			0.54a			0.22a	0.08c	071c	00b	
MX 09		00 ± 00c	07.29	±	00 ± 00c	08.61	± 25.15	± 26.00	± 00	±
			0.42a			0.49b	0.67d	0.59d	00c	
MX 07	<i>A. sobria</i>	08.70	± 10.21	±	00 ± 00c	11.57	± 26.53	± 12.50	± 00	±
		0.72b	0.57ab			0.73a	0.08d	0.77a	00c	
MX 01		07.63	± 09.37	±	00 ± 00c	11.30	± 28.40	± 12.41	± 00	±
		0.02a	0.97b			0.84d	0.39e	0.06d	00c	
MX 06		15.24	± 17.99	±	8.86	± 17.44	± 25.08	± 12.89	± 00	±
		0.83b	0.38a		0.28c	0.60a	0.20e	0.04b	00d	
MX 11		14.56	± 18.60	±	8.81	± 19.65	± 25.58	± 28.22	± 00	±
		0.92b	0.75a		0.32c	0.38a	0.30e	0.28f	00d	
MX 02	<i>A. hydrophila</i>	13.76	± 14.59	±	9.46	± 17.64	± 25.87	± 23.81	± 00	±
		0.36a	0.64a		0.47b	0.31c	0.20e	0.86e	00d	
MX 14		11.98	± 13.48	±	8.41	± 15.37	± 27.59	± 21.42	± 00	±
		0.76b	1.28ab		0.31c	0.59a	0.22e	0.29f	00d	

MX	11.40	± 12.95	± 8.26	± 15.13	± 28.67	± 09.74	± 00	±
15	0.59b	0.92ab	0.35c	0.97a	0.52e	0.18b	00d	

Nota: C₆H₁₂: ciclo hexano; C₄H₈O₂: acetato de etilo, ETOH₉₅: alcohol etílico, FSC: fluido súper crítico; AE: aceite esencial; OTC: oxitetraciclina; CNT: control.

Referencias

- Alderman, D. J., & Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196(1), 211–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00535-X)
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2012). *Natural Products Isolation Second Edition* Natural Products Isolation Second Edition.

6. Artículo 2

***In vitro* assay of *Lippia graveolens* and *Lippia alba* extracts against *Aeromonas* spp isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

Ensayo *in vitro* de extractos de *Lippia graveolens* y *Lippia alba* contra *Aeromonas* spp aisladas de tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Ensaio *in vitro* de extratos da *Lippia graveolens* e *Lippia alba* sobre *Aeromonas* spp isolados de tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Josué García-Pérez^{1,2*}, Juan Francisco Pérez-Sabino³, Susana Mendoza-Elvira⁴, Antonio Ribeiro da Silva⁵, & Juan B. Ulloa-Rojas⁶.

^{1*}Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. Calle 15, Avenida 14., 1 km Sur de la Basílica de los Ángeles., Provincia de Cartago, Cartago, 30101, Costa Rica, E-mail: josgar85@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6899-8036>

²Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Edificio T-14, Ciudad Universitaria, zona 12, Guatemala, Guatemala.

³Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Edificio T-14, Ciudad Universitaria, zona 12, Guatemala, Guatemala, fpsabino@yahoo.com.

⁴Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México, Av. Primero de Mayo S/N, Sta Maria Guadalupe las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, México, seme@unam.mx, <https://orcid.org/0000-0003-3672-64711>

⁵ Instituto de Pesquisas de Produtos Naturales, Universidad de Río de Janeiro, Brasil, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco H- Ilha do Fundão 21941-599 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ajorge@ippn.ufrj.br, <https://orcid.org/0000-0002-9745-0184>,

⁶Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2V2R+C4G, Heredia Province, Heredia, Costa Rica, juan.ulloa.rojas@una.cr, <https://orcid.org/0000-0003-4464-1136>.

Abstract.

This study evaluated the antimicrobial activity of *Lippia graveolens* and *Lippia alba* extracts and essential oils against nine strains of *Aeromonas* spp, isolated from *Oreochromis niloticus*. The crude extracts were obtained by percolation technique and CO₂ supercritical fluid extraction, while the essential oils were obtained by hydrodistillation technique using a Clevenger apparatus. The antimicrobial activity was verified by the disc diffusion method at 24 hours for each extract and essential oils. The essential oil of *L. graveolens* showed higher effectiveness to inhibit fish bacterial pathogens (100%) than any extract, revealing an inhibition zone diameter that ranged from 25.20 - 36.94 mm. The extracts from supercritical fluid and from the percolation technique with ethyl acetate and cyclohexane presented the same effectiveness (78%). The crude extract obtained with ethanol 95% showed limited antimicrobial effect (22%), presenting the smaller inhibition zone (ranged from 8.34 to 9.57 mm). On the other hand, *L. alba* displayed a lower antibacterial activity, being the essential oil 67% effective, presenting an inhibition zone that ranged between 10.68 to 16.29 mm. The result of this study indicates that essential oils from both *L. graveolens* and *L. alba* offer a promising alternative for the control of *Aeromonas* spp. growth.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, antimicrobial activity, aquaculture.

Resumen

El presente estudio evaluó la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de *Lippia graveolens* y *Lippia alba*, frente a nueve cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de *Oreochromis niloticus*. Los extractos crudos se obtuvieron por la técnica de percolación y a través de la extracción de CO₂ supercrítico, mientras que los aceites esenciales se realizaron mediante la técnica de hidrodestilación empleando un equipo Clevenger. La actividad antimicrobiana para cada extracto y aceite esencial se verificó mediante el método de difusión en disco a las 24 horas. El aceite esencial de *L. graveolens* mostró mayor efectividad para inhibir patógenos bacterianos de peces (100%), en comparación con los extractos. Se obtuvo un diámetro de inhibición que osciló entre 25,20 a 36,94 mm. Los extractos de fluido supercrítico y de la técnica de percolación con acetato de etilo y ciclohexano presentaron la misma efectividad (77,78%). El extracto crudo obtenido con etanol al 95% mostró efecto antimicrobiano limitado (22,22%), presentando el menor halo de inhibición (8,34 y 9,57 mm).

Por otro parte, *L. alba* mostró menor actividad antibacteriana. El aceite esencial inhibió únicamente el 66,67% de las bacterias patógenas, presentando un halo de inhibición que oscila entre 10,68 a 16,29 mm. El resultado de este estudio indica que los aceites esenciales de *L. graveolens* y *L. alba* son una alternativa prometedora para el control del crecimiento de *Aeromonas* spp.

Palabras clave: *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; actividad antimicrobiana; acuicultura.

Resumo

Neste estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de *Lippia graveolens* e *Lippia alba*, contra nove cepas de *Aeromonas* spp., isoladas de *Oreochromis niloticus*. Os extratos brutos foram obtidos pela técnica de percolação e por extração supercrítica com CO₂, enquanto os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. A atividade antimicrobiana para cada extrato e óleo essencial foi verificada pelo método de disco-difusão em 24 horas. O óleo essencial de *L. graveolens* apresentou maior eficácia na inibição de patógenos bacterianos em peixes (100%), comparado aos extratos. Obteve-se um diâmetro de halo de inibição que variou entre 25,20 e 36,94 mm. Os extratos do fluido supercrítico e da percolação com acetato de etila e ciclohexano apresentaram a mesma eficácia (77,78%). O extrato bruto obtido com etanol 95% apresentou efeito antimicrobiano limitado (22,22%), apresentando o menor diâmetro de halo de inibição (8,34 e 9,57 mm). Por outro lado, *L. alba* apresentou menor atividade antibacteriana. O óleo essencial inibiu apenas 66,67% das bactérias patogênicas, apresentando um halo de inibição que varia de 10,68 a 16,29 mm de diâmetro. Os resultados deste estudo indica que os óleos essenciais de *L. graveolens* e *L. alba* são uma alternativa promissora para o controle do crescimento de *Aeromonas* spp.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; atividade antimicrobiana; aquicultura.

Introduction.

Tilapia (*Oreochromis* spp.) is considered worldwide as the second-largest aquaculture finfish species group by quantity ^{7 20}. In Guatemala, the tilapia aquaculture industry, according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), produced approximately 10,914 MT of tilapia in 2018. This industry has shown an annual growth of 10.53% since 2011, supplying an alternative source of animal protein and providing an income to Guatemalans with different economic development levels.

In recent years, the tilapia culture industry has been significantly affected worldwide by the breakout of infectious diseases, especially from viral and bacterial origin, being the most frequently cited: *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *Lactococcus garvieae*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda*, *E. anguillarum*, *E. piscicida*, *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. shuberti*, *A. dhakensis* ^{16 17 18}.

Moreover, the conventional approaches to control fish diseases have limited success in fish disease prevention, control and treatment. In aquaculture traditional health management, to avoid mortalities, control and prevent the infection from several bacterial pathogens, a broad-spectrum of veterinary drugs are used ^{19 33 41}. Fish diseases related to parasites and fungal pathogens have mostly been treated and controlled by using formalin, quaternary ammonia and hydrogen peroxide ³⁸. While, for treating bacterial diseases, the antibiotics most widely used are florfenicol, oxytetracycline, enrofloxacin, chloramphenicol, erythromycin and trimethoprim + sulfametoxazol ³³. It is commonly known that chemical and antibiotic drugs can have negative effects in the environment, especially on different trophic levels, also on human health by consumption of contaminated food and water ²⁹ and most importantly their use can result in drug-resistant pathogenic microbes. Thus, their use is now restricted or banned in some countries.

Therefore, medicinal plants and their extracts have been widely used as antibacterial, antiparasitic, antiviral and immunostimulants ^{3 10 36 46 47 54}. Due to their phytochemical components, such as flavonoids, terpenes, tannins, alkaloids and coumarins, among others, they have been assessed for the treatment and prophylaxis of different pathogens in the aquaculture industry. Moreover, most of these natural products are environmentally friendly, because they are biodegradable compared to synthetic products such as antibiotics, and they are less likely to generate drug resistance on bacteria due to their molecule's diversity ³⁶.

Several plant extracts have been shown to display antibacterial effects in aquaculture, including those from *Lippia* sp. *Lippia* belongs to the Verbenaceae family, comprising 200 species widely distributed in America ⁵⁶. In Guatemala, approximately 13 species have been identified, being *L. graveolens* (Khunth) and *L. alba* (Mill), the most common. They are also frequently used for medical purposes in public health ^{11 50}. Among the phytochemical components in *Lippia* spp., the most frequently found are *p*-cymene, *cis*-sabinene hydrate, terpinen-4-ol, carvacrol, thymol, caryophyllene oxide, citral, geranial, neral and linalool ^{21 37}.

Most of these major components from different *Lippia* spp. have an antibacterial capacity in different fish bacterial pathogens, such as *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *Edwardsiella* spp. and *Flavobacterium columnare*, among others, but there is no evidence for *L. graveolens* against fish bacteria pathogens ^{3 48}.

The efficiency of the metabolites against different bacterial pathogens depends on the method of extraction and solvent. Although several studies have evaluated the efficacy of herbal medicine ^{24 40 51 57}, limited information exist on the efficacy of extracts obtained using different extraction methods and solvents. Therefore, this study aimed to determine the antimicrobial capacity (*in vitro*) of different types of extracts and essential oils of *L. alba* and *L. graveolens* against nine pathogenic strain bacteria isolated from tilapia cultures in Guatemala.

Material and Methods.

Plant collection and extraction methodology.

Two *Lippia* species (Verbenaceae) were collected in Guatemala during April, 2019. Fresh and healthy leaves of mature *L. graveolens* (LG) and *L. alba* (LA) plants were collected from wild suburbs in Zacapa department (14°59' 50.2" / 89° 40' 26.2") and from Guatemala City (14° 35' 6.45" / 90° 33' 24.34") at the medical plant collection from Centro Experimental Docente de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala (CEDA-FAUSAC); respectively. The plant species were identified at Herbario de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. The plants were oven-dried at 45 °C for 48 h, crushed into powder using an electric grinder, sieved through a mesh size 300-500 µm and finally stored at room temperature until use.

Once the plant-powder was prepared, three methods of extraction with different solvents were done to obtain the crude extracts and essential oils from *L. graveolens* and *L. alba*. The extraction methods were the following:

Percolation technique. Crude extracts were obtained using the percolation technique (PE) through consecutive extractions with three different solvents: cyclohexane (CHL), ethyl acetate (ACE), and ethanol 95% (ETH)⁴⁴. Sequential extractions were carried in amber glass bottle (5 L), filled with 300 g of plant-powder and 3,000 mL of the selected solvent (ratio 1:10 w/v). Each solution was maintained for 48 h at room temperature (28 ± 2 °C). Afterwards, the solution was separately filtered separately through a Whatman No. 1 filter paper (Whatman, USA).

Finally, the filtered solution was evaporated using a rotary vacuum evaporator at 45 °C and 115 mB until the solvent faded completely. The resulting crude extracts were separately stored at 4 °C in 150 mL amber glass bottles.

Supercritical fluid technique. The supercritical fluid extracts (FSC) were obtained using a homemade apparatus based on the model according to Loaiza-Salguero, Ortíz & Robles (1994). For each plant, the extraction vessel (2,000 mL) was filled with 1,000 g of plant-powder and 1,000 mL of ethanol 95% (ratio 1:1). The extractions were done at 45 °C and 1,300 psi of CO₂ for 45 min. The extracts obtained were collected in a glass flask. To improve the efficiency of this extraction method, the procedure was repeated three times with the same plant material and the same solvent ratio. Finally, the extracts were evaporated using a rotary vacuum evaporator at 45 °C and 115 mB. The crude extracts were separately stored at 4 °C in 150 mL amber glass bottles.

Essential oil. Essential oils (EOS) were extracted by hydro-distillation using a Clevenger type apparatus³⁰. Each extraction used 150 g of plant-powder, placed in a 2,000 mL volumetric flask and covered with tap water until submerged. The extraction lasted 2 h after water boiling. The essential oils were collected and stored at 4 °C in 5 mL amber glass bottles.

For each of the extraction methods, the extract yield was estimated as $Y_{(\%)} = M/MV \times 100$, where M is the mass of extract obtained with each method and MV is the amount of ground dried plant material used.

Microorganisms and culture conditions.

Nine bacterial pathogens (six strains of *Aeromonas sobria* and three of *A. hydrophila*) were obtained from the bacterial collection of Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala, and used in the study.

These bacteria were isolated from diseased tilapia (*Oreochromis* spp.) and identified using the API 20NE (BIOMERUX, France). The bacteria were cultured in trypticase soy agar at 28 °C for 24 h before used in the antimicrobial susceptibility tests.

Antimicrobial screening.

The effect of the different extracts obtained from *L. graveolens* and *L. alba* were assayed on the nine bacteria strains using the disc diffusion method as described by Tkachenko et al. (2016). Each bacterial suspension was adjusted to a concentration of $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, in sterile phosphate buffer solution (PBS), then inoculated on the surface of Muller Hinton agar and spread all around. Subsequently, three blank discs were permeated with 10 mg of each extract and in the case of EOS, 10 μ L were used. For positive control, standard discs of oxytetracycline (OXI: 40 μ g) and florfenicol (FLC: 40 μ g) were obtained from AVIMEX®. For negative controls, blank discs individually impregnated with 20 μ L of cyclohexane, ethyl acetate, and ethanol 95% were used. All discs were placed in an incubator for 10 min at 30 °C to volatilize the solvents. Then, the discs for each treatment and controls were separately positioned on the surface of the plates containing the bacteria strains. Each one of the extracts were tested conducted twice in triplicate for the nine bacteria strains. The plates were incubated at 28 °C for 24 hours. The inhibition zone diameters (IZD) were measured to an accuracy of 0.01 mm after 24 h of incubation. The interpretation of the IZD was made according to García-Pérez & Marroquin-Mora, (2020) for the following criteria: extracts or essential oils were considered effective when their IZD was equal or greater than half of the IZD measured for each bacteria strain against the antibiotics. In this case, the most widely used in Guatemala aquaculture, which is oxytetracycline.

Analysis of the plant's mayor components by GC/MS.

Due to their high effectiveness in the antimicrobial screening, the EOS chemical components of *L. graveolens* and *L. alba* were determined. The GC/MS analyses were performed using a Shimadzu 2010 Plus system coupled with a Shimadzu QP-2010 Plus selective detector (MSD), equipped with a DB5-MS capillary fused silica column (60 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μ m film thickness). The oven temperature was programmed from 60 °C to 246 °C at 3 °C/min and then held isothermally at 246 °C for 20 min. He (99.999%) was used as carrier gas with a flow rate of 1.03 mL/min; split ratio of 1:50. Mass spectra were taken at 70 eV. The m/z values were recorded in the range of m/z 40–700 Da.

The components were identified by their mass spectra and retention indices compared to values reported in the literature ¹. Relative amounts of components were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

Data analysis.

All experiments were conducted twice in triplicate. Mean values and standard deviations of the inhibition zone diameters in disk diffusion assay were calculated from the experimental data obtained. Mean significance of inhibition zone diameter for different bacterial strains, plant material and type of extraction were analyzed using Generalize Liner Mixed Model (GLM: Negative binomial), to predict the effect of different plant and extraction methodology. The differences between the mean values were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analysis was carried out using R statistic software ³⁹.

Results.

Among the different extraction methods used, the highest yield in both plants was obtained with the FSC method (5.29% for *L. alba* and 5.06% for *L. graveolens*), followed by PE extraction (solvent: CLH + ACE + ETH). Of the PE methods, 95 % ethanol produced the highest yield (4.16 % for *L. graveolens* and 3.28% for *L. alba*); while cyclohexane (2.48% *L. graveolens* and 0.73% for *L. alba*) was the less efficient. The lowest yield was obtained with essential oil extraction using water as solvent for *L. alba* with 0.53% (Table I).

Table 1. Yield extraction for *L. graveolens* and *L. alba* with different extraction methods.

Method	Solvent	Yield (%)	
		<i>L. alba</i>	<i>L. graveolens</i>
Percolation extraction (PE)	Cyclohexane (CLH)	0.78 ± 0.04	2.48 ± 0.03
	Ethyl acetate (ACE)	2.37 ± 0.06	3.16 ± 0.06
	Ethanol 95% (ETH)	3.28 ± 0.02	4.16 ± 0.09
	PE Total	6.43	9.80
Supercritical fluid extraction (FSC)	CO ₂ + Ethanol 95%	5.29 ± 0.08	5.06 ± 0.05
Essential oil extraction (EOS)	Water	0.71 ± 0.18	4.00 ± 0.12

Note: derived from research.

Concerning the aroma displayed by the plants and extracts, the difference was evident. *L. graveolens* had a spicy odor and exhibited an intense pungent odor, while *L. alba* had a distinctly penetrating herb-like and an intense lemon citrus odor. In both plants, the supercritical fluid and essential oil extraction had similar aroma, as well as the extract obtained by PE with 95% ethanol. In contrast, the extracts obtained with cyclohexane and ethyl acetate showed a milder aroma.

The results of antimicrobial activities are presented in Table 1. No inhibition zones were recorded in the negative controls (cyclohexane, ethyl acetate, and ethanol 95%), while the positive controls (oxytetracycline: OXI and florfenicol: FLC) showed strong antibacterial activity against *Aeromonas* spp. Their inhibition zones diameter ranged from 9.58 to 31.79 mm (Figure 1c).

The inhibition zone diameter for OXI ranged from 9.74 to 27.17 mm. To be considered effective, the inhibition zone of plant extracts must be equal or greater than 5.10 – 13.59 mm, depending on the bacteria strain. A lower value was considered ineffective in this study.

Table 2. Antimicrobial potential of *L. graveolens* and *L. alba* against *Aeromonas* spp.

Bacteria strain	ID	Commercial antibiotics		<i>Lippia alba</i> (LA)					<i>Lippia graveolens</i> (LG)				
		OXI	FLC	AC E	CL H	EO S	ET H	FS C	AC E	CL H	EO S	ET H	FS C
<i>A. sobria</i>	MX 01	12.4	32.3	00.0	00.0	13.5	00.0	00.0	09.4	07.6	32.0	00.0	11.2
		1 ± 7 ±	0 ± 0 ±	3 ± 0 ±	0 ± 0 ±	0 ± 0 ±	0 ± 6 ±	0 ± 0 ±	7 ±				
		0.47	0.21	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.81	0.04	1.47	0.00	0.55
	MX 06	27.1	30.7	00.0	00.0	13.2	00.0	00.0	17.8	15.2	27.9	08.6	17.9
		1 ± 7 ±	0 ± 0 ±	4 ± 0 ±	0 ± 0 ±	0 ± 0 ±	6 ± 1 ±	6 ± 7 ±	5 ±				
		0.64	0.57	0.00	0.00	0.39	0.00	0.00	0.68	0.58	0.69	0.35	0.83
	MX 07	12.6	28.8	00.0	00.0	15.8	00.0	00.0	10.1	08.6	28.3	00.0	11.8
		2 ± 8 ±	0 ± 0 ±	1 ± 0 ±	0 ± 0 ±	0 ± 0 ±	0 ± 6 ±	7 ± 0 ±	9 ±				
		0.52	0.90	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00	0.38	0.54	0.74	0.00	0.64

		25.7	31.1										
	MX	7 ±	4 ±	00.0	00.0	13.9	00.0	00.0	08.0	00.0	25.2	00.0	08.6
	09			0 ±	0 ±	6 ±	0 ±	0 ±	1 ±	0 ±	±	0 ±	5 ±
		0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.89	0.00	0.49	0.00	0.43		
		0.52	0.65										
	MX	27.1	26.7	00.0	00.0	11.7	00.0	00.0	08.8	00.0	30.4	00.0	08.9
	10	7 ±	9 ±	0 ±	0 ±	8 ±	0 ±	0 ±	1 ±	0 ±	8 ±	0 ±	6 ±
		0.86	0.28	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.49	0.00	0.74	0.00	0.50
	MX	12.6	30.1	00.0	00.0	13.2	00.0	00.0	18.0	13.9	29.6	09.1	20.2
	11	3 ±	6 ±	0 ±	0 ±	7 ±	0 ±	0 ±	7 ±	8 ±	±	±	±
		0.41	0.62	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.80	0.96	0.41	0.49	0.75
	MX	24.0	28.4	00.0	00.0	15.7	00.0	00.0	14.3	13.5	36.9	09.5	17.3
	02	9 ±	5 ±	0 ±	0 ±	1 ±	0 ±	0 ±	3 ±	3 ±	4 ±	7 ±	3 ±
		0.89	0.61	0.00	0.00	0.56	0.00	0.00	0.68	0.49	1	0.42	0.72
<i>A. hydrophila</i>	MX	22.2	26.5	00.0	00.0	10.6	00.0	00.0	13.1	12.3	30.6	08.7	15.3
	14	3 ±	1 ±	0 ±	0 ±	8 ±	0 ±	0 ±	3 ±	8 ±	5 ±	2 ±	4 ±
		1.01	0.59	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00	1.07	0.77	3.56	0.41	0.46
	MX	09.5	25.5	00.0	00.0	16.2	00.0	00.0	13.5	11.5	33.3	08.3	15.2
	15	9 ±	2 ±	0 ±	0 ±	9 ±	0 ±	0 ±	1 ±	6 ±	4 ±	4 ±	2 ±
		0.36	0.45	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.99	0.55	4.42	0.38	0.73

Note: Values (mean ± standard error) of inhibition zones diameter of oxytetracycline (OXI), florfenicol (FLC), ethyl acetate (ACE), cyclohexane (CHL), essential oil extraction (EOS), ethanol 95% (ETH), Supercritical fluid extraction (FSC).

Among all tested extracts and EO's, *L. graveolens* exhibited a higher inhibitory effect. The EOS-LG was the most effective, which inhibited 100% of bacteria strains and presented inhibition zone diameters that ranged from 25.2 to 36.94 mm (Figure 1a).

The other extracts showed lower inhibitory effects, FSC-LG, CLH-LG, ACE-LG (78%) respectively and ETH-LG (22%), respectively. In the case of ETH-LG the inhibition zone diameters ranged from 8.34 to 9.57 mm, for this reason, it was classified as an extract with limited antibacterial effect according to the criteria established in this study. The crude extracts from *L. alba* did not show any antibacterial activity, while the EO inhibited 67% of the *Aeromonas* spp. strains, presenting inhibition zone diameters ranging from 10.68 to 16.29 mm (Figure 1b).

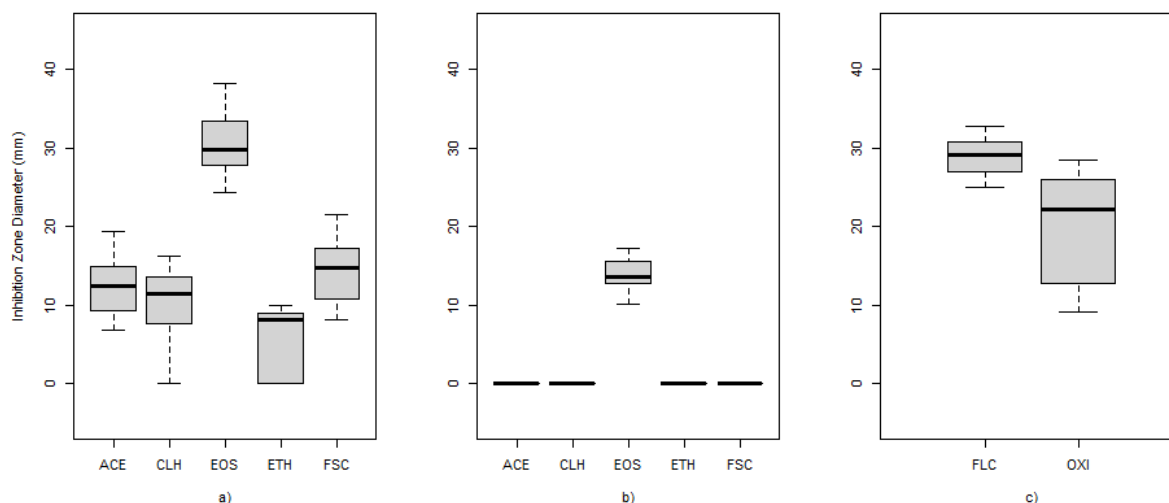


Figure 1. Antimicrobial activity of different organic extracts and essential oil from *L. graveolens* and *L. alba* against *Aeromonas* spp.

Note: datas expressed as means of IZD and the standard deviation, a): *L. graveolens*, b): *L. alba*, c): Antibiotic; OXI: oxytetracycline; FLC: florfenicol; EOS: essential oil; ACE: ethyl Acetate; CLH: cyclohexane; ETH: Ethanol 95%, FSC: Supercritical fluid.

According with the GLM analysis, the glmer.nb ($Y \sim (\text{PLANT/EXTRACT})$, with two random effects (1| SAMPLES) + (1| PLANT) was the best model to predict the extracts strong dependent activity against all bacteria species evaluated. *L. graveolens* as essential oil is the best predictor to inhibit *Aeromonas* spp. ($p < 0.001$), compared with the antibiotic and *L. alba*. Although the inhibition zone diameter of *L. alba* essential oil was smaller than *L. graveolens*, it inhibited 67% of bacteria strains, proving to be effective.

Among the samples, resistance was present for oxytetracycline in 44% (*A. hydrophila* = 1 strain / *A. sobria* = 3 strain) of the bacteria strains. This study showed that *L. graveolens* and *L. alba* antimicrobial activity does not depend on the antibiotic susceptibility pattern (Figure 2).

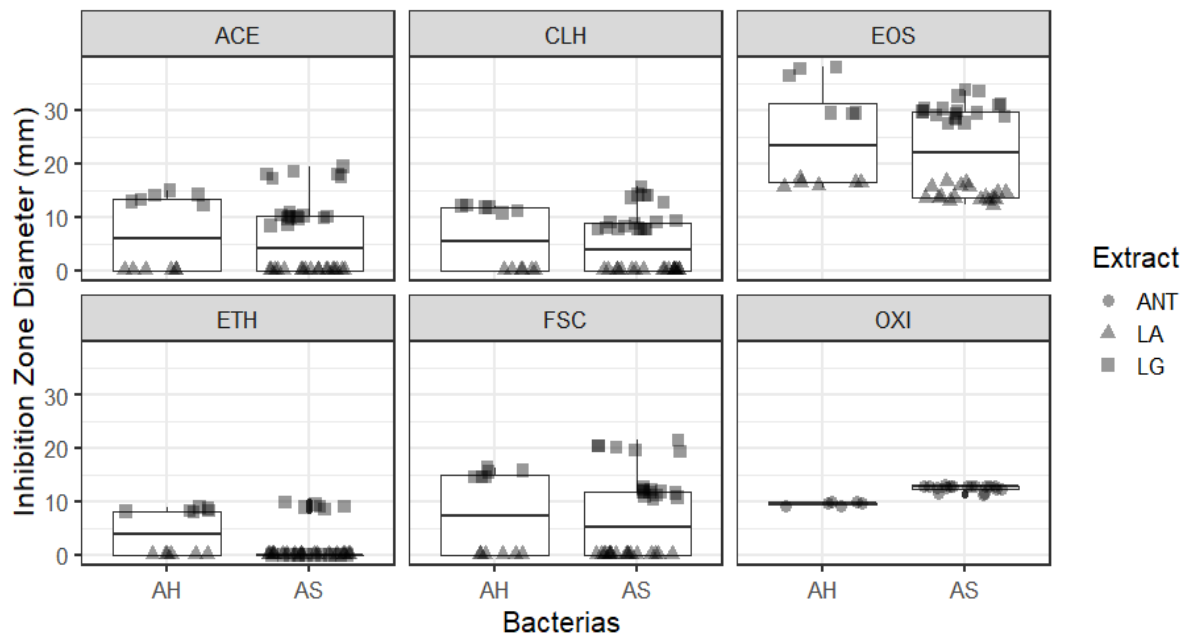


Figure 2. Antimicrobial activity of *L. graveolens* and *L. alba* against *Aeromonas* spp. resistance to oxytetracycline.

Note: AH: *Aeromonas hydrophila*, AS: *A. sobria*, LG: *L. graveolens*, LA: *L. alba*, ANT: Antibiotic; OXI: oxytetracycline; EOS: essential oil; ACE: ethyl Acetate; CLH: cyclohexane; ETH: Ethanol 95%, FSC: Supercritical fluid.

The volatile components identified in the essential oil of the *L. graveolens* and *L. alba* essential oils are reported in Table II. In *L. graveolens* 10 components were identified and represented nearly 98.22% of the total essential oil composition. The major compounds were thymol (81.31%) and *o*-cymene (8.44%), while the rest of the volatile components were below 2%. Moreover, in *L. alba* 20 components were identified and represented nearly 97.74% of the total essential oil composition. The major compounds were geranial (36.8%), followed by neral (25.7%), and 1,8-cineole (13.45%), while the rest of the compounds were below 4%.

Table 3. Composition of essential oils (%) in *L. graveolens* and *L. alba*.

Components	Area (%)		RI
	<i>Lippia graveolens</i>	<i>Lippia alba</i>	
<i>g</i> -amorphene	-	0.55	1495
δ -cadinene	-	0.54	1522
Carvacrol	0.51	-	1298
ϵ -caryophyllene	1.62	1.89	1417
Caryophyllene oxide	1.95	-	1582
Caryophyllene oxide	-	3.87	1582
1,8-Cineole	-	13.45	1026
cubebol	-	1.01	1514
<i>o</i> -cymene	8.44	-	1022
Geranial	-	36.8	1264
Geraniol	-	0.58	1249
Geranyl acetate	-	1.33	1379
Geranyl isobutanoate	-	0.55	1514
6-methyl-5-hepten-2-one	-	2.29	981
α -humulene	1.09	-	1452
Humulene epoxide II	0.97	-	1608
Linalool	-	1.52	1095

Myrcene	0.91	-	988
Neral	-	25.7	1235
1-Octen-3-ol	-	1.46	974
trans-sabinene hydrate	-	0.86	1104
Terpinen-4-ol	0.81	0.56	1174
α -terpineol	-	1.21	1186
δ -Terpineol	-	0.42	1162
Thymol	81.31	0.6	1289
Thymol, methyl ether	0.61	-	1232
α -Ylangene	-	2.55	1373
Total area (%)	98.22	96.65	

Note: RI: Retention index.

Discussion.

The essential oils from *L. graveolens* and *L. alba* offer a promising alternative for the control of *Aeromonas* spp. growth. The oil extracted from *L. graveolens* exhibited *better antibacterial properties than L. alba*, which included a significantly larger inhibition zone diameter against *Aeromonas* spp. and inhibition against all bacteria strains.

It is well documented that *L. graveolens* have an antibacterial effect against a broad group of pathogens, especially against Gram-negative bacteria^{2 6 42}, however, until now there was no evidence for the effectiveness of *L. graveolens* against fish bacteria pathogens. There are many studies with plants with similar metabolites profile as *L. graveolens* such as *Origanum vulgare*. This plant known as European oregano has well documented^{3 4 26 49} uses against fish bacterial pathogens especially Gram-negative bacteria.

These properties may be attributed to several active metabolites, such as carvacrol, thymol, α -terpinene and *o*-cymene ²⁵ that have antibacterial activity and have been detected in various species of *Origanum*.

The chemical composition of *L. graveolens* in this study was slightly different compared to other studies from Guatemala and Mexico ^{9 32 43}. For example, Pérez-Sabino et al., (2012) also reported thymol (67.4 – 73.5%) and *o*-cymene (1.9 – 5.9%) as the major constituents in *L. graveolens* from Zacapa department, but did not report the presence of Myrcene, Humulene epoxide II and α -Humulene. Also, the same authors reported that *L. graveolens* presented three different chemotypes (Thymol, Carvacrol, and Mixed), indicating that these volatile compounds were affected by the prevailing geographical region in Guatemala, genetic factors, nutrients in the soil, harvest time and method of extraction among other factors.

In addition, there are other species of *Lippia* with similar chemical profile as *L. graveolens* which have a strong antibacterial effect, such as *L. sidoides* and *L. organoides* ^{23 27 30}, which have thymol (9-76.6%) and carvacrol (49.7%) as major components. The essential oils of *L. organoides* and *L. sidoides* had inhibitory effects against *A. hydrophila* with a minimal inhibitory and bactericidal concentration ranging from 1250 to 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This indicates that probably those components, thymol and carvacrol, are responsible for the antimicrobial activity, showing an inhibitory effect against Gram-negative such as *A. hydrophila*, but also Gram-positive bacteria. It should be noted that both compounds (thymol and carvacrol) have a similar chemical structure. Although, the chemical composition does not appear to have any major effect on the antibacterial activity, both metabolites provoke the disintegration of the external membrane of bacteria²⁷.

In the present study, thymol, which is responsible for the inhibition of *Aeromonas* spp, was found to be the major compound in the *L. graveolens* essential oils. This phenolic terpene exhibits strong antimicrobial activity capable of rupturing the external membrane of bacteria and increasing its permeability to ATP ²⁷. On the other hand, the efficiency of *L. graveolens* extracts could be related to the extraction methodology and solvent used, which can affect the amount of thymol extracted. In the present study, *L. graveolens* showed antibacterial activity with FSC-LG extract, which indicated that the polarity of CO₂ combined with ethanol 95% as co-solvent might increase the extraction of polar compounds such as thymol ¹². However, this method probably didn't extract the total amount of the polar compounds, since its efficiency was lower than the EOS, which could contain higher concentration of thymol.

Moreover, the efficiency of the PE method was related to the type of solvent used, varying the amount of the major component with the higher antibacterial activity. In this case, CLH-LG and ACE-LG were the solvents with the higher affinity to extract the thymol, however, they apparently did not extract enough of that compound. Consequently, those extracts showed lower antibacterial activity compared to FSC and EOS. This indicates that it is necessary to properly select the type of solvent and technique for extracting a target compound efficiently. Another important factor to be considered is the amount of extract used to permeate the discs in the assays. In this case, 10 mg for the crude extract and 10 μ L for the EOS appears to be enough to incorporate a specific proportion of the compounds to show antibacterial activity.

Lippia alba EOS inhibited the growth of *A. hydrophila* and *A. sobria* agreeing with results found by other authors, who reported the effectiveness of *L. alba* EOS in tests against several *Aeromonas* spp. strains and other Gram-negative and positive bacteria^{15 30 31 35}, indicating that the volatile compounds with antibacterial activity were geranial, neral and 1,8-cineole. Other authors reported that the antibacterial activity of *L. alba* is mainly against Gram-positive bacteria^{5 45}. This is due to the morphological structure of the bacterial cell wall of Gram-positive bacteria, which is less complex than Gram-negative bacteria⁵⁵. The present study suggests that the lipophilic character of essential oils of *L. alba* may interact with lipopolysaccharides, therefore, reducing its efficiency to cause changes in Gram-negative bacteria structure, which could result, in some cases, in no bacterial lysis.

Moreover, the chemical composition of *L. alba* EOS could vary depending on location, soil type, weather conditions, among other factors, showing different chemotypes with varying proportions of major compounds (e.g., geranial, neral, carvone, linalool, myrcene)^{13 21 52}. The antimicrobial activity of these compounds may be correlated with a specific chemotype.

Finally, bacteria can develop resistance to antimicrobials due to the continuous and prolonged exposure to them^{14 34 40}. Contrarily, due to the complex composition of *L. graveolens* and *L. alba* essential oils, it is expected that bacteria rarely develop a resistance because plants have different mechanisms of action that implies several cell targets⁸. This work confirms that *L. graveolens* (extracts and EOS) and *L. alba* (EOS) have a high antimicrobial activity, indicating that this is independent on the antibiotic susceptibility pattern, since at least one byproduct of *Lippia* spp. influences the most resistant bacteria. The efficiency of the plant is related to the plant's chemical composition, but also to the extraction procedure.

The effectiveness of *L. alba* was limited compared to *L. graveolens*, due to 1) a lower content of the major metabolites, 2) different types of metabolites. This research also addresses the importance of choosing the proper extraction method and solvent to reach a high effectiveness in the extracts.

Conclusion.

This study shows that essential oils from *Lippia* spp. have high antibacterial activity against *Aeromonas* spp., isolated from tilapia. The greatest inhibitory effect was obtained with *L. graveolens* EOS. The results suggest that the antibacterial activity of EOS is attributed to the abundance of monoterpenes and terpenoids compounds.

However, further investigations are required to evaluate the mechanisms of the antibacterial activity of the essential oils from *Lippia* spp. Additionally, future studies should include the isolation of major bioactive components of each EOS and assess their individual effects. In this sense, special attention should focus on thymol for *L. graveolens* and geranial for *L. alba*, to evaluate their efficiency in controlling pathogens in aquaculture.

Acknowledgements.

This research constitutes a chapter of the first author's doctoral thesis of the program Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, and it was Funded by the Universidad de San Carlos de Guatemala cohort 2017. I would like to express my very great appreciation to PhD Elisa Blanda for the accurate review of this document and support during the research process.

References.

1. Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4ta ed. USA: Carol Stream, IL: Allured publishing corporation; 2007.
2. Adame-Gallegos JR, Andrade-Ochoa S, Nevarez-Moorillon GV. Potential Use of Mexican Oregano Essential Oil against Parasite, Fungal and Bacterial Pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2016; 19(3): 553–567.
3. Alagawany M, Farag MR, Salah AS, Mahmoud MA. The role of oregano herb and its derivatives as immunomodulators in fish. *Reviews in Aquaculture* 2020; 12(4): 2481-2492.
4. Anastasiou TI, Mandalakis M, Krigas N, Vézignol T, Lazari D, Katharios P, et al. Comparative Evaluation of Essential Oils from Medicinal-Aromatic Plants of Greece:

- Chemical Composition, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity against Bacterial Fish Pathogens. *Molecules* 2020; 25(1): 148.
5. Ara N, Nur, MH, Amran MS, Wahid MII, Ahmed M. In vitro Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Leaves and Flowers Extracts from *Lippia alba*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2009, 12: 87-90.
 6. Arana-Sánchez A, Estarrón-Espinosa M, Obledo-Vázquez EN, Padilla-Camberos E, Silva-Vázquez R, Lugo-Cervantes E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology* 2010; 50(6): 585–590.
 7. Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Corner R. Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 2010; 365: 2897–2912.
 8. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94(1): 223–253.
 9. Calvo-Irabién LM, Parra-Tabla V, Acosta-Arriola V, Escalante-Erosa F, Díaz-Vera L, Dzib GR, et al. Phytochemical Diversity of the Essential Oils of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Populations along an Edapho-Climatic Gradient. *Chemistry & Biodiversity* 2014; 11(7): 1010–1021.
 10. Chakraborty SB, Hancz C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture* 2011; 3(3): 103-119.
 11. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala (No. 633.88097281 C118). 1era ed. Guatemala; Editorial Universitaria; 1996.
 12. Conde-Hernández LA, Espinosa-Victoria JR, Trejo A, Guerrero-Beltrán JÁ. CO₂ supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering* 2017; 200: 81–86.
 13. Cunha ALB, Chaves FCM, Bizzo HR, Souza AM. Caracterizacao quimica do oleo essencial de ervacidreira, nas condicoes de Manaus, AM. *Horticultura Brasileira* 2012; 30(2): S5780–S5784.
 14. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2010; 74(3): 417-433.

15. De Souza RC, de Souza EM, da Costa MM, Melo JFB, Baldisserotto B, Copatti CE. Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquaculture Nutrition* 2019; 25(1): 39-45.
16. Dong HT, LaFrentz B, Pirarat N, Rodkhum C. Phenotypic characterization and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from red tilapia, *Oreochromis* sp., in Thailand. *Journal of Fish Diseases* 2014; 38(10): 901-913.
17. Dong HT, Nguyen VV, Le HD, Sangsuriya P, Jitrakorn S, Saksmerprome V, et al. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Aquaculture* 2015; 448(1): 427-435.
18. Dong HT, Senapin S, Jeamkunakorn C, Nguyen VV, Nguyen NT, Rodkhum C, et al. Natural occurrence of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in farmed hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Southeast Asia. *Aquaculture* 2019; 499: 17-23.
19. Espinosa A, Bermúdez MC. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Estudios Sociales: Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional* 2012; 1(2): 221-232.
20. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción 2020; [Access June 30th of 2021], doi.org/10.4060/ca9229es.
21. Fischer U, Lopez R, Pöll E, Vetter S, Novak J, Franz CM. Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. *Flavour and Fragrance Journal* 2004; 19(4): 333–335.
22. García-Pérez J, Marroquín-Mora D. Evaluación in vitro de extractos de plantas medicinales como posibles agentes antimicrobianos para bacterias patógenas en tilapia. *Kuxulkab'* 2021; 27(57): 27-35.
23. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46(9): 3590-3595.
24. Hernández-Contreras Á, Hernández MD. Application of aromatic plants and their extracts in aquaculture. *Feed Additives* 2020; 239–259.
25. Karousou R, Kokkini S. The genus *Origanum* (Labiatae) in Crete: distribution and essential oils. *Bocconeia* 2003; 16, 717–721.
26. Kačániová M, Terentjeva M, Vukovic N, Puchalski C, Roychoudhury S, Kunová S, et al. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2017; 25(8): 1108-1116.

27. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91(3): 453-462.
28. Loaiza-Salguero ES, Ortíz SD, Robles E. *Extracción supercrítica con CO₂*. Bachelor Thesis, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 1994, 74 p.
29. Love DC, Rodman S, Neff RA, Nachman KE. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environmental Science and Technology* 2011; 45: 7232–7240.
30. Majolo C, da Rocha SIB, Campos E, Maia FC, Ribeiro H. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 2016; 48(5): 2380-2387.
31. Majolo C, Pilarski F, Chaves FCM, Bizzo HR, Chagas EC. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. *Journal of Essential Oil Research* 2018; 1–10.
32. Martínez-Natarén DA, Parra-Tabla V, Ferrer-Ortega MM, Calvo-Irabién LM. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. *Plant Systematics and Evolution* 2014; 300(3): 535-547.
33. Mo WY, Chen Z, Leung HM, Leung AOW. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research* 2017; 24: 8978-8989.
34. More SJ. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. *Irish Veterinary Journal* 2020; 73(1): 2.
35. Olivero-Verbel J, Barreto-Maya A, Bertel-Sevilla A, Stashenko EE. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2014; 45(3): 759-767.
36. Olusola SE, Emikpe BO, Olaifa FE. The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2013; 3(3): 404 - 412.
37. Pérez-Sabino JF, Mérida-Reyes M, Farfán-Barrera CD, Silva AJRD. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* HBK da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. *Química Nova* 2012; 35(1): 97-101.

38. Picón-Camacho SM, Marcos-Lopez M, Beljean A, Debeaume S, Shinn AP. In vitro assessment of the chemotherapeutic action of a specific hydrogen peroxide, peracetic, acetic, and peroctanoic acid-based formulation against the free-living stages of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora). *Parasitology research* 2012; 110(2): 1029-1032.
39. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. 2020; [access February 2 of 2021]. <https://www.R-project.org/>.
40. Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 2014; 433: 50–61.
41. Rico A, Phu TM, Satapornvanit K, Min J, Shahabuddin AM, Henriksson PJG, Murray FJ, Little DC, Dalsgaard A, Van den Brink PJ. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture* 2013; 412-413, 231–243.
42. Ribas-Pilau M, Hartz S, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology* 2011; 42(4): 1616-1624.
43. Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves M, Proença da Cunha A. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica* 2013; 69(01): 80–83.
44. Sarker SD, Nahar L, Editor. *An Introduction to Natural Products Isolation*. 1 er ed. India: Humana Press, 2012.
45. Sena JG, Melo JG, Saraiva AM, Gonçalves AM, Psiottano MNC, Xavier HS. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2006; 16(4): 506-509.
46. Shankar-Murthy K, Kiran BR, Venkateshwarlu M. A review on toxicity of pesticides in Fish. *International Journal of Open Scientific Research* 2013; 1(1): 15-36.
47. Sutili FJ, Velasquez A, Pinheiro CG, Heinzmann BM, Gatlin III DM, Baldisserotto B. Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Fish & Shellfish Immunology* 2016; 56: 155-161.

48. Sutili F, Gatlin DM, Heinzmann BM, Baldisserotto B. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture* 2017; 0, 1-12.
49. Starliper CE, Ketola HG, Noyes AD, Schill WB, Henson FG, Chalupnicki MA, et al. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research* 2015; 6(1): 89-97.
50. Standley PC. *Flora of Guatemala*. 1^{er} ed, Vol. 24, Part IX. Field Museum of Natural History, 1970.
51. Stratev D, Zhelyazkov G, Noundou XS, Krause RWM. Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquaculture International* 2018; 26: 289–308.
52. Tavares ES, Juliao LS, Lopes D, Bizzo HR, Lage CLS, Leitao SG. Analysis of the essential oil from~ leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2005; 15: 1–5.
53. Tkachenko H, Buyun L, Terech-Majewska E, Osadowski Z. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extracts obtained from *Ficus* spp. leaves against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Archives of Polish Fisheries* 2016; 24(4): 219-230.
54. Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2014; 38(5): 417-428.
55. Zengin H, Baysal A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules* 2014; 19(1): 17773 –17798.
56. Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MH, Maia JGS. Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal* 1998; 13: 47–48.
57. Zhu F. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture* 2020; 735422.

7. Artículo 3

Antimicrobial activity of diverse chemotypes of *Lippia graveolens* against *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia.

Actividad antimicrobiana de diversos quimiotipos de Lippia graveolens contra Aeromonas hydrophila aislada de tilapia.

Josué García-Pérez^{1,2*}, josuegarciap@profesor.usac.edu.gt, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-6899-8036>

Juan Pérez-Sabino³, fpsabino@yahoo.com, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0001-5736-0371>

Susana Mendoza-Elvira⁴, seme@unam.mx, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0003-3672-64711>

Antonio Ribeiro da Silva⁵, ajorge@ippn.ufrj.br, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-9745-0184>,

Juan Ulloa-Rojas⁶, juan.ulloa.rojas@una.cr, Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0003-4464-1136>.

Abstract

[Objective] This study aimed to evaluate the antimicrobial efficacy of essential oil (EO) from diverse chemotypes of *Lippia graveolens* against oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila*, which primarily affects the culture of tilapia (*Oreochromis* sp) in Guatemala. **[Methodology]** *L. graveolens* were collected in three departments in Guatemala, the EO was obtained by hydrodistillation and characterized by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). Subsequently, an antimicrobial assay was conducted by screening the disk and dilution susceptibility tests, and evaluation of synergistic interactions among the chemotypes, each test being carried out in triplicate. **[Results]** The analysis revealed the presence of twenty-seven compounds in the EO obtained from the chemotypes, the main class being monoterpene. The major constituents identified were cis-Dihydro- β -terpineol (8.84%) in chemotype I, carvacrol (51.82%) in chemotype II, and thymol (79.62%) in chemotype III. All EO chemotypes of *L. graveolens* demonstrated the ability to inhibit the growth of *A. hydrophila*. Thymol chemotype exhibited the strongest inhibitory effect against bacterial growth, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 92.4 $\mu\text{g/mL}$ and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 184.8 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, the results suggest that there is no synergistic or additive effect when combining different chemotypes of *L. graveolens*.

[Conclusions] This the first report of *L. graveolens* chemotypes exhibiting antimicrobial activity against oxytetracycline-resistant *A. hydrophila*. The findings suggest the chemotype thymol could be a potential treatment for infections in the tilapia aquaculture in Guatemala.

Keywords: essential oil; oregano; tilapia; aquaculture; thymol.

Resumen

[Objetivo] El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de diferentes quimiotipos de *Lippia graveolens* contra la cepa *Aeromonas hydrophila* resistente a la oxitetraciclina, la cual afecta principalmente al cultivo de tilapia (*Oreochromis* sp) en Guatemala. **[Metodología]** *L. graveolens* se colectó en tres departamentos de Guatemala. Los aceites esenciales (AE) se obtuvieron mediante hidrodestilación y se caracterizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS). Posteriormente, se realizó un ensayo antimicrobiano utilizando pruebas de susceptibilidad en disco y dilución, y se evaluaron las interacciones sinérgicas entre los diferentes quimiotipos. Cada prueba se repitió tres veces.

[Resultados] El análisis reveló la presencia de veintisiete compuestos en los AE obtenidos de los quimiotipos, siendo los monoterpenos la clase principal. Los principales constituyentes identificados fueron cis-dihidro- β -terpineol (8.84 %) en el quimiotipo I, carvacrol (51.82 %) en el quimiotipo II y timol (79.62 %) en el quimiotipo III. Todos los AE de los diferentes quimiotipos de *L. graveolens* demostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *A. hydrophila*. En particular, el quimiotipo timol obtuvo el efecto inhibitorio más fuerte contra el crecimiento bacteriano, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 92.4 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración mínima bactericida (CMB) de 184.8 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados sugieren que no existe un efecto sinérgico o aditivo al combinar los diferentes quimiotipos de *L. graveolens*. **[Conclusiones]** Este estudio constituye el primer informe sobre la actividad antimicrobiana de los diferentes quimiotipos de *L. graveolens* contra *A. hydrophila* resistente a la oxitetraciclina. Los hallazgos sugieren que el quimiotipo timol podría ser un tratamiento potencial para las infecciones en el cultivo de tilapia en Guatemala.

Keywords: aceite esencial; orégano; tilapia; acuicultura; timol.

Introduction

In aquaculture practices in Guatemala, antibiotics have primarily been utilized for therapeutic and prophylactic control of bacterial diseases. Many farmers believe that administering antibiotic therapy can provide significant advantages, such as reducing mortality rates resulting from bacterial infections. However, the repeated utilization of antibiotics has resulted in the emergence of drug-resistant bacteria, such as *Aeromonas hydrophila* (García-Pérez et al., 2021).

This bacterium can bioaccumulate in fishery products through the food chain and be consumed by the local community, causing bacteria resistance or harm to human health (Rigos et al., 2004; Romero et al., 2012; Alanazi et al., 2021). As a result, to manage drug-resistant bacteria, it is necessary to either increase drug dosages or develop a new generation of antibiotics. To prevent this serious issue, the livestock must change the practice to treat diseases in fish or new alternative has emerged as an additional tool to control both resistant and non-resistant pathogens, as a means to reduce antibiotic usage and medicinal plants can be one such alternative (Olusola et al., 2013; Ham et al., 2020).

The genus *Lippia* (Verbenaceae) is among the most used plants in Central and South America for this purpose (Pascual et al., 2001). This genus comprises around 200 species of herbs, shrubs, and small trees (Terblanché and Kornelius 1996). In Guatemala, *Lippia* is represented by around 13 species, with *L. graveolens*, *L. alba*, *L. salamensis*, *L. chiapasensis*, *L. dulcis*, and *L. cardiostegia* being the most widely distributed (Standley & Williams, 1970). Ethnobotanically, *L. graveolens* is commonly referred to as Mexican oregano. It is an aromatic perennial shrub that can grow up to 2 meters tall, with short-pilose branches and leaves on petioles typically measuring 5-10 mm in length (Standley & Williams, 1970).

The shrub is characterized by its axillary capitate spikes inflorescences, which consist of white, sessile and zygomorphic flowers. These flowers are hermaphrodite and self-compatible (Ocampo-Velázquez et al., 2009). Essential oils are found in all parts of most *Lippia* genus plants, but leaves or aerial parts are particularly rich in this component, as indicated by Pascual et al. (2001). *Lippia graveolens* is typically harvested from wild populations growing in a range of ecological conditions, from semi-arid to sub-humid lands. This can result in a great morphological variability and chemical polymorphism, with essential oil composition being the most affected component (Tezara et al., 2014).

In Guatemala, researchers have identified different chemotypes of essential oils, namely carvacrol, thymol, and a minor type known as sesquiterpene (E)-caryophyllene. The latter is sometimes referred to as a mixed chemotype because it contains a variable combination of metabolites (Pérez-Sabino et al., 2012; Salgueiro et al., 2003). However, it is unknown whether the other chemotype with sesquiterpene as the major compound exists in Guatemala. To date, no research has been conducted on the antimicrobial properties of the EO chemotypes originated from wild populations of *L. graveolens* in Guatemala.

However, *L. graveolens* from various regions around the world has been investigated as a potential source of bioactive compounds possessing antibacterial and antioxidant properties, as well as for its potential use in preventing fish diseases (Bautista-Hernández et al., 2021; García-Pérez et al., 2019; Leyva-López et al., 2017). Several studies have evaluated the inhibitory effects of *L. graveolens* against a variety of bacteria, including Gram-positive strains such as *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* as well as Gram-negative bacteria like *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* (Arana-Sánchez et al., 2010; Castellanos-Hernández et al., 2020; Hernández et al., 2009; Martínez et al., 2021). Therefore, the aim of this study was to assess the antimicrobial properties of diverse chemotypes of *L. graveolens* grown wild in Guatemala, both individually and in combination, against the predominant bacterium in finfish aquaculture in Guatemala.

Methodology

Plant collection

Samples of a wild population of *Lippia graveolens* (Verbenaceae) in Guatemala were obtained: I. El Subinal, Guatatoya, El Progreso (N14°51'15" / W090°08'05" [440 m.a.s.l]), II. El Carrizal, San Jacinto, Chiquimula (N14° 37' 18" / W089° 28' 58" [700 m.a.s.l]) and III. Casas de Pinto, Río Hondo, Zacapa (N15°01'25" / W089°36'35" [180 m.a.s.l]). Its taxonomic name was verified using the Flora of Guatemala Part IX (Standley & Williams, 1970). The samples were authenticated by Mr. Max Merida from San Carlos University, voucher specimens (USCG 48320, USCG 48321 and USCG 48322) were deposited at the Herbarium USCG CECON-USAC. The plant material was oven-dried at 45 °C for 48 h, then ground into powder with an electric grinder. Then, the powder was sieved through a 300-500 µm mesh size and stored in a sealed bag at room temperature until further analysis.

Essential oils extraction and Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) analysis to determine the chemotype of *L. graveolens*

A Clevenger type device was used to extract essential oils (EO) by hydro-distillation (Majolo et al., 2018). For each extraction, 100 g of plant-powder was added in a 2,000 mL volumetric flask and covered with tap water until submerged.

The extraction lasted 2 h after water boiling and the collected EO were stored at 4 °C in 10 mL amber glass bottles. This procedure was repeated three times. The EO yield was estimated as $Y (\%) = M/MV \times 100$, where M is the mass of EO obtained (g), and MV is the amount of dried plant-powder used (g). The GC/MS analyses were performed using a Shimadzu 2010 Plus system coupled with a Shimadzu QP-2010 Plus selective detector (MSD), equipped with a DB5-MS capillary fused silica column (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness). The oven temperature was set to increase from 60 °C to 246 °C at 3 °C/min and then remained at 246 °C for 20 min. He (99.999%) was used as carrier gas with a flow rate of 1.03 mL/min, and a split ratio of 1:50. Mass spectra were taken at 70 eV. The m/z values were recorded in the range of m/z 40–700 Da. The EO components were identified by comparing their mass spectra and retention indices to literature values (Adams, 2007). Relative amounts of components were calculated based on GC peak areas without correction factors.

Antimicrobial assay

Bacterium strain and culture

Aeromonas hydrophila (strain: CEMA150219) was obtained from the bacterial collection of the Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala. This strain of bacterium was previously found in sick tilapia (*Oreochromis* sp.) and has shown resistance to oxytetracycline, which is the most widely used antibiotic in tilapia farming in Guatemala. To activate the strain, it was according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standard method M31-T: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, and considering the changes made by Alderman & Smith (2001) in the Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. The bacterium was seeded on TSA agar (TSA: Merck®) for 18 hours at 28°C.

The temperature was selected according to the criteria of Noga (2010), which states that for the microbiology of fish pathogens, it should be carried out at the temperature at which the organisms are naturally found, rather than 37 °C, as indicated by the standard methodology. This is because tropical or subtropical fish pathogens can exhibit poor growth or fail to grow under such conditions. Subsequently, 3-5 colonies were identified and placed in 1X phosphate-buffered saline (PBS) until reaching a bacterial concentration of $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, which was verified with an absorbance of 1.00 at a wavelength of 600 nm, measured in a spectrophotometer.

Disk diffusion method

The effect of different EO chemotypes: a) cis-Dihydro- β -terpineol [I], b) carvacrol [II], c) thymol [III]) and their combination of two EO chemotypes: d) [I : II], e) [I: III], f) [II:III], in a 50:50 ratio (v / v) and combining the three EO chemotypes g) [I:II:III] in a ratio of 33:33:33 (v/v)) from *L. graveolens* on *A. hydrophila* was tested using the disk diffusion method according to Bauer et al., (1966) and considering the changes made by Mazumder et al., (2020). Within 15 minutes of preparation of the inoculum, a 100 μ L aliquot of *A. hydrophila* strain was evenly spread on separate Muller-Hinton agar plates (MHA: Merck®). The aliquot was spread across the agar plate using an L-shaped loop, ensuring that it covered the entire diameter of the Petri dish. Next, in an empty paper disc (BBL: Sensi-Disc®) with a diameter of 6 mm were inoculated with a total of 10 μ L of each chemotype alone, in combination and oxytetracycline discs (40 μ g) were used as a positive control. Each EO and combination was tested in triplicate and placed one disc per Petri dish. The plates with discs were incubated at 28 °C for 24 hours under aerobic conditions, and after the inhibition zone diameters (IZD) were measured with electronic calipers with an accuracy of 0.01 mm. The interpretation of the antibacterial activity of EO was determined according to the criteria established by Pascual et al., 2001 and considering the changes made by García-Pérez & Marroquín-Mora (2020), considering a specific plant extract, essential oil, or other natural product is considered to have antibacterial action when it produces IZD equal to or greater than 50% compared to the most used antibiotic. In the case of Guatemala, the most used antibiotic in aquaculture is oxytetracycline.

Minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC)

MIC and MBC determinations were done using the broth macrodilution assay according to NCCLS M31-T, considering the changes made by Alderman & Smith (2001).

Two-fold serial dilutions of each essential oil chemotype of *L. graveolens* were prepared in the Muller-Hinton broth (MHB: Merck®) with a concentration ranging from 11.5 – 11,825 µg/mL. Triton X (Sigma-Aldrich®) was used as the EO solubilizer at a concentration of 0.1% (v/v). The *A. hydrophila* inoculum was adjusted to a concentration of 1×10^8 CFU/mL in PBS and then transferred into MHB to obtain a bacterial count of 1×10^5 CFU/mL.

The tubes were then incubated at 28 °C for 24 hours under aerobic conditions. Finally, an aliquot of 100 µL from each tube was plated in the TSA and incubated for 18 hours for bacterial count. The MIC and CMB were established according to Levison (2004) criteria: MIC was defined as the minimal concentration of antibiotic that prevents the clear suspension of 10^5 CFU/mL from becoming turbid after overnight incubation; turbidity generally connotes a 10-fold increase in bacterial density. And MBC was determined as the lowest concentration of antibacterial agent that reduces the viability of the initial bacterial inoculum to $\geq 99\%$.

Assessing synergistic interaction among chemotype of L. graveolens.

The synergistic interaction among *L. graveolens* EO chemotypes was determined according to Nikkhah et al., (2017) and Gutierrez et al., (2008) with modifications. Four interactions were tested by combining the three EO chemotypes: a) I:II, b) I:III, c) II:III, in a ratio of 50:50 (v/v) and combining the three EO chemotypes d) I:II:III in a ratio of 33:33:33 (v/v). Once the independent MIC was determined, the fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated as follows:

- FIC of chemotype cis-Dihydro-β-terpineol (FIC_I) = MIC (cis-Dihydro-β-terpineol_[a, b]) in combination/MIC (cis-Dihydro-β-terpineol) alone.
- FIC of chemotype carvacrol (FIC_II) = MIC (carvacrol_[a, c]) in combination/MIC (carvacrol) alone.
- FIC of chemotype thymol (FIC_III) = MIC (thymol_[b, c]) in combination/MIC (thymol) alone.
- FIC of all chemotypes (FIC_IV) = MIC (all chemotypes [d]) in combination/MIC (each chemotype) alone.

The FIC Index (FIC_i) was calculated as the sum of each FIC. The results obtained were interpreted as follows: synergistic effect (FIC_i ≤ 0.5); additive effect (0.5 < FIC_i ≤ 1); no interactive effect (1 < FIC_i ≤ 4); antagonistic effect (FIC_i > 4) as described by Gutierrez et al., (2008).

Data analysis

The EO yields and inhibition zone diameters for disk diffusion assay were statistically analyzed with a nonparametric test of Kruskal Wallis followed by Mann–Whitney–Wilcoxon test ($p < 0.05$). The major compounds of the EO chemotypes from *L. graveolens* identified (greater than 1%) were used to determine the chemotaxonomy by using a Principal Component Analysis (PCA). Statistical analysis was carried out using statistical software (R Core Team, 2022).

Analysis and results

The EO extracted from *Lippia graveolens* collected in Guatemala showed a yellow-reddish color, and yields were significantly different among departments ($p < 0.05$): 1.42 ± 0.25 % for El Progreso, 1.64 ± 0.14 % for Chiquimula and 3.77 ± 0.28 % for Zacapa. Therefore, it may be inferred that there is a relationship between EO origin and its total production. These findings coincided with Martínez-Natarén et al. (2014), who found that the EO yield of different plants varied according to the edaphoclimatic gradient. Therefore, different odors, colors, and amounts of metabolites may be found. Concerning the chemotype aroma, there was an evident difference, with the EO chemotypes from Zacapa and Chiquimula having a spicy and an intense pungent odor, while El Progreso chemotype had a less intense pungent odor. Accordingly, based on odor, color, and consistency, it is inferred that the number of phenolic compounds may be greater in the Zacapa and Chiquimula chemotypes than in El Progreso. On the contrary, El Progreso could have a greater amount of non-phenolic substances (oxygenated sesquiterpenes). The chromatographic profiles of each chemotype of *L. graveolens* are shown in Figure 1.

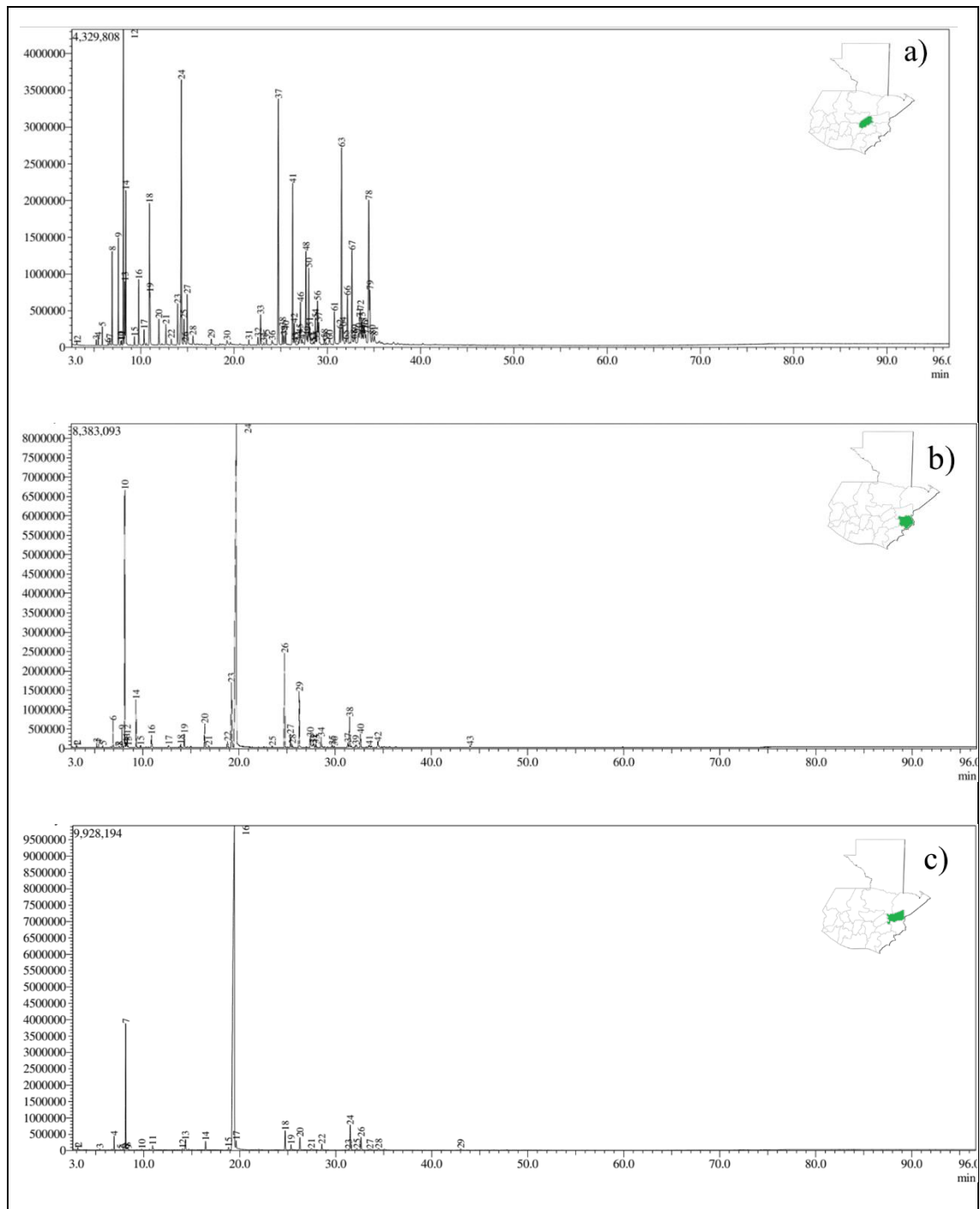


Figure 1. GC chromatogram of essential oils from *Lippia graveolens* collected from: a) El Progreso (I: cis-Dihydro-β-terpineol), b) Chiquimula (II: Carvacrol) and c) Zacapa (III: Thymol) departments. Derived from research.

According to table 1, the content and proportion of chemical constituents of the EO (monoterpenes, sesquiterpenes, phenylpropanoids and other compounds) were different among departments. The PCA horizontal axis explained 81.4% of the total variance and the vertical axis 18.6% (Figure 2), suggesting the existence of three chemotypes (I: *cis*-Dihydro- β -terpineol: El Progreso, II. Carvacrol: Chiquimula, and III. Thymol: Zacapa) characterized by their different content of chemical metabolites.

Table 1. Chemical composition (%) of the three chemotype essential oils from *Lippia graveolens*

No.	Compounds*	Type	RT	RI	Chemotypes area (%)		
					I	II	III
1	Myrcene	M	6.918 - 6.926	988	1.82	1.13	-
2	<i>p</i> -Cymene	M	8.121- 8.140	1022	7.22	13.94	7.76
3	Limonene	M	8.281	1024	1.40	-	-
4	1,8-Cineole	M	8.390	1026	3.54	-	-
5	γ -Terpinene	M	9.306	1054	2.28	2.38	-
6	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	M	9.776	1065	1.61	-	-
7	<i>cis</i> - β -Terpineol	M	10.925	1140	3.66	-	-
8	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	M	10.984	1098	1.18	-	-
9	Isoborneol	M	13.944	1155	1.25	-	-
10	<i>cis</i> -Dihydro- β -terpineol	M	14.344	1156	8.84	-	-
11	δ -Terpineol	M	14.964	1162	1.66	-	-

12	Carvacrol, methyl ether	M	16.440	1241	-	1.45	-
13	Thymol	M	19.439	1289	-	5.34	79.62
14	Carvacrol	M	19.750	1298	-	51.82	-
15	<i>E</i> -Caryophyllene	M	24.750	1417	8.74	6.53	1.65
16	α -Humulene	S	26.269- 26.280	1452	5.4	3.92	1.1
17	<i>cis</i> -Muuroala-3,5-diene	S	27.117	1448	1.43	-	-
18	<i>dehydro</i> -Aromadendrane	O	27.700	1460	3.38	-	-
19	<i>b</i> -Chamigrene	S	27.996	1476	2.72	-	-
20	δ -Amorphene	S	28.936	1549	1.58	-	-
21	<i>E</i> -Nerolidol	M	30.754	1561	1.07	-	-
22	Caryophyllene oxide	S	31.515 - 31.526	1582	7.41	2.21	2.32
23	Hinesol	S	32.140	1640	1.95	-	-
24	Citronellyl pentanoate	O	32.636 - 32.640	1624	3.3	-	1.2
25	γ -Eudesmol	S	33.544	1630	1.76	-	-
26	α -Eudesmol	S	34.444	1652	6.82	-	-
27	<i>epi</i> - α -Cadinol	S	34.556	1638	1.82	-	-
Total amount of monoterpene (%)					44.27	82.59	89.03

Total amount of sesquiterpene (%)	30.89	6.13	3.42
Total amount of other compounds (%)	6.68	0	1.2
Total amount of volatile compounds different chemotype of <i>Lippia graveolens</i> (%)	81.84	88.72	93.65

Note: derived from research. Type M: monoterpene, S: sesquiterpene, O: other compound, RT: retention time, RI: retention index, *Only compounds with a chromatographic area greater than 1% are listed in this table. Chemotypes I: *cis*-Dihydro- β -terpineol (El Progreso), II: carvacrol (Chiquimula), III: thymol (Zacapa) of *Lippia graveolens*.

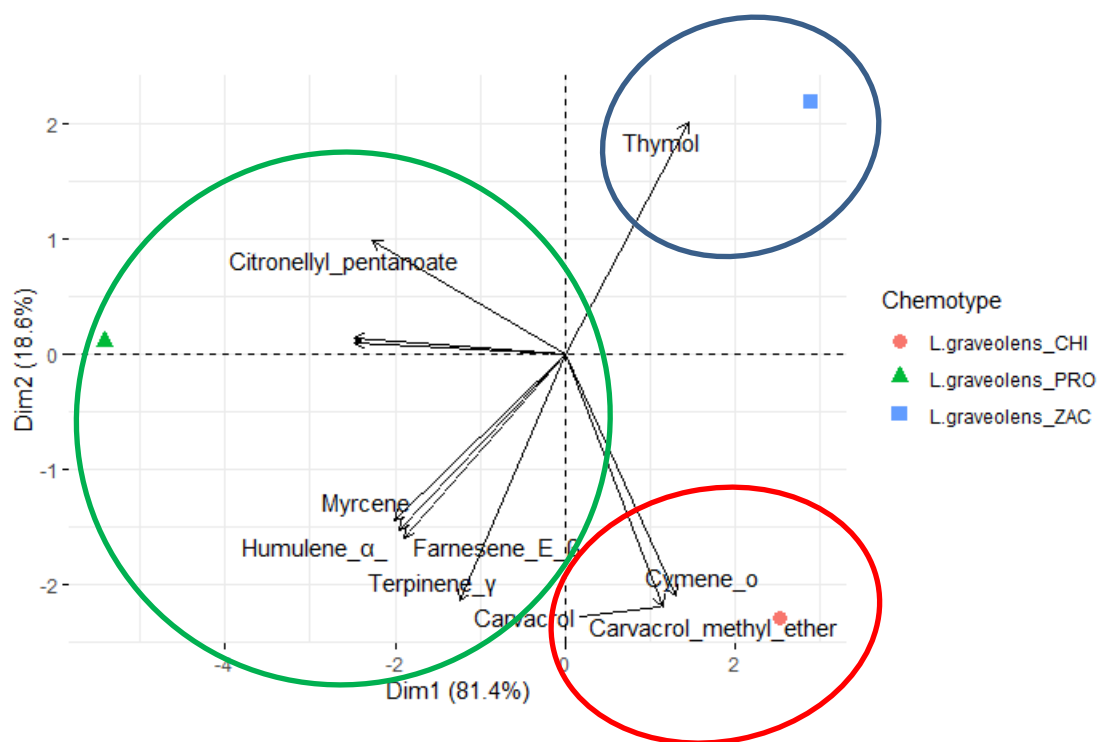


Figure 2. PCA of the 15 major components of the chemotypes among the departments PRO: El Progreso, CHI: Chiquimula and ZAC: Zacapa, of *Lippia graveolens*. Derived from research.

In general, twenty-seven compounds were identified in the EO of *L. graveolens* (Table 1), which accounted for 81.84%, 88.72%, and 93.65% of the total EO composition of chemotypes I, II, and III, respectively. The monoterpenes constituted the main class with *cis*-Dihydro- β -terpineol (8.84%) as a major constituent of chemotype I, carvacrol (51.82%) and thymol (79.62%) as the major constituents of chemotype II and III, respectively. The second major group of compounds found in the EO were the sesquiterpenes, with caryophyllene oxide as the major constituent of chemotypes I (7.41%) and III (2.32%), whereas the α -Humulene (3.92%) was the major constituent of chemotype II.

These results evidenced the EO chemical polymorphism of this species as mentioned previously for Guatemala (GT) and México (MX): thymol (GT: 67.4 – 73.5% / MX: 84.76 - 91.77%), carvacrol (GT: 50.3-51.8% / MX: 72.20 - 83.49%), (*E*)-caryophyllene (GT:10.3 – 12.3 % / MX: 0%), and caryophyllene oxide (GT: 2.7 – 4.9% / MX: 4.94 - 11.34%) (Martínez-Natarén et al., 2011; Pérez-Sabino et al., 2012; Salgueiro et al., 2003; Senatore & Rigano, 2001). Pérez-Sabino et al., (2012) classified the chemotype I, as mixed because its heterogeneous compounds summed no more than 15% of the chemical structure.

In this study, chemotype I had *cis*-Dihydro- β -terpineol (8.84%), *E*-Caryophyllene (8.74%) and *p*-Caryophyllene oxide (7.41%) as major constituents of the EO. These proportions are different from those reported previously from EO obtained in the same location. The differences in terms of some compounds could be attributed to genetic plasticity of *L. graveolens*, soil composition, climate variability, harvest time and extraction method among other factors (Benjemaa et al., 2022; Martínez-Natarén et al., 2014).

The results indicate that three EO chemotypes of *L. graveolens* provide promising alternatives for controlling the growth of *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia. Chemotypes III and II were the most effective, presenting IZD ranging from 28.46 to 34.03 mm (Table 2). Chemotype I exhibited the smallest IZD (9.95 mm), although it is important to note that even though the IZD is the lowest, it still indicates an effect based on the criteria established in this study. For the combination of EO chemotypes, the highest IZD (29.19 – 33.43 mm) was for II:III followed by I:III and I:II:III. The lowest IZD (24.82 mm) was obtained for the combination of chemotype I:II. The positive control (OXI) had an IZD of 10.32 mm, indicating the resistance of the *A. hydrophila* to oxytetracycline.

Table 2. Antibacterial activity of the three chemotype essential oils from *L. graveolens* against *A. hydrophila*.

Chemotype combination (Ratio v/v)	Inhibition zone diameter means \pm standard deviation (mm) *	MBC $\mu\text{g/mL}$	MIC $\mu\text{g/mL}$	FICi
I	09.95 \pm 0.05 ^e	2,956.3	1,478.1	-
II	28.46 \pm 0.45 ^c	369.5	184.8	-
III	34.03 \pm 0.30 ^a	184.8	92.4	-
I : II (50:50)	24.82 \pm 0.40 ^d	739.1	369.5	2.25
I : III (50:50)	30.34 \pm 0.48 ^b	369.5	184.8	2.13
II : III (50:50)	33.43 \pm 0.58 ^a	184.8	92.4	1.50
I : II : III (33:33:33)	29.19 \pm 0.20 ^c	369.5	184.8	3.13
OXI	10.32 \pm 0.52 ^e			

Note: derived from research. I: *cis*-Dihydro- β -terpineol (El Progreso), II: carvacrol (Chiquimula), III: thymol (Zacapa), OXI: oxytetracycline (positive control), MIC: Minimum Inhibitory Concentrations, MBC: Minimum bactericidal concentrations, FICi: FICi \leq 0.5: synergic effect, 0.5 < FICi \leq 1: additive effect, 1 < FICi \leq 4: no interactive effect, FICi > 4: antagonistic effect. * Means in the same column with different superscript are significantly different (p < 0.05).

The MIC and MBC values for the three EO chemotypes ranged from 92.4 – 2,956.3 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). The lowest MIC and MBC values found were for chemotype III, 92.4 – 184.8 $\mu\text{g/mL}$, followed by chemotype II: 184.8 – 369.5 $\mu\text{g/mL}$ and finally chemotype I: 1,478.1 – 2,956.3 $\mu\text{g/mL}$. Although chemotype I obtained the highest MIC and MBC, it still may be considered effective; according to Bussmann et al., (2010), MIC values below 5,000 $\mu\text{g/mL}$ are considered to exert strong antimicrobial activity.

Results indicated that the three EO chemotypes mixture from *L. graveolens* did not show a synergistic or additive effect. However, the greatest effect was observed when chemotype III was combined with any of the other chemotypes (I and II), even with chemotype I (with the lower inhibition capacity), thus having an antibacterial effect.

The EO extracted from chemotype III (thymol) exhibited better antibacterial properties than EO components of chemotypes II and I, with a significantly greater inhibition zone diameters and a smaller concentration for MBC and MIC. Therefore, it may be inferred that the properties of thymol metabolite could be responsible for the antibacterial activity observed in this study. It is well documented that *L. graveolens* have an antibacterial effect against a broad group of pathogens, especially against Gram-negative bacteria (Arana-Sánchez et al., 2010; Bautista-Hernández et al., 2021; Hernández et al., 2009; Leyva-López et al., 2017; Salgueiro et al., 2003).

However, this is the first report analyzing the effect of different EO chemotypes from *L. graveolens* growing in Guatemala against aquaculture oxytetracycline resistant bacteria, such as *A. hydrophila*. It showed that secondary metabolites of *L. graveolens* may have a direct effect as antimicrobial agents, as stated by several authors for other plant species (Höferl et al., 2020; Koba et al., 2009; Nwanosike et al., 2016).

Although the antimicrobial effects of *L. graveolens* is well established, the mechanism of action is mostly unknown. Based on what was observed in the study of Lambert et al. (2001), it is inferred that the essential oil of *L. graveolens* can rupture the external membrane and may cause permeability of the ATP; this derived from the fact that the main components for *L. graveolens* is thymol or carvacrol. Furthermore, it was found that thymol and carvacrol could disintegrate the outer membrane of bacteria of *A. hydrophila*, isolated from different sources, and other types of bacteria, such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (Helander et al., 1998). On the other hand, it is deduced that the components of chemotype I showed lower antibacterial activity due to its relative amount and type of sesquiterpenes, which have weak antimicrobial activity. This weak antimicrobial activity has been attributed to the fact that most sesquiterpenes does not have the appropriate hydrophobicity to break down the bacterial membrane (Bassole et al., 2005).

Conclusions

The results suggest the essential oil from *L. graveolens* offer a promising alternative for the control of *Aeromonas hydrophila* growth. It was found three chemotypes: I: cis-Dihydro- β -terpineol located in El Progreso Department, II: Carvacrol in the Chiquimula Department, and III: Thymol in the Zacapa Department. All EO exhibit antibacterial activities even in different proportion, but there is no synergistic or additive effect when combining different chemotypes. The results suggest that the EO chemotype thymol can be used for aquaculture bacterial infections.

However, further studies are needed to assess the toxicity of *L. graveolens* EO on tilapia. Because certain EO chemicals may have a direct impact on the target bacteria, larger amounts could potentially become toxic to fish and other organisms. Furthermore, it is recommended to investigate the *in vivo* efficacy of EO treatment for *Aeromonas* infections in finfish production in Guatemala.

Acknowledgements

This research constitutes a chapter of the first author's doctoral thesis of the program: “Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica”, and it was funded by the Universidad de San Carlos de Guatemala cohort 2017. I would like to express my very great appreciation to Carolina Marroquín for the accurate review of this document.

Conflict of Interest

The authors declare no competing interests.

Author contribution statement

All the authors declare that the final version of this paper was read and approved. The total contribution percentage for the conceptualization, preparation, and correction of this paper was as follows: J.R.G.P 50%, J.F.P.S 10%, S.E.M.E 10% A.R.S. 10% and J.B.U.R. 20%.

Data availability statement

Please select only one of the following: The data supporting the results of this study will be made available by the corresponding author, **[J.R.G.P]**, upon reasonable request.

References

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Pub. Corp.

- Alanazi, F., Almugbel, R., Maher, H. M., Alodaib, F. M., & Alzoman, N. Z. (2021). Determination of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline residues in seafood products of Saudi Arabia using high performance liquid chromatography–Photo diode array detection. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(6), 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.04.017>
- Alderman, D. J. and Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196(1), 211–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00535-X)
- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R. and Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 585–590. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x>
- Bassole, I. H. N., Nebie, R., Savadogo, A., Ouattara, C. T., Barro, N. and Traore, S. A. (2005). Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4(10), 1156–1160. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/71260>
- Bautista-Hernández, I., Aguilar, C. N., Martínez-Ávila, G. C. G., Torres-León, C., Iliina, A., Flores-Gallegos, A. C., Kumar Verma, D. and Chávez-González, M. L. (2021). Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) as source of bioactive compounds: A review. *Molecules*, 26(17), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules26175156>
- Benjemaa, M., Snoussi, M., Falleh, H., Hessini, K., Msaada, K., Flamini, G. and Ksouri, R. (2022). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of four essential oils collected in the North-East of Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(2), 338–355. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2068971>
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F. and Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 132(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>

- Castellanos-Hernández, O. A., Rodríguez-Sahagún, Martha., Acevedo-Hernández, Gustavo., Aarland-Rayn, Clarenc. and Rodríguez-Sahagún, Araceli. (2020). Evaluation of the essential oil of *Lippia graveolens* as a growth inhibitor of *Salmonella* sp, *E. coli* and *Enterococcus* sp. *E-CUCBA*, 7(14), 1–6. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i14.155>
- García-Pérez, J., Marroquín-Mora, D. and Pérez-González, M. (2019). Inclusión de extracto de *Lippia graveolens* (Kunth) en la alimentación de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) para la prevención de estreptococosis por *Streptococcus agalactiae* (Lehmann y Neumann, 1896). *Revista AquaTIC*, 54(1), 15–24. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7681118#:~:text=La%20presente%20investigaci%C3%B3n%20evalu%C3%B3%20el%20efecto%20de%20la,L.%20graveolens%2C%20en%20una%20dieta%20comercial%20para%20tilapia.>
- García-Pérez, J., Ulloa-Rojas, J. B. and Mendoza-Elvira, S. (2021). Bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala. *Uniciencia*, 35(2), 1–17. <https://doi.org/10.15359/RU.35-2.4>
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., and Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>
- Ham, Y., Yang, J., Choi, W. S., Ahn, B. J. and Park, M. J. (2020). Antibacterial activity of essential oils from Pinaceae leaves against fish pathogens. *Journal of The Korean Wood Science and Technology*, 48(4), 527–547. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2020.48.4.527>
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. and von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., García, A. M., Meraz, S., Caballero, J. and Lira, R. (2009). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 295–300. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85611265010.pdf>

- Höferl, M., Wanner, J., Tabanca, N., Ali, A., Gochev, V., Schmidt, E., Kaul, V. K., Singh, V. and Jirovetz, L. (2020). Biological activity of *Matricaria chamomilla* essential oils of various chemotypes. *Planta Medica International Open*, 07(03), 114–121. <https://doi.org/10.1055/a-1186-2400>.
- Koba, K., Poutoli, P. W., Raynaud, C., Chautmont, J. P. and Sanda, K. (2009). Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.3329/bjp.v4i1.998>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. and Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 1(91), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Levison, M. E. (2004). Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(3), 451-465. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.04.012>
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G. and Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- Majolo, C., Pilarski, F., Chaves, F. C. M., Bizzo, H. R. and Chagas, E. C. (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>
- Martínez, J. Ramy., Chérigo, Lilia. and Ríos, Nivia. (2021). Evaluation of antibacterial properties of three Panamanian plants against multi-drug resistant bacteria. *Tecnociencia*, 23(1), 351–358. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/224/2241861015/index.html>
- Martínez-Natarén, D. A., Parra-Tabla, V., Dzib, G. and Calvo-Irabién, L. M. (2011). Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K., Verbenaceae), and the relationship between trichome density and climate. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 138(2), 134–144. <https://doi.org/10.3159/TORREY-D-10-00007.1>

- Martínez-Natarén, D. A., Parra-Tabla, V., Ferrer-Ortega, M. M. and Calvo-Irabién, L. M. (2014). Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. *Plant Systematics and Evolution* 300(3), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0902-y>
- Mazumder, A., Choudhury, H., Dey, A. and Sarma, D. (2020). Bactericidal activity of essential oil and its major compound from leaves of *Eucalyptus maculata* Hook. Against two fish pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. *Plants*, 23(1), 149–155. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1729248>
- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B. and Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257(1), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021>
- Noga, E. (2010). *Fish disease: Diagnosis and treatment*. Iowa: Blackwell Publishing
- Nwanosike, E., Fatokun, O. T., Okhale, S. E., Nwanosike, M. and Folashade Kunle, O. (2016). Phytochemistry and ethnopharmacology of *Lippia* genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes. *International Journal of Pharmacognosy*, 3(5), 201–211.
- Ocampo-Velázquez, R. V., Malda-Barrera, G. X., Suárez-Ramos, G. (2009). Biología reproductiva del orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) en tres condiciones de aprovechamiento. *Agrociencia*, 43(5), 475–482. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000500003
- Olusola, S. E., Emikpe, B. and Olaifa, F. (2013). The potentials of medicinal plants extracts as bio-antimicrobial in aquaculture. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 404–412. https://journaldatabase.info/articles/potentials_medicinal_plant_extract_as.html
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D. and 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)

- Pérez-Sabino, J. F., Mérida-Reyes, M., Farfán-Barrera, C. D. and Ribeiro da Silva, A. J. (2012). Analysis and discrimination of the chemotypes of *Lippia graveolens* H.B.K. of Guatemala by solid phase microextraction, GC-MS and multivariate analysis. *Química Nova*, 35(1), 97–101. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100018>
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M., & Troisi, G. M. (2004). Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*, 69(3), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.009>
- Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). *Antibiotics in Aquaculture-Use, Abuse and Alternatives*. In E. Carvalho, G. David, & R. Silva (Eds.), *Health and Environment in Aquaculture* (IntechOpen).
- Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Gonc Ëalves, M. J., Proenc, A. and da Cunha, A. (2003). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, 69(1), 80–83. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37032>
- Senatore, F. and Rigano, D. (2001). Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour and Fragrance Journal*. J, 16(3), 169–171. <https://doi.org/10.1002/ffj.972>
- Standley, Paul., & Williams, Louis. (1970). Flora of Guatemala Part IX. In Standley, P. C., Williams, L. O. and Gibson, D. N. (Eds.), *Flora of Guatemala* (I, Vol. 24). Field Museum of Natural History.
- Terblanché, F. C. and Kornelius, G. (1996). Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae) A Literature Review. *Journal of Essential Oil Research*, 8(5), 471–485. <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700673>
- Tezara, W., Coronel, I., Herrera, A., Dzib, G., Canul-Puc, K., Calvo-Irabién, L. M. and González-Meler, M. (2014). Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in the Yucatán peninsula. *Industrial Crops and Products*, 57, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.012>

8. Artículo 4

Effect of *Lippia graveolens* on the diet of juvenile *Oreochromis niloticus*: Effects on growth, feed utilization, hematobiochemical parameters, histomorphometry of the intestine and liver, digestive enzymes, and bacterial challenge.

García-Pérez, J. 1,2*(<https://orcid.org/0000-0002-6899-8036>), Vissio, P. 3 (<https://orcid.org/0000-0002-0240-9534>, Pérez-Sirkin, D. 3 (<https://orcid.org/0000-0002-5854-7995>), Álvarez-González, CA 4 (<https://orcid.org/0000-0001-9240-0041>, Sepúlveda-Quiroz, CA 4 (<https://orcid.org/0000-0002-7787-5249>), Ulloa-Rojas, JB 5 (<https://orcid.org/0000-0003-4464-1136>)

¹*Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.*

²*Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.*

³ *Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires / Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), CONICETUBA, Buenos Aires, Argentina*

⁴ *Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México*

⁶*Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.*

***Corresponding author:**

Josué García-Pérez. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. Teléfono (+502) 30255071. Email: josuegarciap@profesor.usac.edu.gt

Abstract

Including essential oils of oregano in fish diets can promote fish growth and improve their overall health. The aim of this study was to evaluate the effects of adding dietary supplements of *Lippia graveolens* essential oil (oregano EO) on the growth, food consumption, hemochemical parameters, as well as the intestinal and liver morphology, digestive enzymes, and bacterial challenges of juvenile *Oreochromis niloticus*. The study involved testing four different diet levels of EO (0, 300, 600, and 1200 mg/kg). After 30 days of feeding, oregano treatment has a positive effect on the growth and feed utilization parameters of the treatments of 300 and 1200 mg/kg diet, showing a lower trend of feed consumption and higher growth performance and feed utilization. In addition, there was no evidence of adverse changes in liver and intestinal histology, indicating that *L. graveolens* does not have a negative effect at concentrations ranging from 300 to 1200 mg/kg. However, it was observed that all treatments tended to increase the liver enzymes activity. Moreover, it was found that the concentration of 1200 mg/kg had a positive impact on the increase of intestinal enzyme activity, particularly acid proteases, chymotrypsins, and lipases. In conclusion, all treated groups exhibited a reduction in mortality rates as compared to the control. As such, the study demonstrated that incorporating EO of *L. graveolens* in fish diets could enhance their overall health, promote growth performance, and improve their bacterial resistance.

Key words: essential oils, oregano, tilapia, aquaculture, *Aeromonas hydrophila*.

Introduction

Since 2000, aquaculture has been a rapidly expanding livestock activity in Guatemala. In fact, the sector has nearly doubled its annual production, reaching a figure of almost 22 MT, making Guatemala the second-largest Nile tilapia producer in Central America, according to the FAO (2022).

The growth in the aquaculture industry has resulted in an increase in aquaculture intensification, which has led to higher fish stocking densities (García-Pérez et al., 2021). Unfortunately, these practices can ultimately lead to a decline in animal performance and an increased susceptibility to bacterial-induced diseases. Consequently, in most tilapia aquaculture operations, antibiotics are employed in an indiscriminate manner against bacterial infections and yield secondary benefits, such as growth stimulation (Romero et al., 2012).

The long-term practice of using antibiotics in tilapia aquaculture has resulted in the development of antibiotic-resistant bacteria strains (Becerril et al., 2012). Consequently, controlling bacterial outbreaks has become challenging, as it requires extended treatment periods and the use of more potent drugs. Additionally, certain medications may not be permitted for use in aquaculture (Reverter et al., 2014).

As a result, various issues arise concerning the safety of animal food, such as the selection of the best medication to control aquaculture disease. Since the use of antibiotics has been banned in many countries worldwide since 2008 (Lulijwa et al., 2020), research has been conducted to find a viable alternative that could reduce their usage in aquaculture. One promising option is the use of phyto-genic additives in fish feed, which has demonstrated a positive impact on animal health and production (Dawood et al., 2022).

Oregano is widely recognized as one of the most used herbs in the aquaculture industry worldwide (Abdel-Latif et al., 2020; Özel et al., 2022a, 2022b; Zhang et al., 2020a). However, there are different genera and species of oregano that are distributed globally, including *Origanum onites* (known as 'Turkish oregano', 'Island oregano', or 'Cretan oregano'), *Oreganum vulgare* (known as 'European oregano' or 'Greek oregano'), *Coridohymus capitatu* (Spanish oregano), and *Lippia graveolens* (Mexican oregano) (Alarcon-Rojo et al., 2017; Leyva-López et al., 2017; Alagawany et al., 2020).

Recent studies have demonstrated that the bactericidal and bacteriostatic effects of oregano are attributed to its high concentrations of phenolic compounds, particularly thymol and carvacrol. These compounds have shown an antimicrobial effect against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, as highlighted by Leyva-López et al. (2017), Sutili et al. (2018), Alagawany et al. (2020, 2021a), and Bautista-Hernández et al. (2021).

As a result, the essential oil of oregano and its main components, thymol or carvacrol, have been extensively researched for use in animal nutrition due to their easy extraction and application. Research has shown that when included in animal feed (Alarcon-Rojo et al., 2017), they can act in various ways such as enhancing animal performance and acting as immunostimulants to prevent bacterial infections (Hayatgheib et al., 2020).

The aim of this study was to evaluate the impact of incorporating *Lippia graveolens* EO in the diet of juvenile *Oreochromis niloticus* on growth performance, feed utilization, hematobiochemical parameters, histomorphometry of the intestine and liver, digestive enzymes, and bacterial challenge.

Materials and Methods

Essential oil of *Lippia graveolens*

Lippia graveolens was obtained from wild suburbs in the Zacapa department (ZAC: 14 ° 59' 50.2"N / 89 ° 40' 26.2"W) during October 2019. The plant material was oven dried at 45 °C for 48 h, crushed to powder using an electric grinder of mesh size 1 - 3 mm, and finally stored in a sealed bag at room temperature until use.

Essential oil (EO) was extracted by steam distillation at the Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, with a semi-industrial pilot plant. The determination of the chemical compounds of essential oil was carried out by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) at Instituto de Pesquisas de Produtos Naturales Río de Janeiro University, Brazil.

Experimental fish and management

220 healthy tilapia fingerlings (*O. niloticus* GIFT strain: 1.5 + 0.2 g) were obtained from the local tilapia breeding center. The fish were transported in polythene bags (50 L) filled with industrial oxygen in a 70:30 ratio (oxygen: water). The fish once they arrived at the laboratory were acclimatized in a cylindrical plastic tank (500 L) supplied with continuous air. The water quality was maintained in the normal range for the specie: dissolved oxygen (> 5 ppm), pH (8.0 ± 0.1), water temperature (28.0 ± 0.5 °C), nitrate nitrogen (< 3 ppm), nitrite nitrogen (< 20 ppm), and ionized ammonium (< 1.5 ppm). The adaptation period lasted 30 days. During the acclimatization time, the fish were fed three times a day (8:00, 13:00 and 18:00) with a commercial diet (MicroTek: 0.8 mm, 45% protein and 12% of lipids, Silver Cup Tilapia, México) until apparent satiation. The sediment from the bottom of the tank was removed every week and dechlorinated freshwater was added to maintain the initial volume and quality.

Preparation of diets and experimental design

To evaluate the effect of oregano essential oil (*L. graveolens*), four isonitrogenous (45%) and isolipidic (12%) diets were made based on a commercial diet (MicroTek: 400 µm, 45% protein and 12% of lipids, Silver Cup Tilapia, México). One was the control diet without oregano EO, and three were supplemented with different levels of oregano EO (300, 600, and 1200 mg/kg of feed). Due to the small amount of oregano EO in each diet, fish oil was used as a vehicle (1%). The powder tilapia feed and the oregano EO were mixed in a food mixer for 5 min. Next, tap water was added until a stiff dough was formed. The dough for each diet was passed through a mincer with an 8 mm die, resulting in a small pellet; this process was repeated three times to homogenize the pellet. The diets were oven dried at 45 °C for 24 h, after which the dry pellets were broken into small particles of 0.8 – 1.5 mm. Each diet was stored at room temperature ($26.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$) and labeled in a plastic container until use.

After the acclimatization period, fish with an average body weight of 13.64 ± 0.06 g were randomly distributed in a recirculating aquaculture system composed of 12 aquarium tanks (70 L), three replicates per diet, with a stocking density of 15 fish/aquarium. The fish were hand-fed the experimental diets until the next day after stocking. Treatments were TCNT: control group (0 mg/kg), T300: diet with 300 mg/kg oregano EO, T600: diet with 600 mg/kg oregano EO, and T1200: diet with 1200 mg/kg oregano EO. The feeding trial lasted 30 days and the feed was administered as apparent satiation at 7:00, 12:00 and 17:00 h. The inclusion levels of oregano EO used in this study were according to the findings in the *in vitro* assay by García-Perez et al. (2022).

Fish wastes were siphoned daily and 20% of the aquarium's water volume was replaced by dechlorinated freshwater. The water quality parameters were maintained within the allowed range of dissolved oxygen (4.72 ± 0.50 mg/L), pH (8.10 ± 0.08), turbidity (2.51 ± 0.77 NTU), water temperature (28.01 ± 0.33 °C), salinity (0.30 ± 0.0 ppt), conductivity (585 ± 28.82 µS/cm), nitrite nitrogen (2.05 ± 0.75 ppm), nitrate nitrogen (7.75 ± 3.50 ppm) and ionized ammonium (1.06 ± 0.9 ppm).

At the beginning and end of the experiment, the bromatological analysis of feed and whole fish without viscera was carried out following the methods described by the Association of Official Analytical Chemists (Association of Official Analytical Chemists, 2006). Analyzes were carried out at Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

The experimental protocol for the use of laboratory animals was approved by the Postgraduate Bioethics Committee (Comité de Bioética de Postgrado) of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, under the reference number EEPVirtual.176.2021.

Experiment I: Growth performance and feed utilization

At the end of the feeding experiment, the fish weight and food consumed was determined. To evaluate the growth and feed utilization, the following parameters were calculated: weight gain (WG%), specific growth rate (SGR_{g/day}), condition factor (CF_{g/cm³}), hepatosomatic index (HIS%) and viscerosomatic index (VSI%), food conversion ratio (FCR), feed intake (FI_{g/fish}), feed efficiency ratio (FER_{g/g}), protein efficiency ratio (PER%), protein retention efficiency (NPU_α%), energy efficiency ratio (EER%), and energy retention efficiency (ERE%). Calculations were done according to (Gabriel et al., (2015) and Kim et al., (2016), using the formulas:

- Weight gain (WG_g) = average final body weight - average initial body weight
- Specific growth rate (SGR_{%/day}) = [(LN (average final body weight) – LN (average initial body weight)) / time] * 100
- Condition factor (CF_{g/cm³}) = [final body weight / (final body length)³] * 100
- Hepatosomatic index (HIS%) = (wet liver weight / final body weight) * 100
- Viscerosomatic index (VSI%) = (wet visceral weight / final body weight) * 100
- Feed intake (FI_{g/per fish}) = (dry feed intake / average of fish during experiment)
- Feed efficiency ratio (FER_{g/g}) = (weight gain / Feed intake)
- Feed conversion ratio (FCR) = (Feed intake / Weight gain)
- Protein retention efficiency (NPU_α%) = [(final total body protein - initial total body protein) / total protein intake] * 100
- Protein efficiency ratio (PER%) = (weight gain / total amount of protein intake per fish)
- Energy retention efficiency (ERE%) = [(final total body lipid - initial total body lipid) / total lipid intake] * 100
- Energy efficiency ratio (EER%) = (weight gain / total amount of lipid intake per fish)

- At the end, survival was calculated as: $(SV\%) = (\text{Number of fish at the end} / \text{initial number of fish}) * 100$

Experiment II: Hematology and Plasma Chemistry

After experiment I, three fish from each tank ($n = 9$ per treatment) were randomly bled. The animals were not anesthetized, and blood collection was taken from the caudal vasculature by using heparinized syringes. After use, the fish were sacrificed under the protocol of the Aquatic Animal Health Code of the World Organization for Animal Health. The blood was split for different analyzes. The first aliquot was transferred to heparinized capillaries and centrifuged at room temperature at $1,2000\ g$ for 5 min to further determine hematocrit ($Hct\%$) using the microhematocrit method. The second aliquot of blood was centrifuged at room temperature at $3,000\ x\ g$ for 10 min to separate the plasma, the samples were stored at $-20\ ^\circ\text{C}$. The third aliquot was used for blood smear, and the preparation was fixed with methanol and stained using Giemsa dye to evaluate the morphological and morphometric blood cell parameters. The descriptive data were obtained by observing the shape of the cell and its nucleus. For erythrocytes, a complete description and 30 cell measurements were performed manually using the ImageJ program (NIH, Bethesda, MD). The measured include the cell (LAm), long axis of the the cell ($LA_{\mu\text{m}}$), short axis of the cell ($SA_{\mu\text{m}}$), long nucleus axis ($N-LA_{\mu\text{m}}$), and the short nucleus axis ($N-SA_{\mu\text{m}}$) and the types of cells identified as a: Normal cell ($CN\%$) and abnormal cell ($CAN\%$), within the abnormal cell it was classified as follows: Immature cell ($IC\%$), ghost cell ($CTF\%$); Segmented cells ($CTS\%$); Poikilocyte-type cell ($CTP\%$). In the case of leukocytes, a total of 100 cells were counted and classified by cell type: Lymphocytes ($LF\%$), monocytes ($MO\%$), granulocytes ($GR\%$), and thrombocytes ($TR\%$).

Plasma samples were analyzed using the Optimized UV method using commercial kits from Wiener Lab and SpinReact. Total protein was measured (TPg / dL : SpinReact 1001290), glucose ($GE_{g/L}$: Wiener Lab Cat. No. 1400106), aspartate aminotransferase ($AST_{U/L}$: Wiener Lab Cat. No. 1751302), alanine aminotransferase ($ALT_{U/L}$: Wiener Lab Cat. No. 1761302) and creatinine ($CRE_{mg/L}$: Wiener Laboratory Cat. N° 1008149).

Experiment III: Histomorphometry of the intestinal and liver

After Experiment I, three fish from each tank (n = 9 per treatment) were randomly taken and sacrificed according to the protocol of Aquatic Animal Health Code. From each animal, the liver and anterior section of the intestine (± 1 in) were fixed in 10% formalin for 168 h and subsequently preserved in 70% ethanol.

The samples were dehydrated in series of ethanol (10, 30, 50, 70, and 99%). Then, they were clarified in xylol and embedded in paraffin blocks at $60 \pm 1^\circ\text{C}$. Subsequently, sections of 6 μm thickness were stained with Harris hematoxylin and eosin solution (H&E). After staining, the slides were mounted in Entellan resin and analyzed using Imagen J under a trinocular microscope (Boeco BM-180) with an AmScope camera (MU500). Fifteen microphotographs per animal were considered, totaling 135 per treatment for each tissue.

Intestine slide samples were microphotographed at 100 X magnification to measure the following variables: folds height ($\text{WIF}_{\mu\text{m}}$), folds length ($\text{LIF}_{\mu\text{m}}$), and number of goblet cells ($\text{GBN}_{\text{#/fold}}$). In the case of the liver, slide samples were microphotographed at 400 x magnification to measure the area of the hepatocyte ($\text{HPA}_{\mu\text{m}^2}$).

Experiment IV: Digestive enzyme

The entire stomach and the anterior intestine were collected after Experiment II (Hematology and plasma chemistry) and frozen during 45 days at -20°C , after which all samples were subsequently lyophilized. The lyophilized stomach and intestinal samples were individually macerated with 100 mM glycine-HCl pH 2 for the stomach samples and 50 mM Tris-HCl pH 7.5 for the intestinal samples. After maceration, all samples were centrifuged at 16,000 g at 4°C for 15 min. The supernatants were collected and stored at -80°C . The soluble protein was quantified using the Bradford (1976) technique. The quantification of acid protease activity in the stomach samples was according to the Anson (1938) method, the alkaline protease activity was according to Sarath, de La Motte & Wagner, (1989), trypsin activity was determined according to Erlanger, Kokowsky & Cohen (1961), chymotrypsin activity was determined according to Del Mar, Largman, Brodrick, & Geokas (1979), leucine aminopeptidase activity was determined according to the method of Maroux, Louvard, and Barath (1973) and finally the lipase activity was determined according with Versaw, Cuppett, Winters, & Williams (1989).

Enzyme activity was determined using the following equations: units by ml (U/mL) = $[\Delta\text{abs} \times \text{final reaction volume (mL)}] / [\epsilon \times \text{time (min)} \times \text{extract volume (mL)}] - 1$; specific activity (U/mg protein) = U mL/ mg of soluble protein.

Experiment V: Challenge with *Aeromonas hydrophila*

After the 30 days feeding experiment, 15 fish per treatment (n = 5 per replicate) were challenged by intraperitoneal injection 100 $\mu\text{L/g}$ body weight with 2.1×10^5 CFU (LD_{50} based on preliminary work) with pathogenic *A. hydrophila*. After infection, fish were observed twice per day until day 18th to register the mortality and macro-clinical signs of infection. Every day, dead and moribund fish were removed. The infection was confirmed by reisolation of the bacteria from the anterior kidney or, in case the fish was moribund, a blood sample was taken to confirm the pathogen. The bacteria were cultured in tryptic soy agar medium incubated at room temperature for 24 hours to visualize and characterize *A. hydrophila* colonies (Gram negative: bacilli form).

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean. For all variables, normality and homoscedasticity were tested using the Shapiro-Wilk and Levene test. For data showing normal distribution and homoscedasticity, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc analysis ($p < 0.05$) (R Core Team, 2020).

Results

Growth performance and feed utilization

There were no significant differences in the initial fish weight (W_0) ($p > 0.05$). In all treatments, since the first day of feeding, the fish readily accepted diets showing high appetite. At the end of the feeding experiment, significant differences in survival were only found when compared to the control ($p < 0.05$), the highest survival was observed with T600 (95.56%), followed by T1200, T300 (93.33 and 91.11%) and control group (82.22 %), respectively. Apparently, mortality was observed after the ninth day of trial and animals did not show macro sings of fish diseases. Growth performance and feed utilization variables are presented in Table 1.

After day 30 of feeding, oregano EO inclusion in diets had a positive influence on growth performance and feed utilization parameters, although only treatments T300 and T1200 were significantly better than control ($p < 0.05$).

Furthermore, it was observed that the treatment with the greatest similarity to the control group was T600, showing a positive correlation in most of the analyzed variables (Wf, GW, SGR, CF, FER, FCA, NPU α , PER, NEU and EER).

The HIS and FI did not show significant differences between treatments and control. Although similar FI was obtained in all treatments, feed use was different, showing a trend for lower FCA and higher NPU α , NEU, EER in treatments T300 and T1200 with significant differences ($p < 0.05$).

Table 1: Growth performance and feeding utilization in juvenile tilapia of the GIFT variety (*O. niloticus*) fed different of essential oil of inclusion levels of *L. graveolens* for 30 days.

Parameters	TCNT	T300	T600	T1200	<i>p</i>
SV%	82.22 \pm 2.22 b	91.11 \pm 2.22 a	95.56 \pm 2.22 a	93.33 \pm 3.85 a	0.037
Wo _g	13.67 \pm 0.01 a	13.68 \pm 0.01 a	13.67 \pm 0.00 a	13.68 \pm 0.00 a	0.223
Wf _g	45.53 \pm 1.84 c	53.12 \pm 1.97 ab	49.75 \pm 1.60 bc	55.22 \pm 1.83 a	0.001
GW _g	31.86 \pm 1.84 c	39.44 \pm 1.97 ab	36.08 \pm 1.60 bc	41.54 \pm 1.83 a	0.001
SGR _{%/day}	3.94 \pm 0.14 b	4.45 \pm 0.14 a	4.26 \pm 0.11 ab	4.60 \pm 0.11 a	0.002
CF _{g/cm³}	1.69 \pm 0.03 a	1.76 \pm 0.03 a	1.72 \pm 0.02 a	1.70 \pm 0.01 a	0.161
HSI%	2.91 \pm 0.13 a	2.7 \pm 0.08 a	2.98 \pm 0.13 a	2.70 \pm 0.14 a	0.256
VCI%	10.45 \pm 0.25 b	11.8 \pm 0.40 a	11.17 \pm 0.23 ab	11.55 \pm 0.20 a	0.005
FI _{g/fish}	36.82 \pm 1.76 a	37.21 \pm 0.87 a	36.51 \pm 0.73 a	35.11 \pm 1.25 a	0.653
FER _{g/g}	87.04 \pm 8.46 b	106.14 \pm 3.28 ab	98.81 \pm 4.66 b	118.25 \pm 5.76 a	0.031
FCA	1.17 \pm 0.11 a	0.94 \pm 0.03 b	1.02 \pm 0.05 ab	0.85 \pm 0.04 b	0.043
NPU α %	28.06 \pm 2.79 c	38.00 \pm 1.17 ab	33.51 \pm 1.61 bc	43.47 \pm 2.10 a	0.004
PER%	1.96 \pm 0.19 b	2.39 \pm 0.07 ab	2.22 \pm 0.10 b	2.66 \pm 0.13 a	0.031

NEU%	49.52 ± 4.30 b	63.91 ± 1.91 a	56.26 ± 2.26 ab	61.50 ± 2.60 a	0.034
EER%	6.98 ± 0.68 b	8.51 ± 0.26 ab	7.92 ± 0.37 b	9.48 ± 0.46 a	0.031

Note: Values are mean ± SEM of triplicate groups of fish, where each row with a different superscript was significantly different ($p < 0.05$).

Hematology and Plasma Chemistry

The effects of experimental diets on serum protein profile (TP and GE), liver enzymes (AST and ALT), and renal function (CRE) are presented in Table 2. Among the treatments, significant changes were observed ($p < 0.05$). There is a trend to increase for the value of AST, ALT, and GE compared to the control group. On for other hand, the parameters TP, CR and HCT tended to decrease compared to the control group.

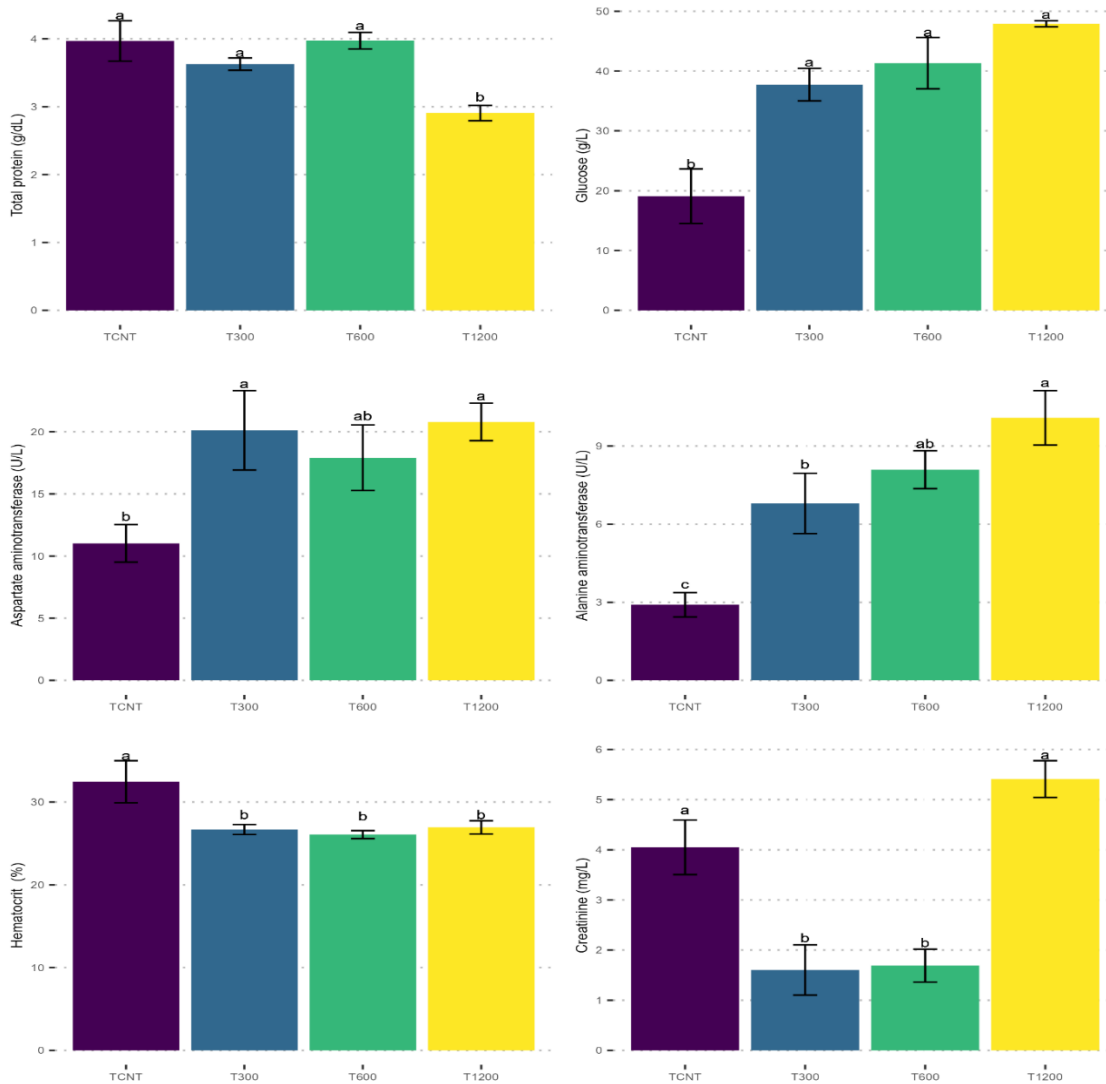


Figure 1: Biochemical parameters (mean \pm SEM) from juvenile tilapia of the GIFT strain (*O. niloticus*) fed different *L. graveolens* essential oil inclusion levels for 30 days. Treatments sharing different superscripts were significantly difference ($p < 0.05$).

For leukocyte cells no significant changes ($p > 0.05$) were observed for granulocytes and thrombocyte cells, but for lymphocytes and monocytes significant changes were observed between treatments, however the trend is no clear due to value fluctuations. T1200 showed the lowest percentage for monocytes (1.11 ± 1.96 %) and the highest percentage of lymphocytes (54.11 ± 12.96 %), in contrast the T600 showed a lower percentage for lymphocytes (43.22 ± 6.67 %) and a higher percentage for monocytes (3.67 ± 2.60 %) than T1200 treatment.

In terms of granulocytes and thrombocytes, there is no significant difference among the treatments, but a trend was observed for higher granulocytes and lower values of thrombocyte cells with the oregano EO treatment compared to the control group.

Meanwhile, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between treatments for CAN, CI and CN type cells, with CAN and CI showing the lowest and CN the highest percentage compared to the control group. For the rest of the cell types, such as CTF, CTS, CTP, no significant changes were determined ($p > 0.05$). But once again there is a trend for higher percentages with this type of cell compared to the control group.

Table 2: Hematological parameters of juvenile tilapia of the GIFT strain (*O. niloticus*) fed different inclusion levels of *L. graveolens* essential oil for 30 days.

Parameters	TCNT	T300	T600	T1200	<i>p</i>
LF%	50.44 ± 11.05 ab	52.56 ± 13.15 ab	43.22 ± 6.67 b	54.11 ± 12.96 a	0.05
MO%	2.11 ± 2.32 ab	2.67 ± 3.35 ab	3.67 ± 2.60 a	1.11 ± 1.96 b	0.02
GR%	9.67 ± 5.61 a	6.33 ± 2.29 a	7.00 ± 4.72 a	6.89 ± 5.04 a	0.43
TR%	37.78 ± 10.73 a	38.44 ± 11.59 a	46.11 ± 8.95 a	37.89 ± 13.29 a	0.43
CN%	48.89 ± 5.41 b	62.22 ± 7.45 ab	67.04 ± 3.07 a	62.96 ± 1.49 a	0.03
CAN%	51.11 ± 5.41 a	37.78 ± 7.45 ab	32.96 ± 3.07 b	37.04 ± 4.95 ab	0.03
CI%	20.00 ± 3.77 a	17.41 ± 4.07 ab	9.26 ± 2.41 b	15.19 ± 3.43 ab	0.04
CTF%	3.33 ± 0.96 a	4.07 ± 1.45 a	3.33 ± 1.24 a	2.22 ± 0.96 a	0.74
CTS%	15.56 ± 2.15 a	11.11 ± 2.83 a	12.22 ± 2.78 a	11.48 ± 2.67 a	0.62
CTP%	12.22 ± 2.66 a	5.19 ± 2.16 a	8.15 ± 2.16 a	8.15 ± 3.05 a	0.29

Note: Values are mean ± SEM of triplicate groups of fish, where each row with a different superscript was significantly different ($p < 0.05$).

According to erythrocyte morphometry, the long axis of the cell showed a significant difference ($p < 0.05$) among the treatments with oregano EO but not with the control group; being the lower size found with treatment T600. The other measurements such as SA, N_LA, and N_SA showed no significant different ($p > 0.05$).

Table 3: Morphological erythrocytes analysis of juvenile tilapia of the GIFT variety (*O. niloticus*) fed different inclusion levels of essential oil from *L. graveolens* for 30 days.

Parameters	TCNT	T300	T600	T1200	<i>p</i>
¹ LA _{μm}	1.08 ± 0.01 ab	1.09 ± 0.01 ab	1.04 ± 0.02 b	1.10 ± 0.02 a	0.05
² SA _{μm}	0.68 ± 0.01 a	0.70 ± 0.01 a	0.68 ± 0.01 a	0.67 ± 0.01 a	0.39
³ N_LA _{μm}	0.45 ± 0.01 a	0.46 ± 0.00 a	0.45 ± 0.01 a	0.45 ± 0.01 a	0.50
⁴ N_SA _{μm}	0.29 ± 0.01 a	0.31 ± 0.01 a	0.30 ± 0.01 a	0.30 ± 0.01 a	0.35

Note: Values are mean ± SEM of triplicate groups of fish, where each row with a different superscript was significantly different ($p < 0.05$).

Histomorphometry of the intestinal and liver

The effects of experimental diets on the histomorphometry of the intestine and liver are presented in Table 4. Treatment T600 presented a higher hepatocyte area of hepatocytes ($p < 0.05$) among other treatments. For the intestinal fold height and number of Goblet cells, T300 showed a higher value but no significantly different from the control group. The width of intestinal folds and the number of goblet cells did not show significant changes ($p > 0.05$) between treatments.

Table 4: Morphological analysis (mean \pm SEM) of the liver and intestine of juvenile tilapia of the GIFT variety (*O. niloticus*) fed different levels of essential oil from *L. graveolens* for 30 days.

Parameters	TCNT	T300	T600	T1200	<i>p</i>
LIF _{μm}	3.25 \pm 0.24 ab	3.70 \pm 0.13 a	3.41 \pm 0.16 ab	3.20 \pm 0.15 b	0.05
WIF _{μm}	0.46 \pm 0.01 a	0.46 \pm 0.01 a	0.45 \pm 0.01 a	0.49 \pm 0.02 a	0.28
GBN _{#/fold}	9.74 \pm 1.44 a	12.06 \pm 1.48 a	11.29 \pm 0.56 a	9.22 \pm 1.00 a	0.31
HPA _{μm²}	0.23 \pm 0.01 b	0.25 \pm 0.01 b	0.29 \pm 0.02 a	0.24 \pm 0.01 b	0.02

Note: Values are mean \pm SEM of triplicate groups of fish, where each row with a different superscript was significantly different ($p < 0.05$).

Digestive enzyme activities

The effects of experimental diets on the activities of digestive enzymes are presented in Figure 2. Among the treatments significant changes ($p < 0.05$) were observed. In general, fish fed 1,200 mg/kg of oregano EO showed the highest activity of acid proteases, chymotrypsin and lipase. Fish fed 600 mg/kg showed only higher activity for alkaline protease and chymotrypsin, and finally, the concentration of 300 mg / kg oregano EO did not improve any digestive enzyme activity.

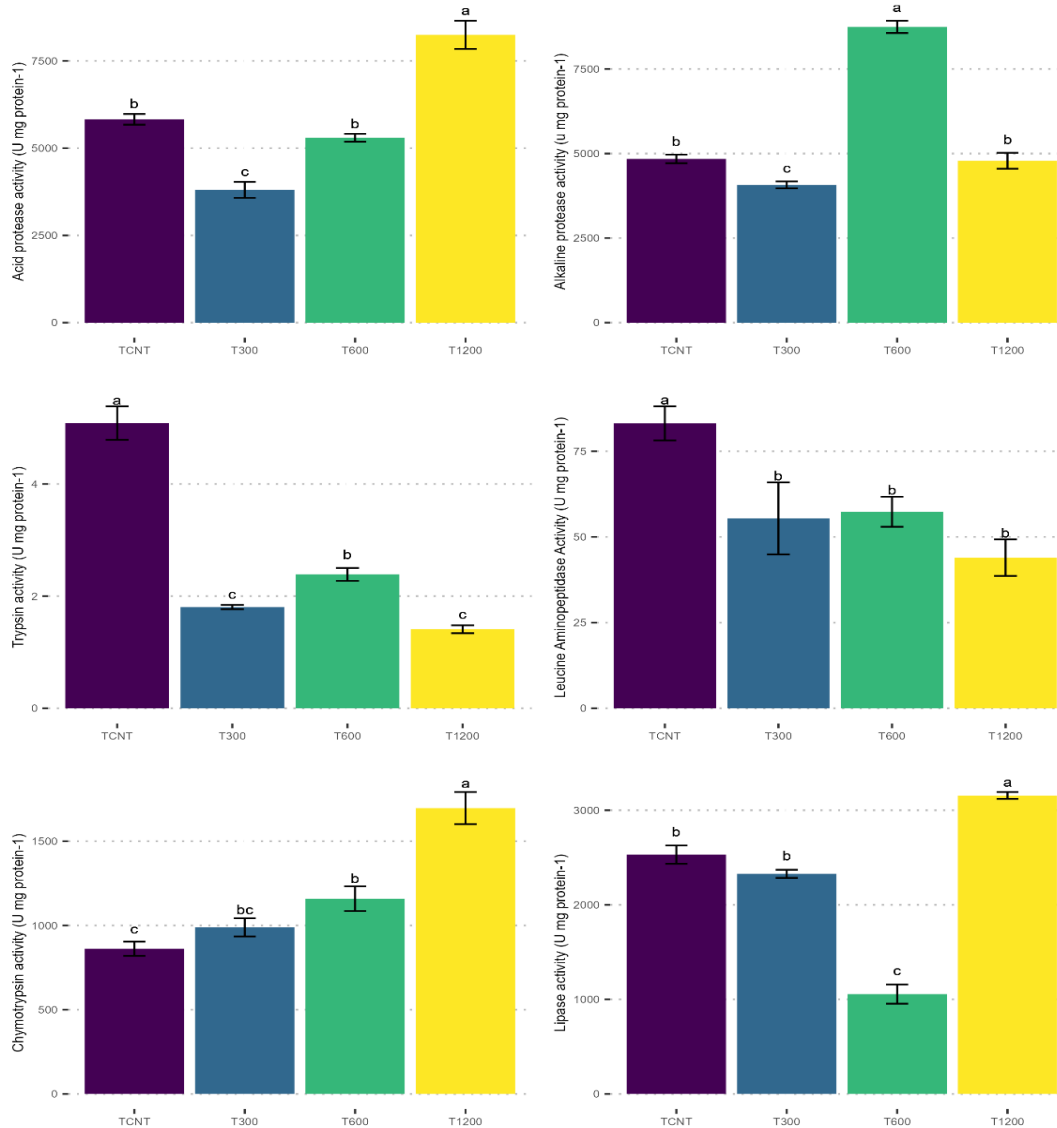


Figure 2: The activity of digestive enzymes (U mg protein⁻¹) (mean \pm SEM) of juvenile tilapia of the GIFT strain (*O. niloticus*) fed different levels of essential of *L. graveolens* essential oil for 30 days. Treatments having different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Challenge with *Aeromonas hydrophila*

All treated groups showed higher survival compared to the control ($p < 0.05$), fish that received diets containing different concentrations of oregano EO exhibited increased resistance to *A. hydrophila*, with 93.3%, 86.67% and 73.3% fish survival for the groups received 600, 300, and 1200 mg / kg of oregano EO in the diet, respectively (Figure 3).

After the fifth day of experimental challenge, in the control and T1200, most of the fish reduced their feeding rate; only with T600 and T300 the fish continue feeding normally. After day 8th, the control fish and those fed 1200 mg/kg oregano EO showed clinical signs of *A. hydrophila* infection, such as external bleeding, scale loss, skin ulcers, and broken caudal fin, and the fish started to die.

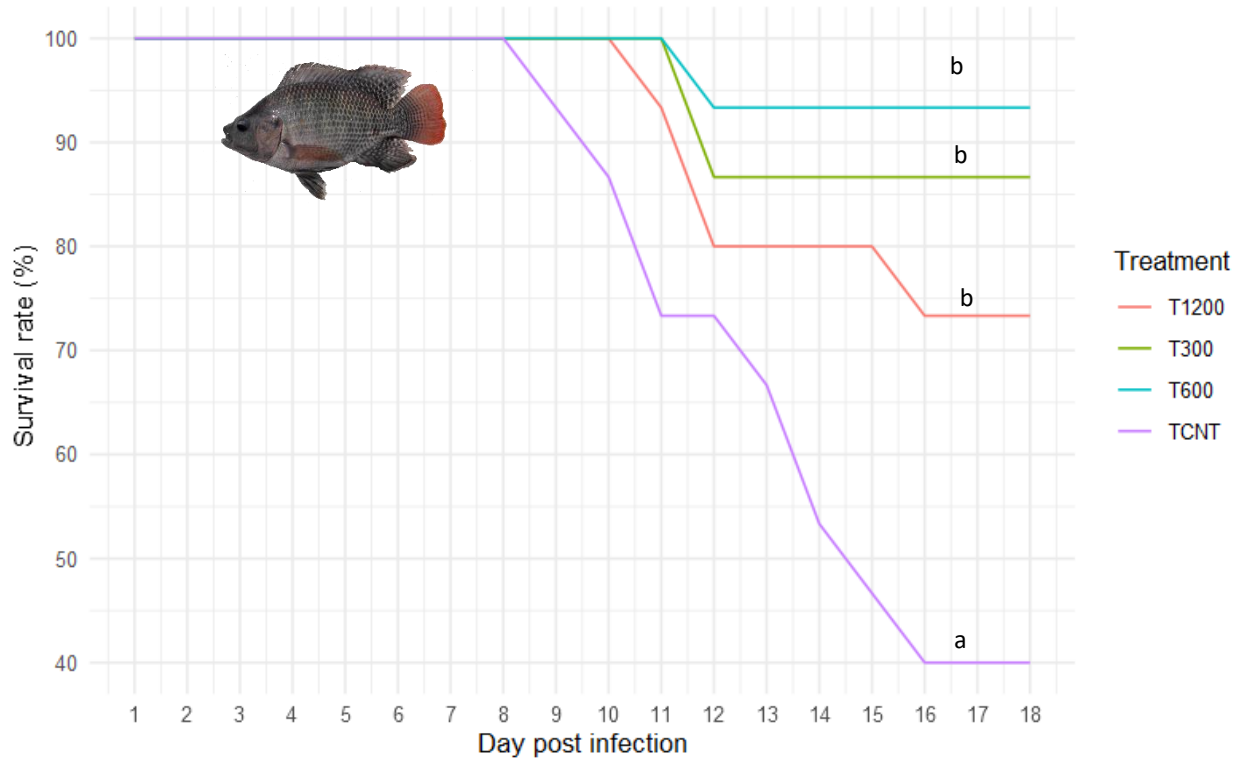


Figure 3. Survival rate obtained in different groups of juvenile tilapia of the GIFT strain (*O. niloticus*) fed with different essential oil inclusion levels of *L. graveolens* after challenge with *A. hydrophila*. Treatments having different letter were significantly different ($p < 0.05$).

Discussion

Worldwide, the use of oregano as an additive in tilapia feed has been reported to increase different aspects of aquaculture production such as promoter of growth, immunological response and disease resistance (Abdel-Latif et al., 2020; Alagawany et al., 2020; Alarcon-Rojo et al., 2017; Leyva-López et al., 2017). This effect is attributed to secondary metabolites such as thymol and carvacrol. However, there is a wider variety of compounds in oregano essential oils at lower concentrations (Teixeira et al., 2013) that could also help fish performance.

In the present study, terpenoids constituted the main class with thymol (73.03%) as the main component of the essential oil of *L. graveolens*. In general, *L. graveolens* exhibits strong antibacterial properties (García-Pérez et al., 2022), but there is little evidence of its use in fish as a growth or health promoter (García-Pérez et al., 2019). Since there are few metabolites in *L. graveolens*, probably the action of thymol may have contributed to the results founded in this study, such as improved survival, growth (GW, SGR) and feed utilization (NPU α , PER, NEU and EER), as described by other authors for the same and other species (Heluy et al., 2020; Morselli, Reis, et al., 2020; Zhang et al., 2020a; Zheng et al., 2009). Our findings show that the best growth performance was found at concentrations of 1200 mg/kg, followed by 300 mg/kg and 600 mg/kg; it is inferred that the action pathway of *L. graveolens* EO is by activating some genes and enzymes to improve the digestion process as described by Ahmadifar et al., (2011).

Although there is not a clear effect related to the inclusion levels of *L. graveolens* EO, since the treatment with 600 mg/kg EO gave similar result than control group but a smaller and higher concentration of EO treatments had better performance than control group. This unclear effect was also observed by Aanyu et al. (2018), who found that dietary thymol up to 250 ppm did not enhance somatic growth and feed utilization. These differences between studies could be attributed to water temperature (26 – 28°C) and the fish stocking density used, because performance of *O. niloticus* may change at different temperatures and stocking densities; as stated by Margaret et al., (2021) and Shourbela et al., (2021a), who found a lower growth rate at low temperature (<28°C) and higher density (> 3 kg/m³). Furthermore, it could be related to some degree of stress in fish in the system, since stress in aquatic animals can therefore lead to a high consumption of energy reserves, and this reallocation of metabolic energy negatively interferes with other physiological processes such as growth (Barton & Zwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

Meanwhile, in the present study, FI did not increase with the *L. graveolens* EO diets, suggesting that the improved growth of *O. niloticus* found with diets supplemented with 300 and 1200 mg/kg was not due to improved appetite (feed intake). Therefore, enhanced somatic growth probably occurred through an efficient utilization of nutrients or nutrient transport and absorption, and better lipid and energy metabolism in diets with *L. graveolens* EO due to the higher NPU α , PER, NEU and EER.

It is important to note that these results could be related to fish size, since smaller animals have more active growth (Loum et al., 2013), having more efficient somatic growth than older animals. In addition, the dietary protein level used during the whole experiment could induce a higher feed utilization; due to the high protein and lipid levels in the diet, less feed is eaten to maintain a balance between energy for growth and metabolism as described by Miller (2004). Therefore, *L. graveolens* EO may act as a growth promoter, as described by different authors using different phytochemicals in diets, including thymol (Aanyu et al., 2020; R. C. de Souza et al., 2020; Magouz et al., 2021; Morselli, Baldissera, et al., 2020; Morselli, Reis, et al., 2020). Although it should also be highlighted, the results of phytochemical diets are closely related to the environmental and biological characteristics of the fish species they will affect (Núñez-Torres et al., 2022). Therefore, to obtain positive results, the use of *L. graveolens* in a variety of aquatic species must be validated and evaluated under culture conditions.

Hematological and biochemical variables can be used to evaluate general health, among other parameters such as metabolic status and tolerance to disease. In the present study, ALT and AST enzyme levels were altered compared to the control group. Although during the experiment, the high amount of these enzymes was evident, these amounts were lower than those reported by other authors using thymol or other essential oils in tilapia and other aquaculture species (Alagawany et al., 2021; R. C. de Souza et al., 2020; Hoseini & Yousefi, 2019; Zargar et al., 2019). Therefore, the inclusion of *L. graveolens* EO in juvenile tilapia for 30 days seems to be a safe additive under the present conditions. The activity of liver enzymes is typically increased in response to exposure to drugs and toxic agents (Tennant & Center, 2008), which means according to our results, the thymol metabolite could not have any negative effect on the liver, which is a fundamental organ in the metabolism of nutrients (Caballero et al., 2004). Furthermore, there was no evidence of negative effects on liver hepatocyte histology, which confirmed that *L. graveolens* does not affect negatively at concentrations between 300 and 1200 mg/kg.

The increase in ALT and AST in the liver may indicate a higher use of dietary amino acids for growth, as well as a substrate for gluconeogenesis, particularly for the activities of AST and ALT (Bibiano-Melo et al., 2006).

Protein and glucose are the biochemical parameters commonly used to assess the metabolic state of fish. In the present study, the lower value of glucose and the high value of total protein in the TCNT probably respond to the stress process caused by the stocking density, indicating unfavorable conditions that could later compromise the health status of the fish, since the high stocking density causes competition for energy resources (Aketch et al., 2014). Therefore, stress requires huge energy reserves at the expense of other vital physiological functions, such as growth and health status. The results of this study indicate that glucose and total protein concentrations fluctuate in all treatments without causing hypoglycemia or hyperproteinemia in juvenile Nile tilapia, since the values were within the reference range for the species (Hrubec et al., 2000). Furthermore, the high creatinine content of this study is a result of the increment of nitrogen waste from protein metabolism in all treatments, especially control and 1200 mg/kg treatments, assuming that the kidney could have problems removing nitrogen waste because with this treatment the normal value for tilapia were exceeded (Hrubec et al., 2000), which was probably related to a high protein content in the feed.

According to the blood cell counting observed, LF increase in all treatments compared with the control, inferring that the immunological system is active because fish in high-density production systems are constantly exposed to high bacterial loads in the water and to lower water quality, factors which may influence lymphocytes ratio (Hrubec et al., 2000). Furthermore, in our study, the percentage of abnormal cells is lower than in control group, indicating that erythropoiesis in the control group was deficient. The increase in immature erythrocytes and other abnormal erythrocytes can explain the higher value of Hct in the control group, fact that may induce a deficient oxygen transport by red blood cells throughout the body as mentioned by Vo et al. (2023).

Feed digestibility depends upon various factors including the addition of dietary plant materials; therefore, phytoadditives such as essential oils can stimulate digestion by increasing the production and secretion of intestinal enzymes or improving some internal digestive structures such as intestinal fold height and length, number of goblet cells per folds and the area of the hepatocytes (Vallado et al., 2017; Dawood et al., 2021).

Despite of in our study there was no clear effects of EO on the intestinal histomorphometry, in all treatments with *L. graveolens* EO there was an increase in hepatocyte area. The appearance of these unclear effects may be attributed to the short experimental period (30 days) since at least 60 days of feeding with EO are recommended to produce changes in the liver.

On the other hand, dietary concentration of 1200 mg/kg EO had a positive effect by increasing intestinal enzymes, especially acid proteases, chymotrypsin, and lipase activity, which can result in better absorption and utilization of nutrients (amino acids and fatty acids).

The same results were observed with the use of *Ocimum basilicum*, *Zingiber officinale*, *Thymus vulgaris*, *Aloe barbadensis* and *Origanum vulgare* (Dotta et al., 2018; E. M. de Souza et al., 2019; Valladão et al., 2019; Zhang et al., 2020b; Chung et al., 2021).

This leads the promotion of the acid proteases, chymotrypsins, and lipases activity to ensure that the digestive system could efficiently decompose and absorb nutrients from feed. In other words, most proteins are used for growth and lipids are used for all internal processes as energy.

In addition, all treatments that incorporate *L. graveolens* EO in the diet had lower mortality rates than control after the *A. hydrophila* challenge. Although in the present study, blood cell parameters, liver and intestinal morphometry had no clear benefit, may be inferred that in all diets that incorporate *L. graveolens* EO other immunological parameters, such as total immunoglobulin, phagocytic activity, cytokine expression, and cellular immune response may induce the improved survival rate after bacteria challenge.

The present study showed that incorporation of *L. graveolens* EO could improve fish's health and immune system and increase bacterial resistance, as reported with other phytochemicals (Brum et al., 2017; de Oliveira et al., 2020; de Souza et al., 2019a; Mohammadi et al., 2020). The suggesting way the EO's act is by improving the digestibility of fish foods, resulting in better absorption and utilization of nutrients, and thus more resilient fish (Dawood et al., 2022).

Conclusion

It can be concluded that the inclusion of 300 and 1200 mg/kg essential oils of *Lippia graveolens* could be a better alternative to improve the growth performance and bacterial resistance of *O. niloticus* than antibiotics. The experiments contained only preliminary analyses on growth, feed utilization, hemo-biochemical parameters, gastrointestinal and liver morphometry, digestive enzymes, and bacterial problems, but the specific mechanisms are unclear. Therefore, more studies are needed.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Conceptualization of the work, author 1; development of the methodology, all authors; software management, author 1, 2, 3, 4; experimental validation, author 1; analysis of results, author 1, author 5.; Data management, author 1; writing and preparation of the manuscript, author 1, author 5; writing, proofreading and editing, all authors.

References

- Aanyu, M., Betancor, M. B., & Monroig, O. (2018). Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 488, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.036>
- Aanyu, M., Betancor, M. B., & Monroig, Ó. (2020). The effects of combined phytochemicals on growth and nutritional physiology of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 519. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734867>
- Abdel-Latif, H. M. R., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A. F., & Dawood, M. A. O. (2020). Dietary oregano essential oil improved the growth performance via enhancing the intestinal morphometry and hepato-renal functions of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735432>
- Ahmadifar, E., Falahatkar, B., & Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1057–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01763.x>
- Aketch, B. O., Ang'ienda, P. O., Radull, J. O., & Waindi, E. N. (2014). Effect of stocking density on the expression of glucose transporter protein 1 and other physiological factors in the Lake Victoria Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *International Aquatic Research*, 6(2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0069-3>
- Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., & Elnesr, S. S. (2021a). A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 632–641. <https://doi.org/10.1111/raq.12490>

- Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., & Elnesr, S. S. (2021b). A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 632–641. <https://doi.org/10.1111/raq.12490>
- Alagawany, M., Farag, M. R., Salah, A. S., & Mahmoud, M. A. (2020). The role of oregano herb and its derivatives as immunomodulators in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2481–2492. <https://doi.org/10.1111/raq.12453>
- Alarcon-Rojo, A. D., Janacua-Vidales, H., & Renteria-Monterrubio, A. (2017). *Oregano Essential Oil in Animal Production*. In Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants. InTech. <https://doi.org/10.5772/66703>
- Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Official methods of analysis of AOAC International*.
- Barton, B. A., & Zwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3–26.
- Bautista-Hernández, I., Aguilar, C. N., Martínez-Ávila, G. C. G., Torres-León, C., Iliina, A., Flores-Gallegos, A. C., Kumar Verma, D., & Chávez-González, M. L. (2021). Mexican oregano (*Lippia graveolens* kunth) as source of bioactive compounds: A review. *Molecules*, 26(17), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules26175156>
- Becerril, R., Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(8), 699–705. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1097>
- Bibiano-Melo, J. F., Lundstedt, L. M., Metón, I., Baanante, I. V., & Moraes, G. (2006). Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145(2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.007>
- Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>

- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. (2004). Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, *27*, 531–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00572.x>
- Chung, S., Ribeiro, K., Melo, J. F. B., Teixeira, D. V., Vidal, L. V. O., & Copatti, C. E. (2021). Essential oil from ginger influences the growth, haematological and biochemical variables and histomorphometry of intestine and liver of Nile tilapia juveniles. *Aquaculture*, *534*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736325>
- Dawood, M. A. O., El Basuini, M. F., Yilmaz, S., Abdel-Latif, H. M. R., Alagawany, M., Kari, Z. A., Razab, M. K. A. A., Hamid, N. K. A., Moonmanee, T., & Doan, H. Van. (2022a). Exploring the Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. *Animals*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/ani12070823>
- Dawood, M. A. O., Noreldin, A. E., Ali, M. A. M., & Sewilam, H. (2021). Menthol essential oil is a practical choice for intensifying the production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on the growth and health performances. *Aquaculture*, *543*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737027>
- de Oliveira, S. T. L., Soares, R. A. N., de Negreiros Sousa, S. M., Fernandes, A. W. C., Gouveia, G. V., & da Costa, M. M. (2020). Natural products as functional food ingredients for Nile tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture International*, *28*(3), 913–926. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00503-1>
- de Souza, E. M., de Souza, R. C., Melo, J. F. B., da Costa, M. M., de Souza, A. M., & Copatti, C. E. (2019). Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture*, *504*, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.052>
- de Souza, R. C., Baldisserotto, B., Melo, J. F. B., da Costa, M. M., de Souza, E. M., & Copatti, C. E. (2020). Dietary *Aloysia triphylla* essential oil on growth performance and biochemical and haematological variables in Nile tilapia. *Aquaculture*, *519*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734913>

- de Souza, R. C., de Souza, E. M., da Costa, M. M., Melo, J. F. B., Baldisserotto, B., & Copatti, C. E. (2019). Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/anu.12827>
- Dotta, G., de Andrade, J. I. A., Garcia, P., Alves Jesus, G. F., Mouriño, J. L. P., Mattos, J. J., Dias Bairy, A. C., & Martins, M. L. (2018). Antioxidant enzymes, hematology and histology of spleen in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 79, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.024>
- FAO. (2022). *Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series*. (version v4.02.08).
- Gabriel, N. N., Qiang, J., He, J., Ma, X. Y., Kpundeh, M. D., & Xu, P. (2015). Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2), 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.002>
- García-Pérez, J., Marroquín-Mora, D., & Pérez-González, M. (2019). Inclusión de extracto de *Lippia graveolens* (Kunth) en la alimentación de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) para la prevención de estreptococosis por *Streptococcus agalactiae* (Lehmann y Neumann, 1896). *Revista AquaTIC*, 54(1), 15–24. <https://www.researchgate.net/publication/346679022>
- García-Pérez, J., Pérez-Sabino, J. F., Mendoza-Elvira, S., Ribeiro da Silva, A., & Ulloa-Rojas, J. B. (2022). In vitro assay of *Lippia graveolens* and *Lippia alba* extracts against *Aeromonas* spp isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 17(1), 28–46. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.6452>
- García-Pérez, J., Ulloa-Rojas, J. B., & Mendoza-Elvira, S. (2021). Bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala. *Uniciencia*, 35(2). <https://doi.org/10.15359/RU.35-2.4>
- Hayatgheib, N., Moreau, E., Calvez, S., Lepelletier, D., & Pouliquen, H. (2020). A review of functional feeds and the control of *Aeromonas* infections in freshwater fish. *Aquaculture International*, 28(3), 1083–1123. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00514-3>

- Heluy, G. M., Ramos, L. R. V., Pedrosa, V. F., Sarturi, C., Figueiredo, P. G. P., Vidal, L. G. P., França, I. de F., & Pereira, M. M. (2020). Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil as an additive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings reared in salinized water. *Aquaculture Research*, *51*(8), 3237–3243. <https://doi.org/10.1111/are.14658>
- Hoseini, S. M., & Yousefi, M. (2019). Beneficial effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on oxytetracycline-induced stress response, immunosuppression, oxidative stress and enzymatic changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, *25*(2), 298–309. <https://doi.org/10.1111/anu.12853>
- Hrubec, T. C., Cardinale, J. L., & Smith, S. A. (2000). Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis* Hybrid). *Veterinary Clinical Pathology*, *29*(1), 7 – 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x>
- Kim, K. W., Moniruzzaman, M., Kim, K. D., Han, H. S., Yun, H., Lee, S., & Bai, S. C. (2016). Effects of dietary protein levels on growth performance and body composition of juvenile parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. *International Aquatic Research*, *8*(3), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0139-9>
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, *22*(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- Loum, A., Sagne, M., Fall, J., Ndong, D., Diouf, M., Sarr, A., & Thiaw, O. T. (2013). Effects of Dietary Protein Level on Growth Performance, Carcass Composition and Survival Rate of Fry Monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Reared under Re-circulating System. *Journal of Biology and Life Science*, *4*(2). <https://doi.org/10.5296/jbls.v4i2.3043>
- Lulijwa, R., Rupia, E. J., & Alfaro, A. C. (2020). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, *12*(2), 640–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>
- Magouz, F. I., Mahmoud, S. A., El-Morsy, R. A. A., Paray, B. A., Soliman, A. A., Zaineldin, A. I., & Dawood, M. A. O. (2021). Dietary menthol essential oil enhanced the growth performance, digestive enzyme activity, immune-related genes, and resistance against acute ammonia exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, *530*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735944>

- Margaret, A., Euglance, G. M., & Racheal, N. (2021). Diets supplemented with limonene and thymol modify intestinal histomorphology of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Scientific African*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00750>
- Miller, E. L. (2004). *Protein nutrition requirements of farmed livestock and dietary supply*. In Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.), Protein sources for the animal feed industry. (pp. 1–37). FAO. <https://www.fao.org/3/y5019e/y5019e00.htm#Contents>
- Mohammadi, G., Rafiee, G., El Basuini, M. F., Abdel-Latif, H. M. R., & Dawood, M. A. O. (2020). The growth performance, antioxidant capacity, immunological responses, and the resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed Pistacia vera hulls derived polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 106, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.064>
- Morselli, M. B., Baldissera, M. D., Souza, C. F., Reis, J. H., Baldisserotto, B., Sousa, A. A., Zimmer, F., Lopes, D. L. A., Petrolli, T. G., & Da Silva, A. S. (2020). Effects of thymol supplementation on performance, mortality and branchial energetic metabolism in grass carp experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103915>
- Morselli, M. B., Reis, J. H., Baldissera, M. D., Souza, C. F., Baldisserotto, B., Petrolli, T. G., Paiano, D., Lopes, D. L. A., & da Silva, A. S. (2020). Benefits of thymol supplementation on performance, the hepatic antioxidant system, and energetic metabolism in grass carp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(1), 305–314. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00718-2>
- Núñez-Torres, O. Patricio, Paredes-Sandoval, J. C., Artieda-Rojas, J. Rodrigo, & Muñoz-Espinoza, M. Sebastián. (2022). Use of crude extract of garlic (*Allium sativum*) as an alternative in the prevention of saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 9(1), 3–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2022.090100003>
- Özel, O. T., Çakmak, E., Gürkan, S. E., Coskun, İ., & Türe, M. (2022a). Evaluation of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil supplementation on growth performance, digestive enzymes, intestinal histomorphology and gut microbiota of Black Sea salmon, *Salmo labrax*. *Annals of Animal Science*, 22(2), 763–772. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0068>

- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. (4.2.1). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>
- Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). *Antibiotics in Aquaculture-Use, Abuse and Alternatives*. In E. Carvalho, G. David, & R. Silva (Eds.), *Health and Environment in Aquaculture* (IntechOpen, Vol. 1, pp. 1–414). Intech. www.intechopen.com
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., & Dawood, M. A. O. (2021). Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture*, 542. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>
- Sutili, F. J., Gatlin, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 716–726. <https://doi.org/10.1111/raq.12197>
- Tennant, B. C., & Center, S. A. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th Edition Hepatic Function Chapter 13.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Kotzent, S., Assane, I. M., & Pilarski, F. (2019). Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquaculture International*, 27(2), 399–411. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0332-5>
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pala, G., Jesus, R. B., Kotzent, S., Costa, J. C., Silva, T. F. A., & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 48(11), 5640–5649. <https://doi.org/10.1111/are.13386>
- Vo, V.-T., Tran, T.-H., Nguyen, T.-T.-T., Truong, V.-T., Pham, C.-T., Pham, T.-M., & Thuong, H. N. T. (2023). Hematological Parameters of Red Tilapia (*Oreochromis* sp.) Fed Essential Oils of *Mentha piperita* after Challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Pakistan Journal of Zoology*, 55(3). <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20211106031127>

- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). *The Stress Response in Fish*. In REVIEWS (Vol. 77, Issue 3).
www.physiology.org/journal/physrev
- Zargar, A., Rahimi-Afzal, Z., Soltani, E., Taheri Mirghaed, A., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., Soltani, M., & Yuosefi, P. (2019). Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed *Thymus vulgaris* essential oils. *Aquaculture Research*, 50(11), 3097–3106. <https://doi.org/10.1111/are.14243>
- Zhang, R., Wang, X. W., Liu, L. L., Cao, Y. C., & Zhu, H. (2020). Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 518. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734781>
- Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3–4), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>

7. Discusión global

En Guatemala, el cultivo de tilapia es la segunda actividad acuícola de mayor importancia debido a su rápido crecimiento, facilidad de manejo, valor comercial medio y su capacidad para adaptarse a diversos sistemas ambientales y de cultivo (FAO, 2022; Arumugam et al., 2023). Actualmente, se estima que Guatemala produce alrededor de 16,000 TM, con una tasa de crecimiento anual cercana al 12.74% desde 2017 (López-Paredes et al., 2020; FAO, 2022). Aunque la acuicultura de tilapia en Guatemala continúa evolucionando rápidamente, también enfrenta desafíos para su sostenibilidad. Los principales problemas de la industria son el manejo inadecuado de la densidad de siembra, el manejo deficiente de los sistemas de cultivo, manipulación inadecuada de los peces, las fluctuaciones en los factores ambientales, mala calidad del agua, la mala nutrición y la falta de alimentos balanceados en la industria, así como la ausencia de políticas en la administración acuícola (García-Pérez et al., 2021). Estos factores han contribuido directamente al deterioro del estado de salud de los organismos, lo que resulta en la inmunosupresión del sistema inmunológico y un aumento en la frecuencia de patógenos bacterianos en los cultivos de tilapia en Guatemala.

Según el estudio realizado en Guatemala, se evidenció que las bacterias patógenas más frecuentes en los sistemas acuícolas son: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Shewanella* y *Streptococcus*. Aunque no se encontraron bacterias de los géneros *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Francisella* y *Lactococcus*, no se descarta la posibilidad de que estén presentes en Guatemala (García-Pérez et al., 2021). La no detección de esas bacterias podría estar relacionada con factores como: la temporalidad, el sistema de cultivo muestreado, la calidad del agua, el tipo de fondo de los estanques, el manejo general, bajo número de fincas examinadas, así como la omisión del reporte de enfermedades por parte de los acuicultores (Parrado et al., 2014). Los géneros de bacterias encontrados en los sistemas de cultivo de tilapia se consideran limitantes para la salud acuícola y contribuyen a las pérdidas económicas en la acuicultura (Shuxia & Levin, 2010; Figueiredo et al., 2012; Zhigang et al., 2015; Sierralta-Chichizola, Mayta-Huatuco & León-Quispe, 2016; Dong et al., 2017), esto debido a que son en su mayoría bacterias oportunistas e inmunosupresoras, las cuales afectan rápidamente el estado de salud de los organismos acuáticos, y provocando altas mortalidades en los sistemas de cultivo.

En la práctica tradicional, se observó que el tratamiento comúnmente utilizado para combatir las bacterias en los cultivos de tilapia son antibióticos de amplio espectro. Sin embargo, no existen protocolos estandarizados para su uso responsable, lo cual ha provocado el uso inadecuado de diversos medicamentos. Como consecuencia, el presente estudio documentó resistencia a diversos antibióticos de uso común, como la oxitetraciclina y la fosfomicina, en los géneros de bacterias encontrados. Estos hallazgos sugieren que la resistencia del género *Aeromonas* spp., a la oxitetraciclina es resultado del uso excesivo de este antibiótico para el manejo y control de enfermedades bacterianas.

Dado que en Guatemala solo se permite el uso de oxitetraciclina en la producción de tilapia, la falta de opciones limita el tratamiento de enfermedades bacterianas, lo que resulta en un abuso de estos medicamentos. Los productores de tilapia suelen utilizar cantidades cada vez mayores, para tratar organismos enfermos y, en ocasiones, recurren a medicamentos no destinados específicamente para la acuicultura.

Cabe resaltar en la acuicultura guatemalteca, el género bacteriano más frecuentemente encontrado es *Aeromonas* spp. Esta bacteria presenta una notable característica, ya que posee genes de resistencia móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones (Jacobs & Chenia, 2007). Estos elementos genéticos facilitan la transferencia rápida de genes de resistencia a antibióticos de uso comercial, los cuales pueden ser transmitidos a diversos grupos bacterianos (Stratev & Odeyemi, 2016). Esta capacidad de transferencia genética horizontal entre bacterias es de particular importancia, ya que contribuye a la diseminación y amplificación de la resistencia a los antibióticos en los entornos acuícolas. Conllevando a que el manejo y tratamiento de enfermedades en la acuicultura guatemalteca sea limitado, por lo tanto, se debe de fomentar el uso responsable de antibióticos en la acuicultura, promoviendo prácticas de producción sostenibles que reduzcan la dependencia de estos fármacos y minimicen el riesgo de propagación de la resistencia bacteriana.

La etnobotánica ha surgido como una herramienta alternativa para controlar y eliminar una amplia variedad de patógenos, tanto resistentes como no resistentes (Olusola et al., 2013; Ham et al., 2020). En Latinoamérica, el género de plantas más utilizado para el control de diversas enfermedades bacterianas, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, en organismos acuícolas, es el género *Lippia* (Familia: Verbenaceae).

Entre los extractos y aceites esenciales probados en este estudio, se encontró que *L. graveolens* exhibió un mayor efecto antibacteriano, siendo el aceite esencial el más efectivo para inhibir diversas cepas bacterianas del género *Aeromonas* spp. Se infiere que el compuesto responsable de la inhibición bacteriana es el timol, un terpeno fenólico presente en *L. graveolens*, el cual ha demostrado una fuerte actividad antimicrobiana al romper la membrana externa de las bacterias y aumentar su permeabilidad del ATP (Lambert et al., 2001). Es importante destacar que la eficiencia de *L. graveolens* en este estudio puede estar relacionada con la cantidad de timol extraído utilizando diferentes metodologías y solventes. Ya que, se observó una actividad antibacteriana limitada en los subproductos de *L. graveolens* obtenidos mediante el método de percolación con diversos solventes y la técnica de fluido supercrítico.

Esto refleja que, efectivamente, la cantidad del metabolito secundario mayoritario juega un papel importante en el control de bacterias patógenas, como lo sugiere Conde-Hernández et al. (2017). Además, este estudio evidenció polimorfismo químico en el género *Lippia*, lo cual afecta las proporciones de los monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides y otros compuestos extraídos. Esto pudo haber influido los resultados poco favorables obtenidos con *L. alba* en esta investigación, una planta ampliamente utilizada en todo el mundo para controlar diversos patógenos, tanto en la acuicultura como en la salud pública (de Souza et al., 2019; Joshi et al., 2018; Stashenko et al., 2004). Para *L. alba* existen más de cuatro quimiotipos siendo los principales compuestos linalool, citral, limoneno y carvona (da Silva et al., 2020). Cada quimiotipo tiene una actividad biológica específica, como analgésicas, antiespasmódicas, sedantes entre otras, infiriendo así que no todos los compuestos mayoritarios poseen una actividad antimicrobiana. En este estudio, solo se observaron resultados positivos utilizando su aceite esencial quimiotipo citral. Es importante destacar que la capacidad antibacteriana de *L. alba* fue menor que la de *L. graveolens*, lo que respalda la recomendación de priorizar el uso del aceite esencial de *L. graveolens* como el agente antimicrobiano.

Derivado del polimorfismo del género *Lippia*, se evidenció la presencia de tres quimiotipos de *L. graveolens* en Guatemala. El quimiotipo I, conocido como Cis-Dihidro- β -terpineol, se encuentra en el área de El Progreso. El quimiotipo II, Carvacrol, se ubica en el área de Chiquimula, y el quimiotipo III, Timol, se localiza en el área de Zacapa.

Estos quimiotipos demuestran una capacidad antimicrobiana variable debido a la composición diversa de su aceite esencial, como lo reporta Tezara et al. (2014). En Guatemala, se ha observado que el quimiotipo con mayor actividad antibacteriana es el timol, seguido por el carvacrol y el *Cis*-Dihidro- β -terpineol. Por otra parte, se pudo evidenciar que la mezcla de los diversos quimiotipos de *L. graveolens*, no poseen efecto aditivo o sinérgico, como lo reportan otros autores para aceites esenciales y extractos de otras plantas (Angane et al., 2022; Galindo et al., 2010; Scandorieiro et al., 2016). Por lo tanto, se sugiere el uso exclusivo del quimiotipo timol para el control bacteriano. Con el objetivo de incrementar la producción de aceites esenciales de *L. graveolens* para su uso a nivel industrial en la acuicultura, es necesario implementar métodos de extracción a gran escala. Sin embargo, este proceso plantea incertidumbre, ya que la intensificación y escalado pueden afectar la eficacia del método utilizado y el producto obtenido (Soto-Armenta et al., 2017).

Debido a las fuertes propiedades antibacterianas demostradas por el aceite esencial de *L. graveolens*, especialmente para el quimiotipo timol, se considera un buen candidato para la evaluación *in vivo*. Por lo tanto, al incorporar el aceite esencial de *L. graveolens* en la dieta de los juveniles de tilapia, se observaron beneficios, como: una mayor supervivencia durante el experimento de crecimiento de 30 días, así como un mayor crecimiento y una mayor eficiencia en la utilización del alimento por parte de la tilapia.

Los resultados indicaron que la concentración más efectiva fue de 1,200 mg/kg de aceite esencial, seguida de 300 mg/kg y 600 mg/kg. En consecuencia, se concluye que esta respuesta positiva podría estar relacionada con una mejor absorción de nutrientes y la activación de genes específicos en el proceso de digestión, según lo descrito por Ahmadifar et al. (2011). Este efecto positivo en el crecimiento y la utilización del alimento ha sido reportado por otros autores al utilizar diferentes fitobióticos (Heluy et al., 2020; Pachanawan et al., 2008; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Shourbela et al., 2021).

Sin embargo, en los tratamientos con aceite esencial de *L. graveolens*, no se observó un aumento en la tasa de consumo de alimento, lo que sugiere que el mejor crecimiento somático y la mayor supervivencia durante la fase inicial del experimento se deben a una utilización más eficiente de los nutrientes y mejor transporte y absorción de estos.

Similares resultados se han observado con la utilización de productos naturales en diversas especies acuícolas (Aanyu et al., 2020; de Souza et al., 2020; Magouz et al., 2021; Morselli, Baldissera, et al., 2020; Morselli, Reis, et al., 2020). A pesar de los resultados positivos obtenidos en este estudio, es importante tener en cuenta la validación de su uso en otras especies de cultivo, así como en las condiciones específicas del sistema y su manejo.

Los resultados revelaron que la tasa de supervivencia fue significativamente mayor en los tratamientos con aceite esencial de *L. graveolens*, lo cual indica un efecto positivo en el sistema inmune de los peces y en la utilización del alimento, durante la evaluación de 30 días. Según estudios previos realizados por Abdel-Latif et al. (2020) y Mohammadi et al. (2020), la tasa de supervivencia no debería verse afectada cuando las condiciones de crianza se controlan y mantienen dentro de los parámetros óptimos, como un nivel de oxígeno superior a 5 mg/L, una concentración de amoníaco inferior a 0.30 mg/L, un nivel de nitratos inferior a 1.6 mg/L y un nivel de nitritos inferior a 0.30 mg/L. Esto se hace para evitar la aparición de episodios de estrés agudo o crónico, que podrían perjudicar el rendimiento productivo y aumentar la mortalidad durante el período de crecimiento. En el presente experimento, algunos de estos parámetros estuvieron ligeramente fuera de los valores recomendados, con niveles de oxígeno de 4.72 ± 0.50 mg/L, nitritos de 7.75 ± 3.50 ppm, nitratos de 2.05 ± 0.75 ppm y amonio ionizado de 1.06 ± 0.9 ppm. Estas variaciones podrían haber causado algún nivel de estrés en los peces del sistema de cultivo, siendo los más susceptibles los peces con una condición de salud menor. Sin embargo, a pesar de estas condiciones, se observó una alta supervivencia en los tratamientos con aceite esencial de *L. graveolens*, lo que refleja un mejor estado fisiológico en los peces para enfrentar el estrés.

Por otro lado, en el presente estudio no se observó un efecto claro relacionado con la dosis de aceite esencial de *L. graveolens*, ya que la concentración media (600 mg/kg) mostró resultados similares al grupo control en algunas de las variables medidas, mientras que la dosis baja (300 mg/kg) y alta (1200 mg/kg) produjeron valores muy similares entre sí, pero mucho mejores que el control en las variables evaluadas. Esto difiere de lo propuesto por varios autores, quienes indican que las concentraciones más bajas muestran una mayor correlación con el grupo control, mientras que las dosis medias y altas difieren significativamente del control, lo que se traduce en un mejor rendimiento (Zheng et al., 2009; Toutou et al., 2018; Mohammady et al., 2022).

La heterogeneidad en los valores de algunas variables en el presente estudio puede atribuirse a diversos factores relacionados con el manejo del experimento, como variaciones en la temperatura del agua, altos niveles de algunos metabolitos nitrogenados y la densidad de peces. Aunque *O. niloticus* posee una alta plasticidad para adaptarse a variaciones moderadas en la temperatura y la densidad de población, se ha observado que la tasa de crecimiento tiende a disminuir a bajas temperaturas (<28°C) y a una mayor densidad (>3 kg/m³), como se describe en los estudios de Margaret et al. (2021) y Shourbela et al. (2021).

Además, se infiere que algunas de las inconsistencias presentadas en este estudio podrían estar relacionadas con un grado de estrés moderado en los peces. El estrés en los animales acuáticos puede provocar un variable consumo de reservas energéticas en actividades de mantenimiento y esta redistribución de energía metabólica interfiere negativamente en otros procesos fisiológicos, como el crecimiento y la supervivencia, entre otros (Barton & Zwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). En este estudio, el estrés moderado pudo influenciar en cierta medida los resultados de las variables evaluadas. Considerando que los organismos a los que se les incorporó aceite esencial de *L. graveolens* en la dieta podrían presentar una mayor capacidad de respuesta al estrés durante la fase de cultivo, las variables hematológicas, bioquímicas, enzimas digestivas e histomorfometría de hígado e intestinos se pueden utilizar para evaluar la salud general de los peces, así como otros parámetros como el estado metabólico y la tolerancia a enfermedades.

En el presente estudio, se observó una alteración en las enzimas ALT y AST en los peces tratados con aceite esencial en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la concentración total de estas enzimas durante el experimento fue menor a las reportadas por otros autores que evaluaron el uso de timol u otros aceites esenciales en tilapia y otras especies acuícolas (Hoseini & Yousefi, 2019; Zargar et al., 2019; Alagawany et al., 2021; de Souza et al., 2020). Por lo tanto, la inclusión de aceite esencial de *L. graveolens* en juveniles de tilapia, durante un periodo de 30 días parece ser un aditivo dietético seguro para las condiciones en que se desarrolló esta investigación.

La actividad de las enzimas hepáticas suele aumentar en respuesta a la exposición a fármacos y agentes tóxicos (Tennant & Center, 2008), lo que indica que el metabolito del timol no tiene ningún efecto negativo sobre el hígado, el cual es un órgano fundamental en el metabolismo de nutrientes (Caballero et al., 2004).

Además, no se encontró evidencia de efectos negativos en la morfología del hígado y los hepatocitos, lo que confirma que *L. graveolens* no afecta de manera negativa a este órgano en concentraciones entre 300 a 1,200 mg/kg. El aumento de las enzimas ALT y AST en el hígado puede indicar el uso de aminoácidos de la dieta para el crecimiento, así como su utilización como sustrato para la gluconeogénesis, especialmente en las actividades de AST y ALT (Bibiano-Melo et al., 2006).

En relación con las concentraciones de glucosa y proteína total, no muestran una tendencia específica en los tratamientos, pero cabe resaltar que no causan hipoglucemia o hiperproteinemia en los juveniles de tilapia del Nilo, ya que los valores se encontraban dentro del rango de referencia para esta especie (Hrubec et al., 2000). Se puede inferir que el bajo valor de glucosa y el alto valor de proteína total en el grupo control probablemente esté relacionado al estrés experimentado por los peces, infiriendo que este grupo posee un deficiente estado fisiológico, que compromete el estado de salud.

De acuerdo con la evaluación de las células sanguíneas, se observó un aumento en el número de linfocitos en todos los tratamientos en comparación con el grupo de control, lo que sugiere una activación del sistema inmunológico. Además, en el presente estudio, se encontró un porcentaje menor de células sanguíneas anormales en comparación con el grupo de control, lo que indica una eritropoyesis más eficiente en los tratamientos con aceite esencial de *L. graveolens*. Esto puede contribuir a un transporte interno de oxígeno más efectivo y favorecer los diferentes mecanismos del metabolismo de los peces. Por otro lado, el aumento de eritrocitos inmaduros y otras células sanguíneas anormales puede explicar el mayor valor de Hct (hematocrito) en el grupo de control, lo que posiblemente resulte en una menor eficiencia de los glóbulos rojos para transportar oxígeno en el cuerpo y una leve disminución en su tamaño, como se menciona en el estudio de Vo et al. (2023).

En el presente estudio, no solo se observó el beneficio en el crecimiento y aprovechamiento de los nutrientes, por parte de los juveniles de tilapia, de la inclusión de aceites esenciales en la dieta; sino que además se observó una mayor capacidad de respuesta del pez para prevenir enfermedades causadas por agentes infecciosos.

La incorporación del aceite esencial de *L. graveolens* en la dieta mostró tasas de mortalidad más bajas en comparación con el tratamiento control después de la exposición con *A. hydrophila*, lo que sugiere que otros parámetros inmunológicos, como la inmunoglobulina total, la actividad fagocítica, la expresión de citoquinas y la respuesta inmune celular, podrían contribuir a una respuesta eficiente contra las infecciones causadas por patógenos bacterianos (Awad & Awaad, 2017) . El presente estudio demostró que la incorporación del aceite esencial de *L. graveolens* mejora el crecimiento, la eficiencia alimenticia, la salud y la resistencia bacteriana en juveniles de tilapia. Estos efectos positivos también se han observado con otros productos naturales vegetales y en diferentes especies acuícolas (Brum et al., 2017; de Oliveira et al., 2020; R. C. de Souza et al., 2019; Mohammadi et al., 2020). Esto confirma que el uso de fitoquímicos no solo muestra beneficios *in vitro*, sino también *in vivo*, en tilapia juvenil mantenida en densidades moderadas y expuesta a eventos de estrés y patógenos bacterianos.

8. Conclusiones y recomendaciones

Las enfermedades bacterianas representan una amenaza significativa para el cultivo de tilapia, ya que pueden provocar pérdidas de hasta el 100% de la población en cultivo. En este estudio, se realizó un primer análisis de la diversidad de patógenos bacterianos, su relación con los signos clínicos y su sensibilidad a los antibióticos más utilizados en la industria acuícola guatemalteca. Se ha demostrado que las bacterias patógenas más prevalentes son *A. hydrophila* y *A. sobria*, las cuales presentaron resistencia a la oxitetraciclina y fosfomicina, lo que indica que se está fomentando la resistencia antibiótica debido a un manejo deficiente de los fármacos permitidos en la industria acuícola en Guatemala.

Dado que la resistencia a la oxitetraciclina es una amenaza en los cultivos de tilapia en Guatemala, es necesario implementar protocolos adecuados para el control y manejo de las enfermedades bacterianas, reduciendo el uso de antibióticos y promoviendo su uso responsable. Además, se debe fomentar el uso de otras alternativas, como la aplicación de derivados de plantas medicinales, especialmente el aceite esencial de *Lippia graveolens*, que se considera un producto de alta efectividad antibacteriana. Aunque todavía no se comprende completamente su mecanismo de acción, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. Se sugiere que el aceite de *L. graveolens*, a través de su componente principal, el timol, puede romper la membrana externa de las bacterias y aumentar la permeabilidad del ATP, lo que ayuda a controlar diversos patógenos. Sin embargo, no existe evidencia científica sólida que respalde esta inferencia específicamente para *L. graveolens*, por lo que se recomienda realizar más estudios en este campo para comprender de manera efectiva los mecanismos de acción de los aceites esenciales tanto *in vitro* como *in vivo*.

En el caso específico de *L. graveolens*, se recomienda utilizar la dosis de 300 mg/kg durante un período mínimo de 30 días para obtener resultados positivos. Estas dosis pueden ayudar a mejorar el crecimiento y la utilización del alimento, así como a responder de manera rápida y eficiente ante una infección por *A. hydrophila*. Además, se sugiere realizar ensayos *in vivo* que evalúen diferentes métodos de incorporación del aceite esencial de *L. graveolens* en el alimento, como el uso de aerosoles o la bioencapsulación, con el fin de garantizar que el método de adición no afecte los resultados ya obtenidos.

Esto es importante para facilitar la transferencia de esta tecnología a los productores acuícolas en Guatemala. También se sugiere evaluar dosis más bajas que la mínima (menores a 300 mg/kg), así como dosis intermedias (entre 300-600 mg/kg y entre 600 y 1200mg/kg) a las usadas en esta investigación.

Finalmente, este estudio recomienda, basándose en los resultados *in vitro* e *in vivo*, que el uso de productos naturales no debe reemplazar el uso de antibióticos en la acuicultura, sino que debe considerarse como una alternativa para mejorar la salud de los organismos y como una medida profiláctica. Esto se debe a que los mecanismos de acción de los productos naturales (fitoquímicos) no son específicos para la eliminación de patógenos en el organismo, sino que son un conjunto de sustancias que contribuyen a diversos procesos biológicos en el organismo. Por lo anterior, se recomienda evaluar la aplicación de la propuesta expuesta en el anexo 5: Propuesta de desarrollo y transferencia de tecnología para el uso del aceite esencial de *L. graveolens* en los cultivos de tilapia en Guatemala. Esta propuesta tiene como objetivo principal promover la transferencia de tecnología para la utilización del aceite esencial de *L. graveolens* en la acuicultura guatemalteca, con el fin de reducir el uso de los fármacos tradicionales en la acuicultura de tilapia en Guatemala. Además, propone una serie de acciones que involucran la implementación, regulación, evaluación, control y vigilancia, para fomentar las prácticas sostenibles en la producción acuícola..

8. Referencias

- Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. In *Foods* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11030464>
- Arumugam, M., Jayaraman, S., Sridhar, A., Venkatasamy, V., Brown, P. B., Abdul Kari, Z., Tellez-Isaias, G., & Ramasamy, T. (2023). Recent Advances in Tilapia Production for Sustainable Developments in Indian Aquaculture and Its Economic Benefits. *Fishes*, *8*(4), 176. <https://doi.org/10.3390/fishes8040176>
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. In *Fish and Shellfish Immunology* (Vol. 67, pp. 40–54). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.034>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calixto, E. S., Santos, D. F. B., Lange, D., Galdiano, M. S., & Rahman, I. U. (2020). Aquaculture in Brazil and worldwide: overview and perspectives. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, *5*(1), 098–107. <https://doi.org/10.24221/jeap.5.1.2020.2753.098-107>
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. In *Aquaculture International*, *18*(3), 403–414). <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>
- da Silva, H. N. P., de Souza, R. N., Sousa, E. M. de O., Mourão, R. H. V., Baldisserotto, B., & da Silva, L. V. F. (2020). Citral chemotype of the *Lippia alba* essential oil as an additive in simulated transport with different loading densities of tambaqui juveniles. *Ciencia Rural*, *50*(4). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190815>
- David, G. S., Carvalho, E. D., Lemos, D., Silveira, A. N., & Dall'Aglio-Sobrinho, M. (2015). Ecological carrying capacity for intensive tilapia (*Oreochromis niloticus*) cage aquaculture in a large hydroelectrical reservoir in Southeastern Brazil. *Aquacultural Engineering*, *66*, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.02.003>

- Dawood, M. A. O., El Basuini, M. F., Yilmaz, S., Abdel-Latif, H. M. R., Alagawany, M., Kari, Z. A., Razab, M. K. A. A., Hamid, N. K. A., Moonmanee, T., & Doan, H. Van. (2022). Exploring the Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. *Animals*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/ani12070823>
- de Souza, R. C., de Souza, E. M., da Costa, M. M., Melo, J. F. B., Baldisserotto, B., & Copatti, C. E. (2019). Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/anu.12827>
- Edwards, P. (2015). Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*, 447, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.001>
- FAO. (2022). *Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series. (version v4.02.08)*.
- Gabriel, N. N. (2019). Review on the progress in the role of herbal extracts in tilapia culture. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1619651>
- Galindo, L. A., De Moraes Pultrini, A., & Costa, M. (2010). Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of Natural Medicines*, 64(4), 436–441. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0429-2>
- García-Pérez, J., Ulloa-Rojas, J. B., & Mendoza-Elvira, S. (2021). Bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala. *Uniciencia*, 35(2), 1–14. <https://doi.org/10.15359/RU.35-2.4>
- Heluy, G. M., Ramos, L. R. V., Pedrosa, V. F., Sarturi, C., Figueiredo, P. G. P., Vidal, L. G. P., França, I. de F., & Pereira, M. M. (2020). Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil as an additive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings reared in salinized water. *Aquaculture Research*, 51(8), 3237–3243. <https://doi.org/10.1111/are.14658>
- Höferl, M., Wanner, J., Tabanca, N., Ali, A., Gochev, V., Schmidt, E., Kaul, V. K., Singh, V., & Jirovetz, L. (2020). Biological Activity of *Matricaria chamomilla* Essential Oils of Various Chemotypes. *Planta Medica International Open*, 07(03), 114–121. <https://doi.org/10.1055/a-1186-2400>

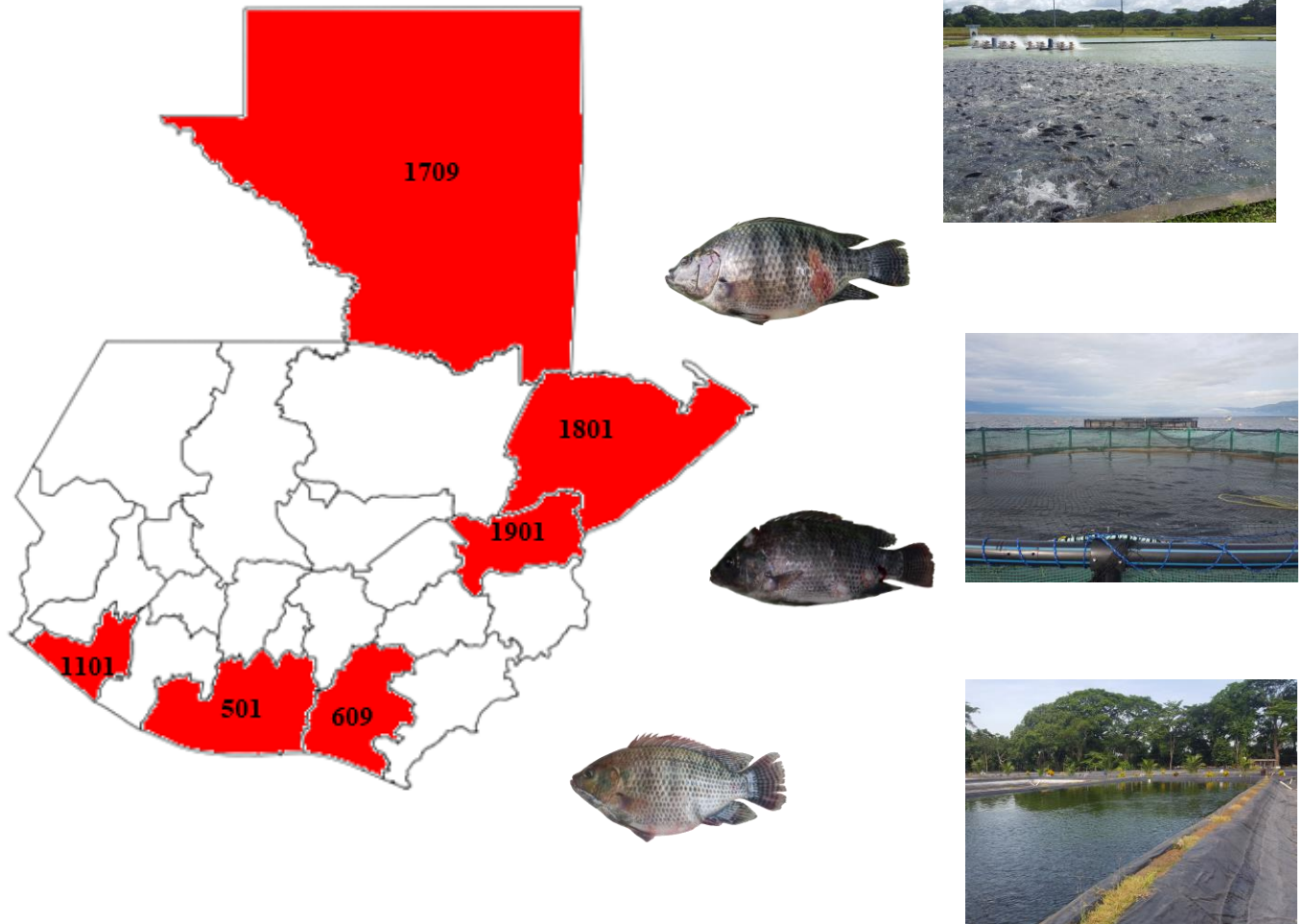
- Islam, M. S. (2005): Nitrogen and phosphorus budget in coastal and marine cage aquaculture and impacts of effluent loading on ecosystem: review and analysis towards model development. *Marine Pollution Bulletin*, 50(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.08.008>
- Joshi, A., Prakash, O., Pant, A. K., Kumar, R., & Negi, M. S. (2018). Chemical Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils of Two Morphotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(3), 687–700. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1486232>
- López-Paredes, L., Gamas-Rosal, F., Gutiérrez-Rivas, A., Enríquez-Anzueto, R., Ogaldez, G., Palomo-Cortez, A., & Gutiérrez-Rivas, R. (2020). *Análisis y plan de trabajo estratégico de la agrocadena de la Tilapia 2017- 2020*. www.agrocadenadelatilapia.com.gt
- Iwama, G. K. (1991). Interactions Between Aquaculture and the Environment. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21(2), 177–216. <https://doi.org/10.1080/10643389109388413>
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación [MAGA]. (2023). *Medicamentos registrados para acuicultura*.
- Mohammady, E. Y., Soaudy, M. R., Mohamed, A. E., EL-Erian, M. M. A., Farag, A., Badr, A. M. M., Bassuony, N. I., Ragaza, J. A., El-Haroun, E. R., & Hassaan, M. S. (2022). Can dietary phytogenic mixture improve performance for growth, digestive enzyme activity, blood parameters, and antioxidant and related gene expressions of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*? *Animal Feed Science and Technology*, 290. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115369>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Ortega, A. R., Guinoiseau, E., Quilichini, Y., Poli, J.-P., Del Carmen, M., Novelles, T., Castaño, I. E., Pino Pérez, O., Berti, L., & Lorenzi, V. (2021). Mode of action of *Lippia graveolens* essential oil on *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Research Square*, 1–22. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-245997/v1>
- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., & Rattanachaiksom, P. (2008). Potential of *Psidium guajava* Supplemented Fish Diets in Controlling *Aeromonas hydrophila* Infection in Tilapia

- (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 419–424.
<https://doi.org/10.1263/jbb.106.419>
- Parrado, M., Salas, M. C., Hernández-Arévalo, G., Ortega, J. P., & Yossa, M. (2014). Variedad bacteriana en cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. *ORINOQUIA*, 18(2), 237–246.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *African Journal of Microbiology Research*, 4(5), 420–425.
<http://www.academicjournals.org/ajmr>
- Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., & Azevedo, J. C. R. (2019). Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140>
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 7, Issue 3, pp. 275–297). Springer New York LLC.
<https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>
- Ruiz-Delgado, D. R. (2020). *Fitoterapia en la acuicultura, una mirada global desde la zootecnia*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A. C., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G., Andrade, C. G. T. J., Duran, N., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2016). Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00760>
- Schwitzguébel, J. P., Wang, H. (2007). Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environmental Science and Pollution Research - International*, 14(7), 452–462. <https://doi.org/10.1065/espr2007.05.426>
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., & Dawood, M. A. O. (2021). Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture*, 542. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>

- Silva, C., Yáñez, E., Martín-Díaz, M. L., Riba, I., & Delvalls, T. A. (2013). Integrated ecotoxicological assessment of marine sediments affected by land-based marine fish farm effluents: Physicochemical, acute toxicity and benthic community analyses. *Ecotoxicology*, 22(6), 996–1011. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1085-6>
- Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Acereto-Escoffíe, P. O., Peraza-González, E. E., Reyes-Sosa, C. F., & Rocha-Uribe, J. A. (2017). Extraction Yield of Essential Oil from *Lippia graveolens* Leaves by Steam Distillation at Laboratory and Pilot Scales. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(3), 610–621. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1331756>
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.058>
- Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2015). Methods for Extracting Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 31–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Toutou, M. M., Soliman, A. A., Elokaby, M. A., Ahmed, R. A., S, B. E., & History, A. (2018). *Growth performance and biochemical blood parameters of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, and thinlip mullet, Liza ramada, fed a diet supplemented with lemon (Citrus aurantifolia) peel in a polyculture system, Article Info Abstract* (Vol. 22, Issue 3). www.ejabf.journals.ekb.eg
- Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3–4), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>
- Zhu, F. (2020). A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>.

9. Anexos

Anexo 1



Departamentos evaluados durante 2017-2019 para evidenciar las bacterias más comunes en los diversos sistemas de cultivo de tilapia. ID: 1101: Retalhuleu, 501: Escuintla, 609: Santa Rosa, 1901: Zacapa, 1801: Izabal, 1709: Petén.

Anexo 2



Sistema de recirculación de agua utilizado para evaluar la mejora de la salud y parámetros zootécnicos de los cultivos de tilapia a través de dietas funcionales: Uso de aceite de *Lippia graveolens* como aditivo para dietas en la acuicultura.

Anexo 3



Video sobre la toma de las muestras para determinar los efectos sobre el crecimiento, utilización del alimento, parámetros hematobioquímicos, histomorfometría del intestino y el hígado, enzimas digestivas.

Anexo 4

METODOLOGÍA EN EXTENSO

Capítulo 2, artículo en proceso

Artículo 4 sometido en Uniciencia:

- García-Pérez J, Pérez-Sabino JF, Mendoza-Elvira S, Ribeiro da Silva A, Ulloa-Rojas JB. (2023). Antimicrobial activity of diverse chemotypes of *Lippia graveolens* against *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia. [Manuscrito enviado para publicación]. *Uniciencia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Detección de actividad antibacteriana de *Lippia graveolens* y sus quimiotipos.

Para evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (AE) de *L. graveolens* y sus combinaciones, frente a la bacteria patógena G-negativa más frecuente en los centros de producción de tilapia en Guatemala (*Aeromonas hydrophila*), se utilizó la técnica de difusión en disco de acuerdo *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*, descrita por Bauer et al., (1966) y teniendo en cuenta los cambios realizados por Mazumder et al., (2020) en el artículo: *Bactericidal activity of essential oil and its major compound from leaves of Eucalyptus maculata Hook. Against two fish pathogens*. La determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida, fue de acuerdo a la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS: *acronym in English*) del protocolo estándar número M31-T: *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals* y teniendo en cuenta los cambios realizados por Alderman & Smith (2001) en el artículo *Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases*. La interacción sinérgica entre quimiotipos de *L. graveolens*, fue tomada y modificada de Gutiérrez et al., (2008) del artículo: *The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients* y Nikkhah et al., (2017) en el artículo: *Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit*.

1.2 Preparación del medio a utilizar

Se utilizó agar Muller-Hinton (MHA: Merck®) para realizar las pruebas de sensibilidad bacteriana y para determinar el crecimiento y mantenimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*, se realizó en agar Tripticasa soya (TSA: Merck®). La preparación del agar fue acorde a las especificaciones del fabricante (Ficha técnica: www.merck-chemicals.com). Para el vertimiento de los agares, tanto MHA y TSA, se tomó como valor de referencia 4-5 mm de altura, realizado en una superficie nivelada horizontal. Una vez el agar se solidificó, las placas fueron almacenadas hasta por una semana en bolsas de plástico a temperatura de 4°C. En cada lote de agar se examinó la esterilidad e inocuidad del proceso, por lo tanto, se tomó una muestra representativa de cada lote y se realizó incubación por 72 h a 28°C. En el caso que mostrara crecimiento de bacterias, el lote fue descartado automáticamente (Alderman & Smith, 2001).

1.3 Preparación del inóculo bacteriano *A. hydrophila*.

El inóculo de la bacteria *A. hydrophila* se preparó a partir de cultivos puros de la colección bacteriana del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala. La cepa a utilizar fue la No. CEMA150219, dicha bacteria se asilo inicialmente en tilapias enfermas (*Oreochromis* sp.) con signos de Aeromoniasis, además posee resistencia a la oxitetraciclina, que es el antibiótico más utilizado en el cultivo de tilapias en Guatemala.

La cepa fue sembrada en agar TSA (TSA: Merck®) por 18 h a 28°C. La temperatura se seleccionó de acuerdo con el criterio de Noga (2010), el cual establece que para la microbiología de patógenos de peces se debe realizar a la temperatura a la que se encuentran naturalmente los organismos, en lugar de 37 °C, como lo indica la metodología estándar. Esto se debe a que los patógenos de peces tropicales o subtropicales pueden tener un crecimiento deficiente o no crecer a dicha temperatura. Posteriormente, se identificaron de 3 – 5 colonias y fueron colocadas en solución salina tamponada con fosfato PBS 1X, hasta alcanzar una concentración bacteriana de 1–2 x 10⁸ CFU/mL, la cual se verificó con una absorbancia de 1.00 a una longitud de onda de 600 nm, medida en un espectrofotómetro.

1.4 Inoculación de medios de prueba

Dentro de los 15 minutos de la preparación del inoculo, se tomó una alícuota de 100 μ L de la cepa *A. hydrophila*, la suspensión bacteriana se esparció de forma uniforme en placas de agar Muller-Hinton (MHA: Merck®) de forma separada. Se esparció con asa tipo L todo la alícuota en la placa de agar, procurando abarcar todo el diámetro de la caja de Petri. Una vez que la alícuota fue absorbida se dejó de esparcir con el asa tipo L. Cabe resaltar que cada siembra se realizó por triplicado (Alderman & Smith, 2001).

2. Método de difusión en disco

Para el método de difusión por disco se utilizó la metodología según Bauer et al., (1966) y considerando los cambios realizados por Mazumder et al., (2020). Se utilizaron discos de papel (BBL:Sensi-Disc®) con un diámetro de 6 mm. En los discos se inoculó con 10 μ L de cada quimiotipo de AE de *L. graveolens*, así como sus combinaciones, y se utilizó como control positivo discos de oxitetraciclina (40 μ g). Una vez inoculados los discos con los aceites esenciales se colocó un disco por cada caja Petri, esto para evitar que los halos de inhibición se unieran, ya que García-Pérez et al., (2022), reporta que el AE *L. graveolens* poseen más de 30 mm de halo de inhibición. Finalmente, todas las placas de agar fueron incubadas de forma aerobia, durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 28.0°C.

Pasado el tiempo de incubación, se evaluó visualmente el crecimiento bacteriano y se midió el diámetro de zona de inhibición (IZD) de los AE. Para realizar la medida se utilizó un vernier de tipo electrónico con una presión de 0.01 mm. La interpretación de la actividad antibacteriana del AE y sus combinaciones, se determinó según los criterios establecidos por Pascual et al., 2001 y considerando los cambios realizados por García-Pérez & Marroquín-Mora (2020), quienes consideran que un determinado extracto de planta, aceite esencial u otro producto de origen natural, tiene acción antibacteriana cuando produce una inhibición igual o mayor al 50% de inhibición con respecto al antibiótico de mayor uso. En el caso de Guatemala, el antibiótico más utilizado y el único permitido para la industria de tilapia es oxitetraciclina.

3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB)

La determinación de CMI y CMB se realizaron mediante el ensayo de macrodilución en caldo según NCCLS M31-T, considerando los cambios realizados por Alderman & Smith (2001). Se prepararon diluciones seriadas dobles de cada quimiotipo de aceite esencial de *L. graveolens* en caldo Muller-Hinton (MHB: Merck®), con una concentración que osciló entre 11.5 a 11,825 µg/mL. Con el fin de solubilizar el aceite esencial se utilizó Triton X (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 0.1% (v/v). El inóculo de *A. hydrophila* se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC/mL en PBS 1X y luego se transfirió a MHB para obtener un recuento bacteriano de 1×10^5 UFC/mL en tubos de ensayo de vidrio con medida de 13 x 100 mm con tapadera de rosca. Posteriormente, los tubos se incubaron de forma aerobia a 28 °C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, de cada tubo se tomó una alícuota de 100 µL y se sembró en agar TSA y se incubó durante 18 horas para el recuento bacteriano. La CMI y CMB se establecieron acorde a los criterios de Levison (2004): la CMI se definió como la concentración mínima del antibacteriano que evita que la suspensión clara de 10^5 UFC/mL se vuelva turbia después de la incubación de 24 h; la turbidez generalmente no puede aumentar más de 10 veces en la densidad bacteriana (10^6 UFC/mL). Y CMB se determinó como la concentración más baja de agente antibacteriano que reduce la viabilidad del inóculo bacteriano inicial a $\geq 99\%$.

4. Evaluación de la interacción sinérgica entre quimiotipos de *L. graveolens*.

La interacción sinérgica entre los quimiotipos del AE de *L. graveolens* se determinó según Nikkiah et al., (2017) y Gutierrez et al., (2008) con modificaciones. Se probaron cuatro interacciones combinando los tres quimiotipos de AE: a) cis-Dihidro-β-terpineol + carvacrol, b) cis-Dihidro-β-terpineol + timol y c) carvacrol + timol, todo en una proporción de 50:50 (v/v) y d) cis-Dihidro-β-terpineol + carvacrol + timol en una proporción de 33:33:33 (v/v/v).

Una vez determinada la CMI de cada aceite esencial individual, se calculó la concentración inhibitoria fraccional (FIC) de la siguiente manera: FIC del quimiotipo cis-Dihidro-β-terpineol (FIC_I) = CMI (cis-Dihidro-β-terpineol) en combinación/CMI (cis- dihidro-β-terpineol) solo, FIC del quimiotipo carvacrol (FIC_II) = CMI (carvacrol) en combinación/CMI (carvacrol) solo, FIC del quimiotipo timol (FIC_III) = CMI (timol) en combinación/CMI (timol) solo. El índice FIC (FICi) se calculó como la suma de cada FIC (FIC_I + FIC_II para combinaciones dobles y FIC_I + FIC_II + FIC_III para combinaciones triples).

Los resultados obtenidos se interpretaron de la siguiente manera: efecto sinérgico ($FIC_i \leq 0.5$); efecto aditivo ($0.5 < FIC_i \leq 1$); sin efecto interactivo ($1 < FIC_i \leq 4$); efecto antagónico ($FIC_i > 4$) como describen Gutierrez et al., (2008).

Referencias

- Alderman, D. J., & Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196(1), 211–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00535-X)
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. T., & Tenckhoff, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Pathology*, 45(4), 493–496. <https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/45/4/493/4821085>
- García-Pérez, J., Pérez-Sabino, J. F., Mendoza-Elvira, S., Ribeiro da Silva, A., & Ulloa-Rojas, J. B. (2022). In vitro assay of *Lippia graveolens* and *Lippia alba* extracts against *Aeromonas* spp isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 17(1), 28–46. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.6452>
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>
- Levison, M. E. (2004). Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(3), 451-465. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.04.012>
- Mazumder, A., Choudhury, H., Dey, A., & Sarma, D. (2020). Bactericidal Activity of Essential Oil and its Major Compound from Leaves of *Eucalyptus maculata* Hook. Against Two Fish Pathogens. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 23(1), 149–155. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1729248>
- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B., & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257(1), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021>
- Noga, E. (2010). *Fish disease: Diagnosis and treatment*. Iowa: Blackwell Publishing

- 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)
- Watts, J. L., Shryock, T. R., Apley, M., Bade, D. J., Brown, S. D., Gray, J. T., Heine, H., Hunter, R. P., Mevius, D. J., Papich, M. G., Silley, P., & Zurenko, G. E. (2008). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals* (3rd ed., Vol. 28).

Anexo 5

Propuesta de desarrollo y transferencia de tecnología para el uso de aceite esencial de *Lippia graveolens* en los cultivos de tilapia en Guatemala.

García-Pérez, J. ^{1,2*}(<https://orcid.org/0000-0002-6899-8036>) & Ulloa-Rojas, J.B.³
(<https://orcid.org/0000-0003-4464-1136>)

¹*Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.*

²*Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.*

³*Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.*

***Autor para comunicación:**

Josué García-Pérez. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. Teléfono (+502) 30255071. Email: josuegarciap@profesor.usac.edu.gt

Resumen

La acuicultura es un sector clave para satisfacer la creciente demanda de productos de origen hidrobiológico, y la tilapia es la segunda especie de pez continental de mayor cultivo a nivel mundial, y la primera en Guatemala. Sin embargo, el uso generalizado de antibióticos en el cultivo de tilapia para controlar enfermedades ha provocado la aparición de resistencia a antibióticos de uso comercial en la industria, lo que representa una amenaza para la salud humana y animal. Derivado a ello, existe una necesidad urgente de identificar soluciones alternativas a los antibióticos. Los aceites esenciales han surgido como una alternativa prometedora y su uso en el cultivo de tilapia ha ganado una atención significativa en los últimos años. Esta propuesta de desarrollo sostenible y transferencia de tecnología tiene como objetivo proporcionar una descripción general de los beneficios potenciales del uso de aceite esencial de *Lippia graveolens* en el cultivo de tilapia en Guatemala, con el fin de reducir la resistencia a los antimicrobianos y contribuir a los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Además, explorará los desafíos y las limitaciones del uso de aceites esenciales y destacará las mejores prácticas para su uso efectivo en el cultivo de tilapia.

Introducción

La acuicultura de tilapia en Guatemala enfrenta desafíos significativos debido, entre otros aspectos, a las infecciones bacterianas, especialmente a aquellas causadas por *Aeromonas hydrophila*, la cual es considerada como una de las bacterias de mayor frecuencia en la industria acuícola guatemalteca (García-Pérez et al., 2021). El uso excesivo de antimicrobianos en el tratamiento de estas infecciones ha llevado al desarrollo de cepas bacterianas resistentes, lo que compromete la eficacia de los tratamientos y resistencia a los antimicrobianos (RAM). Además, el uso indiscriminado de antimicrobianos puede tener efectos negativos en el medio ambiente, como la contaminación del agua y la alteración de la biota de los ecosistemas acuáticos (Varela-Mejías & Alfaro-Mora, 2018). Bajo este contexto, el uso de productos naturales, como el aceite esencial de *Lippia graveolens*, comúnmente conocida como “orégano mexicano” es una alternativa viable. Esta es una planta aromática y medicinal que ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas debido a la presencia de compuestos bioactivos en su aceite esencial y extractos sólidos (Salgueiro et al., 2003; Hernández et al., 2009; Bueno-Durán et al., 2014; Martínez-Santiago, 2018; García-Pérez et al., 2019, 2022). Esta planta se presenta como una alternativa prometedora para combatir la resistencia a los antimicrobianos y promover la producción sostenible de tilapia (García-Pérez et al., 2022). Además, el uso del aceite esencial de *L. graveolens* en la acuicultura fortalece el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), para fomentar una acuicultura sostenible. Esta propuesta se alinea con los siguientes ODS:

- ODS 2: Hambre cero → Promover sistemas de producción agrícola sostenibles y mejorar la productividad y la eficiencia en la acuicultura para garantizar la seguridad alimentaria y la nutrición.
- ODS 3: Salud y bienestar → Reducir la resistencia a los antimicrobianos y mejorar la salud de los organismos acuáticos cultivados.
- ODS 14: Vida submarina → Promover prácticas sostenibles en la acuicultura para conservar los recursos acuáticos y reducir los impactos ambientales.
- ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres → Utilizar alternativas naturales y sostenibles para reducir la contaminación y preservar la biodiversidad.

Por otra parte, el uso de compuestos naturales, como los derivados de *L. graveolens* se relacionan con el enfoque de "Una Sola Salud", concepto que es acuñado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) que reconocen la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental (Organización Mundial de la Salud [OMS], Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] y Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2021). En el contexto de la acuicultura, esto implica que las prácticas y soluciones deben considerar el bienestar de los organismos, la seguridad alimentaria, la salud humana y la conservación del medio ambiente. En este ámbito, el uso del aceite esencial de *L. graveolens* en el cultivo de tilapia cumple con este enfoque, ya que promueve una producción sostenible y responsable.

A. Beneficios del aceite esencial de *Lippia graveolens* en el cultivo de tilapia

Los aceites esenciales son compuestos volátiles y aromáticos extraídos de las plantas mediante destilación al vapor o prensado en frío (Reyes-Jurado et al., 2015). La composición química de los aceites esenciales varía según el material vegetal, pero normalmente contienen una mezcla compleja de componentes volátiles como terpenos, fenoles y aldehídos. El aceite esencial de *L. graveolens* (orégano) tiene propiedades antimicrobianas de amplio espectro que pueden eliminar o inhibir el crecimiento de bacterias, virus y hongos. También pueden mejorar la salud y la inmunidad de los peces, reducir el estrés y mejorar el crecimiento y la eficiencia alimenticia.

1. Mejora de la salud de los organismos acuáticos

La salud de los organismos acuáticos es un factor clave para el éxito de la acuicultura. Las enfermedades y las infecciones pueden causar pérdidas significativas en los cultivos acuícolas, además de representar un riesgo para la salud humana. El uso de aceites esenciales de *L. graveolens* ha demostrado ser eficaz en el control y la prevención de enfermedades en organismos acuáticos (García-Pérez et al., 2022; García-Pérez & Marroquín Mora, 2021). Sus funciones principales son:

- Propiedades antimicrobianas: el aceite esencial de *L. graveolens* contiene compuestos con actividad antimicrobiana, principalmente: timol y carvacrol, lo que les permite combatir bacterias, virus y hongos patógenos.

- Al agregar el aceite esencial de *L. graveolens* en la formulación y fabricación del alimento de los organismos acuáticos, se puede reducir la carga bacteriana y prevenir enfermedades infecciosas.
- Refuerzo del sistema inmunológico: el aceite esencial de *L. graveolens* tiene propiedades inmunomoduladoras, lo que significa que pueden estimular el sistema inmunológico de los organismos acuáticos. Un sistema inmunológico fortalecido ayuda a los organismos a resistir mejor las enfermedades y aumenta su capacidad para recuperarse de infecciones.
- Reducción del estrés: La acuicultura intensiva puede generar estrés en los organismos acuáticos debido a factores como la densidad de población, la manipulación frecuente y los cambios en las condiciones ambientales. El aceite esencial de *L. graveolens*, puede ayudar a reducir el estrés en los organismos acuáticos, lo que a su vez mejora su bienestar y su capacidad de resistir enfermedades, además de aumentar la sobrevivencia en condiciones de cultivo.

II. Conservación de recursos

La sostenibilidad de la acuicultura también implica la conservación de recursos naturales, como el agua y los alimentos utilizados en los sistemas de cultivo. El uso del aceite esencial de *L. graveolens* puede contribuir a esta conservación de varias formas.

- Reducción del uso de antibióticos: En la acuicultura convencional, los antibióticos se utilizan comúnmente para tratar y prevenir enfermedades en los organismos acuáticos. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos puede tener efectos perjudiciales, como la generación de resistencia bacteriana y la contaminación del medio ambiente acuático. Los aceites esenciales pueden ser una alternativa efectiva y natural a los antibióticos, lo que reduce su uso y minimiza sus impactos negativos.
- Mejora de la eficiencia alimentaria: el aceite esencial de *L. graveolens* también puede mejorar la eficiencia alimentaria en la acuicultura. Lo que significa que los organismos pueden aprovechar mejor los nutrientes presentes en los alimentos, lo que a su vez reduce la cantidad de alimento requerido para lograr un crecimiento óptimo y más importante aún, reduce la descarga de productos metabolitos y de residuos de alimentos al medio ambiente. Lo anterior va a contribuir con la disminución de los procesos de eutrofización de los cuerpos de agua.

III. Mitigación del impacto ambiental

La acuicultura puede tener impactos negativos en el medio ambiente si no se gestiona adecuadamente. El uso de aceites esenciales puede ayudar a mitigar algunos de estos impactos y reducir la huella ambiental de la acuicultura a través de:

- **Sustitución de productos químicos sintéticos:** Los productos químicos sintéticos utilizados en la acuicultura convencional, como los fármacos, pesticidas y desinfectantes, pueden ser perjudiciales para el medio ambiente acuático. Los aceites esenciales, al ser compuestos naturales, ofrecen una alternativa más segura y respetuosa con el medio ambiente. Además, muchos aceites esenciales son biodegradables, lo que significa que se descomponen fácilmente en el medio ambiente sin dejar residuos tóxicos.
- **Reducción de la carga orgánica:** Los residuos orgánicos generados en los sistemas de acuicultura pueden contribuir a la eutrofización y la contaminación del agua. El aceite esencial de *L. graveolens* ayuda a reducir la carga orgánica generada por los organismos acuáticos debido a que inducen una mayor eficiencia alimentaria, a través de la absorción y aprovechamiento de las materias primas de los alimentos formulados, reduciendo así los niveles excreción de nitrógeno y fósforo, los cuales, en exceso, son promotores de la proliferación descontrolada del fitoplancton.

Para el uso efectivo del aceite esencial de *L. graveolens* por parte de los acuicultores en Guatemala estos deben asegurarse de que se esté adicionando en el alimento un aceite de alta calidad extraído de fuentes confiables. También deben seguir las pautas de dosificación y aplicación proporcionadas por el fabricante y monitorear los peces para detectar cualquier efecto adverso. Para ello se propone la siguiente metodología de uso:

B. Metodología de uso

La diversidad de cepas de una especie de bacteria patógena puede tener un efecto significativo en la eficacia de los fármacos o productos naturales. Las diferentes cepas pueden desarrollar resistencia a ciertos compuestos, lo que puede dificultar su acción. Además, la variabilidad genética entre cepas puede afectar la respuesta de la bacteria a los tratamientos, haciendo que algunas cepas sean más susceptibles o resistentes que otras.

Por lo tanto, comprender la diversidad de cepas bacterianas y su interacción con los tratamientos es crucial para desarrollar enfoques terapéuticos eficaces y combatir la resistencia antimicrobiana. Por lo tanto, para el uso del aceite esencial de *L. graveolens* se deberá tomar en cuenta lo siguiente:

1. Pruebas *in vitro*: Se deben de realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana utilizando la cepa del agente patógeno que este afectando al sistema de producción, esto con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *L. graveolens*, para poder dosificar el aceite. Para ello se recomienda adoptar, en la medida de lo posible, la metodología propuesta por Alderman & Smith (2001).
2. Pruebas *in vivo*: Se deberán realizar ensayos en piscifactorías para evaluar los efectos del aceite esencial de *L. graveolens* en el crecimiento, la salud y la resistencia a infecciones bacterianas en tilapia, bajo los parámetros de producción de cada unidad de producción, tomando en cuenta temperatura de agua, tipo de infraestructura, densidad de siembra, variedad y estadios de desarrollo de los organismos a evaluar con el aceite esencial. Para ello se recomienda formar grupos de peces de control y grupos tratados con las dosis del aceite en el alimento, recomendadas en esta propuesta (Sección C). Además, se deberá medir parámetros como el crecimiento, la tasa de supervivencia, la incidencia de infecciones bacterianas y considerar la modificación de las concentraciones de acuerdo con los resultados que se van obteniendo.

C. Implementación

Se deberán seguir las siguientes pautas para la incorporación del aceite esencial de *L. graveolens* en la alimentación de tilapia, para asegurar la eficiencia y viabilidad del producto.

1. El uso del aceite esencial de *L. graveolens*: se deberá utilizar como profiláctico y no como un agente farmacológico para tratar algún tipo de enfermedad. En caso de que se necesite utilizarlo como agente farmacológico, se deberán realizar estudios de farmacocinética y bioviabilidad del producto.
2. Aceite esencial a utilizar: se deberá usar aceite esencial de *L. graveolens*, asegurando que el componente mayoritario sea Timol, y que se encuentre en una proporción mayor al 73% del total de la composición química.

Se debe de tomar en cuenta que en Guatemala se identificaron tres quimiotipos de *L. graveolens*, y que el quimiotipo Timol está ampliamente distribuido en el departamento de Zacapa.

3. Bacterias por prevenir y controlar: se recomienda que el aceite de *L. graveolens* se utilice para inhibir el crecimiento del género de *Aeromonas*, especialmente para la especie *A. hydrophila*. Para otro grupo de bacterias se deberán aplicar las recomendaciones de la sección B literal 2, de esta propuesta.
4. Dosificación: se recomienda utilizar una inclusión mínima de 300 mg/Kg de alimento. Igualmente se puede evaluar si dosis menores generan resultados similares.
5. Tiempo de suministro: se recomienda darlo consecutivamente por un periodo mínimo 30 días. Se puede evaluar el efecto en periodos mayores.
6. Edad los organismos: Se recomienda utilizar en organismos de 10 – 100 g de peso. Aunque el efecto solo fue validado a dicho rango de peso, no se descarta la posibilidad de uso para otros rangos de talla. Solo se debe considerar la edad de los organismos, la densidad de siembra, así como la temperatura de agua, para realizar el mejor ajuste de la ración alimenticia.
7. Vía de administración: para la incorporación del aceite esencial de *L. graveolens* en el alimento se recomienda que sea a través de la reconstitución del alimento (ya fabricado), esto con reducir el porcentaje de lixiviación o durante el proceso de fabricación de este. Además, deberá utilizarse aceite de pescado como vehículo de adición al alimento. En caso de que no se pueda utilizar dicha técnica, se recomienda usar la técnica de atomización a alta presión del aceite de *L. graveolens* utilizando etanol al 95% como vehículo; en este caso se deberá evaluar la tasa de lixiviación, para conocer la tasa de ingestión real del aceite esencial por los organismos. De utilizar dicha técnica, se recomienda recubrir el pellet con un ligante natural o artificial, que no afecte su palatabilidad.
8. Recomendaciones generales: no se recomienda utilizar la adición del aceite esencial de *L. graveolens* durante todo el ciclo productivo de tilapia, ya que no fue evaluado el punto de agotamiento fisiológico por la adición de este producto natural.

De utilizarlo por más de 30 días, se deberán evaluar cuidadosamente los parámetros de crecimiento, absorción y aprovechamiento de nutrientes, así como hematología, bioquímica sanguínea, histomorfometría de intestino e hígado, y el comportamiento de las enzimas digestivas. Con el fin de determinar cualquier efecto adverso.

9. Por último, se recomienda su uso principalmente en las etapas iniciales del crecimiento de la tilapia, en los cuales los especímenes son más susceptibles al estrés y a posibles infecciones.

D. Control y vigilancia

Es importante realizar un seguimiento continuo de los sistemas acuícolas que utilicen el aceite esencial de *L. graveolens* o bien cualquier subproducto de plantas medicinales, esto con el fin de evaluar su eficacia en el control de enfermedades y reducción de impactos ecológicos. Por lo tanto, se recomienda las siguientes acciones de control y vigilancia:

1. Evaluar el impacto del aceite esencial en la microbiota intestinal de los peces, con especial atención a la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos o productos naturales.
2. Evaluar el efecto del aceite esencial en la microbiota y plancton del cuerpo de agua (columna de agua y bentos) donde este se aplique o donde se descargue el agua de los sistemas de cultivo.
3. Organizar talleres y capacitaciones dirigidos a los productores acuícolas para informarles sobre los beneficios del uso de aceites esenciales y las mejores prácticas para su aplicación en la alimentación en el cultivo de tilapia.
4. Elaborar material educativo, como guías de buenas prácticas, para que los productores acuícolas puedan consultar y potenciar el uso del aceite esencial de *L. graveolens*, basados en una acuicultura sostenible.
5. Establecer un sistema de registro y seguimiento del uso del aceite esencial por parte de los productores acuícolas, incluyendo la dosis utilizada y la frecuencia de aplicación.

6. Realizar visitas de inspección por parte del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Guatemala a través de la dirección de Pesca y Acuicultura, y el Viceministerio De Sanidad Agropecuaria y Regulaciones, con el fin de realizar muestreo en las granjas acuícolas para verificar el cumplimiento de las recomendaciones y evaluar el impacto del uso del aceite esencial en la resistencia a los antimicrobianos.
7. Analizar periódicamente los datos recopilados para evaluar la eficacia del programa de control y vigilancia, así como la respuesta de los cultivos de tilapia al uso del aceite esencial.
8. Realizar ajustes y mejoras en el programa, si es necesario, para maximizar los beneficios y minimizar los riesgos asociados al uso del aceite esencial.

Conclusión

El uso del aceite esencial de *L. graveolens* en el cultivo de tilapia ofrece una alternativa prometedora para reducir la resistencia a los antimicrobianos y alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible. La presente propuesta está basada en los estudios realizados por García-Pérez (2023), donde se ha demostrado la actividad antimicrobiana contra *A. hydrophila* y su capacidad para mejorar el crecimiento, la salud y la resistencia a infecciones en los peces. Esta iniciativa tiene el potencial de beneficiar tanto a la industria acuícola como a la salud humana y el medio ambiente, al promover prácticas sostenibles y reducir la dependencia de los antibióticos permitidos dentro de la acuicultura de tilapia en Guatemala.

Referencias

- Alderman, D. J., & Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196(1), 211–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00535-X)
- Bueno-Durán, A. Y., Cervantes-Martínez, J., & Obledo-Vázquez, E. N. (2014). Composition of essential oil from *Lippia graveolens*. Relationship between spectral light quality and thymol and carvacrol content. *Journal of Essential Oil Research*, 26(3), 153–160. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.840808>
- García-Pérez, J., & Marroquín-Mora, D. (2021). Evaluación *in vitro* de extractos de plantas medicinales como posibles agentes antimicrobianos para bacterias patógenas en tilapia. *Kuxulkab'*, 27(57), 27–35. <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a27n57.3702>

- García-Pérez, J., Marroquín-Mora, D., & Pérez-González, M. (2019). Inclusión de extracto de *Lippia graveolens* (Kunth) en la alimentación de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) para la prevención de estreptococosis por *Streptococcus agalactiae* (Lehmann y Neumann, 1896). *Revista AquaTIC*, 54(1), 15–24. <https://www.researchgate.net/publication/346679022>
- García-Pérez, J., Pérez-Sabino, J. F., Mendoza-Elvira, S., Ribeiro da Silva, A., & Ulloa-Rojas, J. B. (2022). In vitro assay of *Lippia graveolens* and *Lippia alba* extracts against *Aeromonas* spp isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 17(1), 28–46. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.6452>
- García-Pérez, J., Ulloa-Rojas, J. B., & Mendoza-Elvira, S. (2021). Bacterial pathogens and their antimicrobial resistance in tilapia culture in Guatemala. *Uniciencia*, 35(2), 1-14. <https://doi.org/10.15359/RU.35-2.4>
- Hernández, T., Canales, M., Ávila, J. G., García, A. M., Meraz, S., Caballero, J., & Lira, R. (2009). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 295–300.
- Martínez-Santiago, A. (2018). Evaluación del aceite esencial de orégano mexicano *Lippia graveolens* en el crecimiento de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* y su respuesta como antimicrobiano de bacterias patógenas de peces [Máster Tesis]. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), & Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), (2021). La resistencia a los antimicrobianos y el marco de cooperación de las naciones unidas para el desarrollo sostenible.
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). *Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling*. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 7, Issue 3, pp. 275–297). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>
- Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., Proença da Cunha, A. (2003). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, 69(1), 80–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1055/s-2003-37032>

Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Review on pharmacological aspects to be considered for the use of antibiotics in shrimp farming. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(1), 1–14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>