

Evaluación de extracto etanólico de hojas de tomillo *Thymus vulgaris* como inhibidor de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus*

Francisco Pozo-Miranda^{1*}; Silvia Pinoargote-Véliz²

Resumen

Actualmente hay enfermedades emergentes causadas por bacterias, cuyo problema principal es el síndrome de mortalidad temprana transmitido por *Vibrio parahaemolyticus* causando mortalidad y pérdidas económicas en cultivos de invertebrados acuáticos. Por ello, se investigó la efectividad del extracto de las hojas del tomillo *Thymus vulgaris* como agente inhibidor de virulencia. Se efectuaron ensayos in vitro de factores de virulencia como concentración mínima inhibitoria, densidad celular, movilidad y biopelícula. Los resultados permitieron determinar inhibición en la proliferación bacteriana de los ensayos a distintas concentraciones, efecto que se percibió en la sensibilidad para *V. parahaemolyticus* correspondiente a la concentración mínima inhibitoria a 3.5 mg/ml y 10.5 mg/ml. En la densidad celular se observó acción inhibitoria a 17.5 mg/ml. En ensayos de movilidad en medio semilíquido (swimming) la bacteria disminuyó la capacidad de moverse a 17.5 mg/ml, 10.5 mg/ml y 3.5 mg/ml, al igual que en medio semisólido (swarming) donde la bacteria careció de capacidad para moverse frente a todas las concentraciones. En cuanto a la formación de biopelícula se observó que el efecto inhibitorio resulta a 3.5 mg/ml. Se concluye que el extracto de tomillo no funcionó como antibacteriano, sino como inhibidor de virulencia para *V. parahaemolyticus*, acción que se debe a compuestos presentes en el extracto (indol y lactonas). No obstante, para establecer su uso en acuicultura es necesario realizar ensayos de purificación de estas dos moléculas para evaluar en infecciones con *Vibrio parahaemolyticus* en larvas de camarón.

Palabras clave: densidad celular, inhibidor, movilidad, *Thymus vulgaris*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Evaluation of ethanolic extract of thyme leaves *Thymus vulgaris* as a virulence inhibitor in *Vibrio parahaemolyticus*

Abstract

Currently there are emerging diseases caused by bacteria, whose main problem is the early mortality syndrome transmitted by *Vibrio parahaemolyticus* causing mortality and economic losses in aquatic invertebrate culture. For this reason, the effectiveness of the extract of the Thyme leaves *Thymus vulgaris* as a virulence inhibitor agent was investigated. In vitro assays of virulence factors such as minimum inhibitory concentration, cell density, mobility and biofilm were carried out. The results allowed determining inhibition in the bacterial proliferation of the tests at different concentrations, an effect that was perceived in the sensitivity for *V. parahaemolyticus* corresponding to the minimum inhibitory concentration at 3.5 mg/l and 10.5 mg/ml. In the cell density, inhibitory action was observed at 17.5 mg/ml. In mobility tests in a semi-liquid medium (swimming) the bacteria decreased the ability to move to 17.5 mg/ml, 10.5 mg/ml and 3.5 mg/ml, as well as in a semi-solid medium (swarming) where the bacteria lacked the ability to move against all concentrations. Regarding biofilm formation, it was observed that the inhibitory effect results at 3.5 mg/ml. It is concluded that the thyme extract did not function as an antibacterial, but rather as a virulence inhibitor for *V. parahaemolyticus*, an action that is due to compounds present in the extract (indole and lactones). However, to establish its use in aquaculture, it is necessary to carry out purification tests of these two molecules to evaluate infections with *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp larvae.

Keywords: Key words: cell density, inhibitor, mobility, *Thymus vulgaris*, *Vibrio parahaemolyticus*

Recibido: 17 de abril de 2021

Aceptado: 8 de agosto de 2021

¹ Master en gestión y auditorías ambientales Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí. Cdla. Primero de Mayo, Portoviejo, Manabí, Ecuador

² Bióloga Marina. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí. Cdla. Primero de Mayo, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

*Autor correspondiente: fhpozo@espol.edu.ec

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* se ha incrementado (Poveda, 2017a) y consigo las enfermedades producidas por bacterias como *Vibrio parahaemolyticus*, un patógeno gramnegativo halófilo (Trinh et al., 2018), que pertenece a la familia Vibrionaceae (Gómez et al., 2019), habita en ambientes marinos y estuarinos (Rezny & Evans, 2018), siendo su rango óptimo de salinidad entre 5 – 30 g/l (Rodríguez-Camacho et al., 2014). *V. parahaemolyticus* es el responsable del Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS por sus siglas en inglés) (Saavedra-Olivos et al., 2018), a causa de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND por sus siglas en inglés) capaz de ocasionar el desprendimiento de células epiteliales del hepatopáncreas (Soo et al., 2019), causando posteriormente no solo la muerte de los organismos afectados durante los 35 primeros días (Junprung et al., 2018), sino también pérdidas económicas en países como China, Vietnam, Malasia, México y Filipinas (Bondad-Reantaso, 2016) incluidos Belice (Varela-Mejías et al., 2017) y países Sudamericanos (Peña et al., 2015).

Una opción para combatir el AHPND sería el uso de probióticos, microorganismos que poseen la capacidad para adherirse al tracto intestinal y mejorar las capacidades del entorno de cultivo, sin embargo, para mantener los resultados se necesita de una aplicación constante (Toledo et al., 2018). Otra de las soluciones es tener un correcto manejo del agua de los estanques que genera estrés en el animal y costos elevados (Bondad-Reantaso, 2016). Una buena opción también sería el uso de extractos crudos de plantas que posee propiedades antifúngicas, antibacterianas y anti virulentas (Mohammadmehdi & Jamshid, 2017).

Resultados eficaces se han reportado con extractos de ciertas plantas como orégano (*Origanum vulgare*), hierba luisa (*Aloysia triphilla*) (Sorroza et al., 2017), guayaba (*Psidium guajava*) (Mohammadmehdi & Jamshid, 2017), eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) frente a bacterias como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. haveyi* (Carbay Uyaguari & Sorroza Ochoa, 2019). De igual modo, el tomillo (*Thymus vulgaris*) ha demostrado su actividad antibacteriana contra microorganismos patógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,

Candida albicans, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* (Quynh & Trang, 2019), *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* (Tomazelli et al., 2017), *Vibrio fluviales* y *V. parahaemolyticus* (Oramadike & Ogunbanwo, 2017). Esta actividad es atribuida a presencia de aceite esencial que ha sido considerado como un agente antimicrobiano, debido a compuestos fenólicos, timol y carvacrol (Tomazelli et al., 2017), pero de extractos *Thymus vulgaris* también poseen moléculas denominadas auto inductores como lactonas e indol, cuyos reportes indican que a la regulación de la virulencia y en algunos casos disminuyen la virulencia de bacterias patógenas (Yang, Julyantoro, et al., 2017).

Considerando que la industria camaronera en el Ecuador representó en el periodo de enero 2021 en exportación 238'565.407,14 millones de dólares (Poveda, 2017b), es necesario aplicar nuevas y eficaces opciones para contrarrestar enfermedades bacterianas emergentes. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad del extracto del tomillo *Thymus vulgaris* contra la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*, mediante análisis de concentraciones terapéuticas, a fin de disminuir la actividad de factores de virulencia, siguiendo la hipótesis de que el extracto de *Thymus vulgaris* inhibe la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*.

II. METODOLOGÍA

Obtención del material vegetal

El tomillo fresco obtenido de una tienda de especias procedente de un cultivo orgánico fue secado en una incubadora Memmert durante 4 h a 80°C. Luego se separaron las hojas, ya secas se trituraron y pulverizaron usando un Coffee Mill Proctor Silex (Modelo E160).

Obtención del extracto

Se tomaron 85 gr de hojas pulverizadas de *T. vulgaris* para colocarlos en un vaso de precipitación que contenía 807 ml de etanol al 96%, luego se colocó en la plataforma de agitación Heidolph y se retiró después de 24 h. Posteriormente, se dejó precipitar el soluto y se recuperó el sobrenadante para filtrarlo por tres veces. Para eliminar el disolvente y obtener un extracto en la porción acuosa, la solución fue colocada en el ROTAVAPOR-R (Modelo Buchi

256064) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ a 3 rpm (Gonelimali et al., 2018). Posteriormente se obtuvo una concentración de 30 mg/ml del extracto al 100%.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis cromatográfico se efectuó en Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Se realizó una Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), usando una columna: DB-5MS (30 m longitud \times 0.25 mm Diámetro interno) con 0.25 micrómetros de espesor de película, con los parámetros de temperaturas: inyección a 250°C en modo Splitless, temperatura inicial del horno a 70°C por 2 minutos, gradiente del horno a $5^\circ\text{C}/\text{min}$, final del horno a 300°C por 6 minutos, de transferencia a 300°C , del detector a 230°C . El voltaje de electroionización fue a 70 eV a un rango de screening de 50-550 u.m.a.

Obtención de la cepa bacteriana

Se usó una cepa de *V. parahaemolyticus* del repositorio del Laboratorio de Microbiología de la carrera de Biología Marina (PUCE - Sede Manabí). Esta fue obtenida del hepatopáncreas de camarones *Litopenaeus vannamei* enfermos de un cultivo comercial en la provincia de Manabí. El hepatopáncreas fue macerado y sembrado por la técnica de barrido en medio de cultivo TCBS y posteriormente mantenido en refrigeración hasta su activación.

Preparación de los discos de inhibición

Se elaboraron discos de papel filtro estéril Whatman de 6 mm de diámetro, se impregnaron con 20 μl del extracto (agua de peptona y extracto de *T. vulgaris*) a diferentes diluciones 3.5 mg/ml, 17.5 mg/ml, 24.5 mg/ml. Para el control positivo se emplearon discos con 20 μl (0.03 mg/ml) de oxitetraciclina.

Concentración Mínima Inhibitoria

Para determinar la sensibilidad bacteriana al extracto, se utilizó el método de difusión en agar, que consiste en preparar cajas Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) e inocular la cepa bacteriana ($\text{D.O.}_{600} = 0.1$) con un hisopo. Para esto se tomaron los discos impregnados con extractos a diferentes concentraciones y se colocaron sobre el medio de

cultivo LB. Se incubaron a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. Se cuantificó mediante la medición del halo de inhibición (mm). Los análisis se realizaron con 6 réplicas por concentración (Oramadike & Ogunbanwo, 2017). Para la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) se escogieron concentraciones efectivas del extracto que disminuyan la proliferación bacteriana, de acuerdo con las categorías resistente ($R < 14.00$ mm), intermedio (I de 15.0 a 18.0 mm) y sensible ($S > 19.0$ mm).

Densidad celular

Para la determinación del crecimiento celular se prepararon 3 diluciones del extracto etanólico de *T. vulgaris* a concentraciones de 3.5 mg/ml, 10.5 mg/ml y 17.5 mg/ml. Se distribuyeron de forma seriada tubos con 8 ml de medio nutritivo (agua de peptona), al igual que las diluciones de cada extracto. Se inoculó la bacteria *V. parahaemolyticus* a una densidad óptica ($\text{D.O.}_{600} = 0.1$) y se incubó por 24 h a 29°C . Se cuantificó la D.O. a una longitud de onda de 600 nm cada 6 h en un espectrofotómetro Spectroquant NOVA 60. Se emplearon 6 réplicas para cada tratamiento.

Determinación de niveles de biopelícula

En tubos de cultivo de fondo plano de vidrio de 16 mm se adicionaron los extractos de cada tratamiento 3.5 mg/ml, 10.5 mg/ml, 17.5 mg/ml, se distribuyeron alícuotas (200 μl) de cultivos de *V. parahaemolyticus* y se incubaron por 24 h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Los tubos se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS). Se agregó etanol (150 μl) por 20 min, se eliminó el etanol y se tiñó con 150 μl de cristal violeta (0.5%) durante 15 min. Posteriormente, se eliminó el exceso de cristal violeta, se agregó etanol (150 μl) y se leyó la densidad óptica en el espectrofotómetro a una longitud de onda (D.O.) de 600 nm (J. Lee et al., 2011). Se usaron 6 réplicas

Movilidad swimming

Se denomina movilidad swimming al medio semilíquido que simula al líquido que hay entre los túbulos del hepatopáncreas del camarón. En este medio las bacterias desarrollan flagelo polar (cola) y nadan libremente. Para determinar el swimming, se distribuyeron alícuotas de suspensión de *V. parahaemolyticus* de 1.0 de DO_{600} en placas Petri LB

(0.2 % agar – 2% NaCl) y se agregó extracto (3.5 mg/ml, 10.5 mg/ml, 17.5 mg/ml). Se incubaron durante 24 h a 30±1°C y se les midió el halo de movilidad. Se emplearon 6 réplicas para cada tratamiento (Yang & Defoirdt, 2015).

Análisis estadístico

Se evaluaron la normalidad y homocedasticidad de las varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene ($p < 0.05$) a los datos de sensibilidad, densidad celular, y nivel de formación de biopelícula y movilidad. Cumplido el supuesto de normalidad de los datos se evaluaron las diferencias significativas respecto al control, mediante análisis de varianza ANOVA una vía ($p < 0.05$). Para los datos de sensibilidad que no presentaron normalidad se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Los datos de cada ensayo fueron evaluados usando el software libre R versión 3.6.0 y R Studio versión 1.1.453.

III. RESULTADOS

CG-EM

La evaluación del extracto mediante CG-EM permitió identificar 36 metabolitos, observamos a Ribitol, 6,10-Metano-19-norandrost-4-ene-

3,17-dione, 6-metoxi- y Acido Ferulico resultaron predominantes. Otros metabolitos con menor área de predominancia están nutraceuticos como acido succínico; el ácido orgánico málico; sacáridos como D-(+)-arabitol, ribitol glucitol, D-manitol lactosa, beta-gentiobiosa y 2-alfa-manobiosa. Antioxidantes como L-treito, vainillina, tirosol, ácido vanílico, ácido gálico, ácido cafeico. Inhibidores de quorum sensing: ácido arabinónico-1,4-lactona, 1H-indol, como se muestra en la tabla 1.

Concentración Mínima Inhibitoria

Se observó que los tratamientos 17.5 mg/ml y 24.5 mg/ml mostraron efecto inhibitor (15.40 mm de diámetro y 22.40 mm de diámetro respectivamente) similar al control positivo con oxitetraciclina 0.03 mg/ml (22.70 mm de diámetro), sin embargo, concentraciones más bajas mostraron halos de inhibición menores a los 15.0 mm de diámetro, equivalentes a presencia de resistencia bacteriana al extracto (figura 1). Los resultados nos demuestran que 24.5 mg/ml de extracto crudo ayudan combatir una infección de forma similar a un antibiótico sintético, aunque concentraciones más bajas del extracto crudo también ayudan a contrarrestar el crecimiento bacteriano, pero en menor grado.

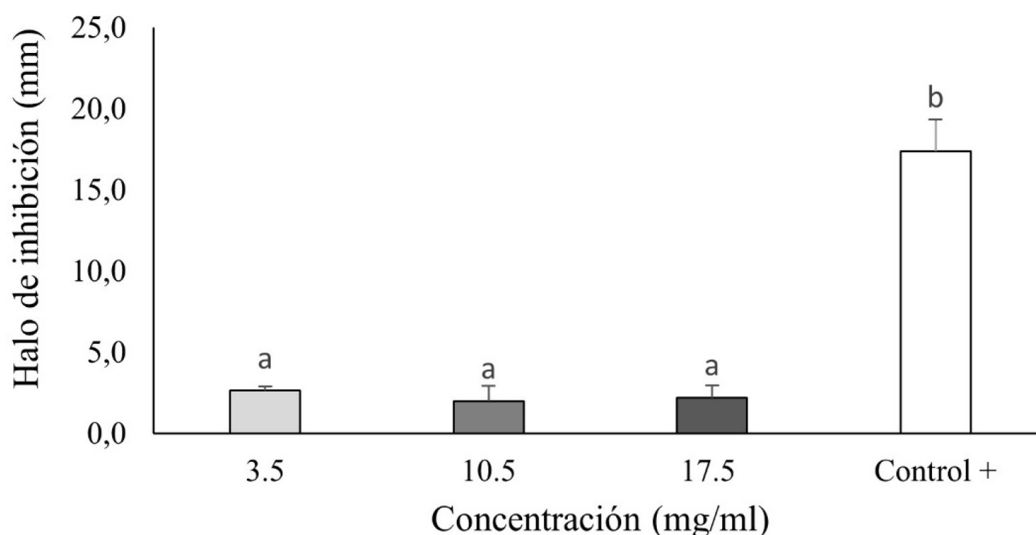


Figura 1. Halo de inhibición (mm) formado por los tratamientos con diferentes concentraciones (mg/ml) del extracto de *T. vulgaris*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), de extracto etanólico de *T. vulgaris*.

| Identificación putativa | Tiempo de retención (min) | % Área ±DE | Formula empírica | Masa molecular |
|--|---------------------------|-------------|------------------|----------------|
| Ácido beta-Láctico | 9.073 | 0.07 ± 0.00 | C10H12O5 | 212.2 |
| L-Valina | 10.84 | 0.10 ± 0.01 | C5H11NO2 | 117.15 |
| Dodecano, 4,6-dimetil- | 11.33 | 0.06 ± 0.00 | C14H30 | 198.39 |
| Ácido Succinico | 13.42 | 0.25 ± 0.02 | C4H6O4 | 118.09 |
| Hexadecano | 13.65 | 0.16 ± 0.01 | C16H34 | 226.44 |
| Ácido Glycerico | 13.84 | 0.19 ± 0.00 | C3H6O4 | 106.08 |
| Ácido1Ciclohexanecarboxilico, 1-metil-2-oxo-, etil ester | 15.43 | 0.04 ± 0.02 | C9H14O3 | 170.21 |
| BHT-quinona-metida | 17.36 | 0.07 ± 0.02 | C15H22O | 218.33 |
| Ácido Malico | 17.85 | 0.22 ± 0.02 | C4H6O5 | 134.09 |
| L-Treito | 18.37 | 0.17 ± 0.01 | C4H10O4 | 122.12 |
| Vanillina | 18.82 | 0.11 ± 0.01 | C8H8O3 | 152.15 |
| Tirosol | 19.73 | 0.12 ± 0.02 | C8H10O2 | 138.16 |
| Ácido dodecanoico, 1-metiletil ester | 21.06 | 0.65 ± 0.02 | C15H30O2 | 242.4 |
| Ácido Arabinonico-1,4-lactona * | 21.19 | 0.20 ± 0.01 | C5H8O5 | 148.11 |
| D-(+)-Arabitol | 22.90 | 0.16 ± 0.01 | C5H12O5 | 152.15 |
| Ribitol | 23.21 | 1.09 ± 0.02 | C5H12O5 | 152.15 |
| Ácido Vanillico | 24.04 | 0.17 ± 0.01 | C8H8O4 | 168.15 |
| Spiro[ciclopropano1,8'(1H')][3a.6]metano[3ah]ciclopenta cicloocteno]-10'-ona, octahidro-, (3'as,6'R,9'ar)- | 26.97 | 0.50 ± 0.02 | | |
| Glucitol | 27.94 | 0.48 ± 0.02 | C6H14O6 | 182.17 |
| D-Manitol | 27.62 | 0.35 ± 0.01 | C6H14O6 | 182.17 |
| Ácido duniana | 27.71 | 0.13 ± 0.00 | C20H32O4 | 336.5 |
| Ácido Gálico | 28.03 | 0.12 ± 0.00 | C7H6O5 | 170.1 |
| 3-(3',5'-Diclorofenil)-1,5-dimetil-3-azabicyclo[3.1.1]heptano-2,4-diona | 29.03 | 0.08 ± 0.01 | C13H11Cl2NO2 | 284.14 |
| 6,10-Metano-19-norandrost-4-eno-3,17-diona, 6-metoxi- | 29.75 | 1.35 ± 0.03 | C20H26O3 | 314.4 |
| Ácido Ferulico | 30.53 | 1.26 ± 0.03 | C10H10O4 | 194.18 |
| Ácido Cafeico | 31.38 | 0.43 ± 0.04 | C9H8O4 | 180.16 |
| Ácido Heptadecanoico | 31.55 | 0.13 ± 0.01 | C17H34O2 | 270.5 |
| 1H-Indol * | 32.24 | 0.14 ± 0.01 | C8H7N | 117.15 |
| Alpa-D-Glucopiranosido, metil | 38.58 | 0.17 ± 0.01 | C7H14O6 | 194.18 |
| Fenoxanil | 40.60 | 0.11 ± 0.01 | C15H18Cl2N2O2 | 329.2 |
| Lactosa | 40.78 | 0.31 ± 0.03 | C12H22O11 | 342.3 |
| Beta-Gentiobiosa | 40.94 | 0.26 ± 0.03 | C12H22O11 | 342.3 |
| 2-alfa-Manobiosa | 41.13 | 0.28 ± 0.01 | C12H22O11 | 342.3 |
| D-Xilosa | 42.15 | 0.07 ± 0.01 | C5H10O5 | 150.13 |
| 12-Azabicyclo[9.2.2]pentadeca-1(14),11(15)-dien-13-ona | 45.28 | 0.20 ± 0.06 | C14H21NO | 219.32 |
| Rafinosa | 49.63 | 0.20 ± 0.01 | C18H32O16 | 504.4 |

*Molécula con actividad de quorum sensing

Densidad Celular

La evaluación de la densidad celular se realizó para establecer efecto del extracto sobre la proliferación bacteriana respecto al control (sin extracto), se observó que el extracto muestra efecto antibacterial durante las 24 horas a concentración alta (17.5 mg/ml), comportamiento diferente se observó a concentraciones más bajas (10.5 mg/ml y 3.5 mg/ml). Aquí se pudo observar que la proliferación bacteriana fue similar al control hasta las 12 horas, finalmente,

a las 16 horas en ambos tratamientos reducen de crecimiento microbiano, como se muestra en la figura 2.

Estos resultados demuestran que el extracto posee moléculas con capacidad antibacterial, que cuando el tratamiento está a menor concentración (10.5 mg/ml y 3.5 mg/ml) tales moléculas tardan en mostrar el efecto (18 horas), pero disminuyendo la población bacteriana en un 50% menos que el control (sin extracto).

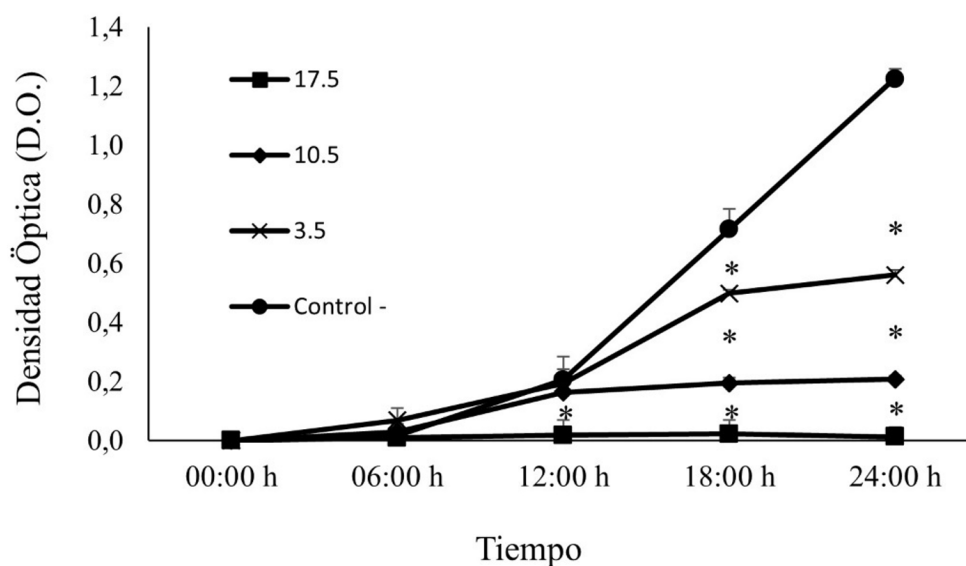


Figura 2. Valores de la densidad óptica (DO) en diferentes concentraciones (mg/ml) del extracto de *T. vulgaris*. cuantificado cada seis horas. Asteriscos las diferencias significativas que poseen los tratamientos respecto al control - (sin extracto).

Formación de biopelícula

Se evaluó la formación de biopelícula para establecer el efecto del extracto sobre la capacidad de la bacteria para adherirse a una superficie o tejido específico. Los resultados mostraron que la bacteria disminuyó significativamente (ANOVA $p < 0.05$) la capacidad de formar biopelícula (promedio D.O. =

0.08) en todos los tratamientos (17.5 mg/ml, 10.5 mg/ml y 3.5 mg/ml) comparados con el control (D.O. = 0.16) como se observa en la figura 3. Se observa que concentraciones mínimas (3.5 mg/ml) son suficientes para evitar agregaciones celulares, contrarrestando la colonización de bacterias a superficies o tejidos.

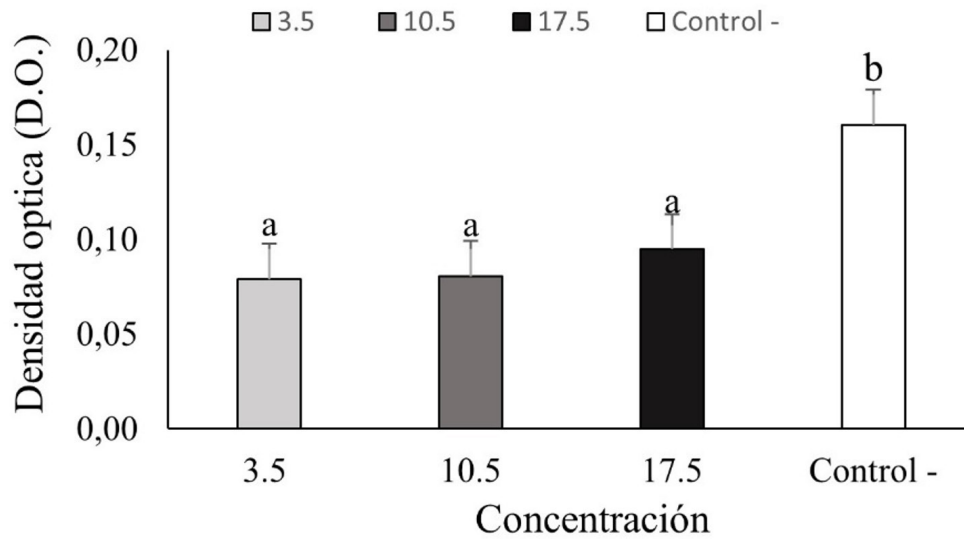


Figura 3. Valores de la D.O. perteneciente a cada concentración del extracto de *T. vulgaris* después de 24 h de incubación a $30\pm 1^\circ\text{C}$ con respecto al control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Niveles de movilidad swimming

Al evaluar mediante ANOVA $p < 0.05$ la movilidad de las colonias bacterianas se observó que el extracto de *T. vulgaris* redujo significativamente la movilidad *swimming* de la bacteria comparado con el control (17.40 mm diámetro). La concentración de 17.5 mg/ml presentó una movilidad de 2.2 mm diámetro,

movilidad similar al resto de concentraciones evaluadas como se muestra en figura 4. Podemos observar que las concentraciones evaluadas evitan la movilidad en medio semilíquido, lo cual brinda una oportunidad para contrarrestar la movilización de colonias en superficies como túbulos de órganos objetivos (hepatopancreas).

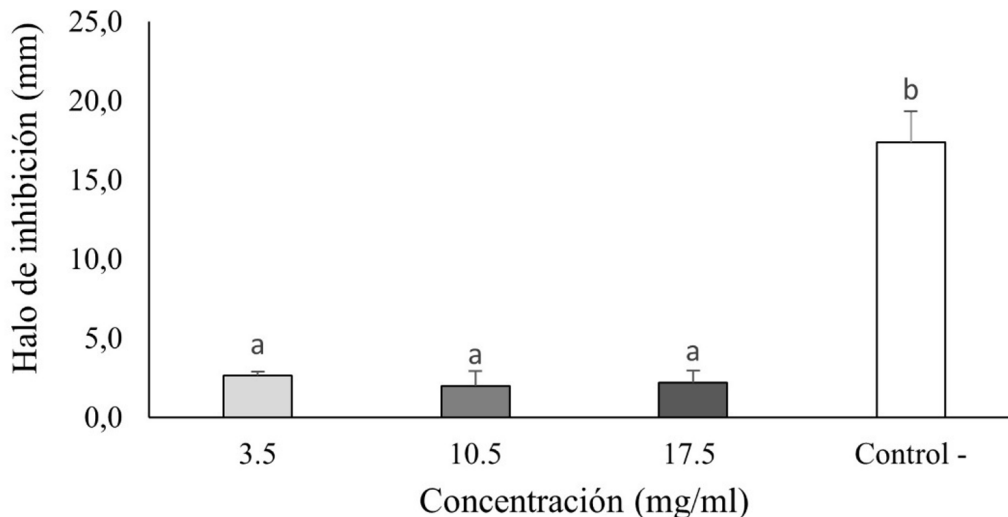


Figura 4. Movilidad *swimming* de *Vibrio parahaemolyticus* en agar semilíquido con extracto de *T. vulgaris* a distintas concentraciones (mg/ml). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

En la actualidad, los patógenos bacterianos específicamente del género *Vibrio* es el principal problema en el cultivo de camarón (Saavedra-Olivos

et al., 2018) y el uso de antibióticos es el principal tratamiento que genera problemáticas como; residuos en el suelo del cultivo, en el músculo del camarón y resistencia bacteriana (Varela-Mejías & Alfaro-Mora,

2018). Se ha demostrado que los extractos de origen vegetal evitan esta problemática, al aplicarse como medidas profilácticas para combatir a las bacterias en la acuicultura (Carbay Uyaguari & Sorroza Ochoa, 2019).

El tomillo *Thymus vulgaris* es una especie de planta que pertenece a la familia Lamiaceae, sus hojas son pequeñas y aromáticas (Salehi et al., 2019), cuya composición química incluye terpenos, alcoholes terpénicos, derivados fenólicos, cetonas, aldehídos, éteres y ésteres (Salehi et al., 2019). En varios estudios se ha atribuido el efecto benéfico de *Thymus vulgaris* a su aceite esencial, que se ha sido considerado como un agente antimicrobiano, debido a compuestos fenólicos y compuestos volátiles como timol y carvacrol (Tomazelli et al., 2017) extraído con solventes acuosos mediante arrastre por vapor (Montero-Recalde et al., 2018), que podrían contrarrestar la enfermedad AHPND causada por *V. parahaemolyticus* mediante la muerte de la bacteria causal.

Al trabajar con extractos etanólico nos encontramos con moléculas tipo nutraceuticos como ácido succínico y su derivado ácido málico, aceite esencial como el hexadecano y una molécula de carácter citotóxico como es BHT-quinona las cuales pudieron causar el efecto antibacteriano observado en el análisis de concentración mínima inhibitoria (CMI) a concentraciones de 24.5 mg/ml, 17.5 mg/ml, 10.5 mg/ml y 3.5 mg/ml (esta última con un diámetro de inhibición de 12.0 mm). Otro estudio también observó efecto inhibitorio, aunque esto fue a concentraciones superiores a 1.3 mg/ml de extracto con un diámetro de 7.7 mm (Oramadike & Ogunbanwo, 2017), lo que indica que a mayor concentración de *T. vulgaris* mayor es el diámetro del halo de inhibición (Montero-Recalde et al., 2018). El efecto observado en cada uno de los estudios varía mucho en cuanto a la concentración usada, esto podría ser a causa de la composición fenólica presente en el extracto durante el tiempo de los tratamientos (Quynh & Trang, 2019), por tanto para contrarrestar de manera más eficaz la actividad bacteriana, es necesaria la combinación de moléculas con actividad biológica para neutralizar el crecimiento de bacterias principalmente multirresistente (Iseppi et al., 2019).

Por otro lado, el extracto también presenta glucósidos, antioxidantes y moléculas muy

interesantes con capacidad de regulación de la comunicación celular (quorum sensing) (tabla 1). El quorum sensing (QS) es un proceso en el cual las bacterias activan su virulencia en relación con su densidad celular, a alta densidad celular se induce la liberación de moléculas auto inductoras acil-homoserin-lactonas (HSL) que activan la expresión de genes OpaR que estimulan la patogenicidad de la bacteria (Kalburge et al., 2017), mediante el incremento de la movilidad, formación de biopelícula, producción de sideróforos, bioluminiscencia y otros (Burke et al., 2015; Karnjana et al., 2019; Paczkowski et al., 2017). Ahora, moléculas de indol han demostrado actividad antagonica a acil-homoserin-lactonas (HSL) (Kim & Park, 2015; J. H. Lee et al., 2015; Li et al., 2014; Mueller et al., 2009; Yang, Lin, et al., 2017). Esto podría justificar los resultados obtenidos debido a la presencia de indol de nuestro extracto. Nosotros observamos que a concentración baja de extractos (3.5 mg/ml) la actividad antibacteriana disminuye, pero la actividad antivirulencia aumenta, evidenciado en la disminución de la formación de biopelícula y movilidad, debido a la presencia de un agente regulador de la expresión genética bacteriana (Myszka et al., 2016). El indol es una molécula de señalización heterocíclica, que ha demostrado la reducción de genes relacionado a virulencia y formación de biopelícula en *Pseudomona aeruginosa* (J. Lee et al., 2011). Esto confirma la hipótesis de que el extracto de *Thymus vulgaris* al poseer moléculas de Indol podría actuar como inhibidor de virulencia, brindándonos oportunidad de crear tratamientos terapéuticos que eviten el problema de resistencia bacteriana.

V. CONCLUSIÓN

La presente investigación evidenció la eficacia que tiene el extracto alcohólico de *T. vulgaris* sobre *Vibrio parahaemolyticus*, al establecer concentraciones mínimas (3,1 mg/ml) que detiene el crecimiento. En cuanto a la capacidad patógena de la bacteria relacionado a su movilidad y formación de biopelícula, estas fueron totalmente inhibida, debida a la presencia de indol, molécula que tiene la capacidad de regulación de expresión genética, inhibiendo la expresión de genes de virulencia. Pese a esto, se requiere evaluar la purificación y toxicidad de esta molécula con el fin de encontrar resultados

que permitan emplearlos en los tanques de cultivo, en presencia de larvas de camarón.

Financiamiento

El proyecto forma parte del departamento de investigación de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento por el apoyo brindado en la realización de investigación como parte de estudios relacionados a mis estudios de Doctorado en el Programa de Biociencias en la ESPOL, además de estar dentro del marco del proyecto Evaluación de principios activos de planta superiores y algas para la inhibición de la virulencia *Vibrio parahaemolyticus* con fines acuícolas desarrollado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bondad-Reantaso, M. (2016). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of penaeid shrimps: Global perspective. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (UN)*, 16–23.

Burke, A. K., Guthrie, L. T. C., Modise, T., Cormier, G., Jensen, R. V., McCarter, L. L., & Stevens, A. M. (2015). OpaR controls a network of downstream transcription factors in *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *PLoS ONE*, 10(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121863>

Carbay Uyaguari, Y. A., & Sorroza Ochoa, L. (2019). Uso de extracto alcoholico de las plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*), guayaba (*Psidium guajava*) y eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) frente a la vibriosis en acuicultura. *Revista Metropoli- Tana de Ciencias Aplicadas*, 2(3), 48–55.

Gómez, M., Torres, D., Medrano, C., & Melchor, L. (2019). Identificación de *Vibrio cholerae* aislada de la laguna de Cajititlán del Estado de Jalisco mediante PCR punto final. *Avances de Investigación En Inocuidad de Alimentos*, 2, 1–4.

Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan,

J., Charles, F., Chen, M., & Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>

Iseppi, R., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Pellati, F., Benvenuti, S., Tardugno, R., Bondi, M., & Messi, P. (2019). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables. *Natural Product Research*, 33(24), 3568–3572. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1482894>

Junprung, W., Supungul, P., & Tassanakajon, A. (2018). *Litopenaeus vannamei* heat shock protein 70 (LvHSP70) enhances resistance to a strain of *Vibrio parahaemolyticus*, which can cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), by activating shrimp immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.011>

Kalburge, S., Carpenter, M., Rozovsky, S., & Boyd, F. (2017). Quorum Sensing Regulators Are Required for Metabolic Fitness in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 85(3), 1–18.

Karnjana, K., Soowannayan, C., & Wongprasert, K. (2019). Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 88(February), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.058>

Kim, J., & Park, W. (2015). Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *Journal of Microbiology*, 53(7), 421–428. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5273-3>

Lee, J., Cho, M., & Lee, J. (2011). 3-Indolylacetonitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 Biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Environmental Microbiology*, 13(1), 62–73. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

2920.2010.02308.x

Lee, J. H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends in Microbiology*, 23(11), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.08.001>

Li, X., Yang, Q., Dierckens, K., Milton, D. L., & Defoirdt, T. (2014). RpoS and indole signaling control the virulence of *Vibrio anguillarum* towards gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *PLoS ONE*, 9(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111801>

Mohammadmehdi, F., & Jamshid, K. (2017). In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4), 660–666. <https://doi.org/10.1177/2156587217700772>

Montero-Recalde, M., Mira, J. C., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño-Miranda, P., & Erazo-Gutiérrez, R. (2018). Antimicrobial efficacy of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) on a staphylococcus aureus strain. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(2), 588–593. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520>

Mueller, R. S., Beyhan, S., Saini, S. G., Yildiz, F. H., & Bartlett, D. H. (2009). Indole Acts as an Extracellular Cue Regulating Gene Expression in *Vibrio cholera*. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3504–3516. <https://doi.org/10.1128/JB.01240-08>

Myszka, K., Schmidt, M. T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkiewicz, M., & Czaczyk, K. (2016). Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 114, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.006>

Oramadike, C., & Ogunbanwo, S. (2017). Antagonistic activity of *Thymus vulgaris* extracts against *Vibrio* species isolated from seafoods. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1199–1205. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2543-6>

Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCready, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., Henke, B. R., Smith, C. D., & Bassler, B. L. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>

Peña, L. D. De, Cabillon, N. A. R., Catedral, D. D., Amar, E. C., Usero, R. C., Monotilla, W. D., Calpe, A. T., Fernandez, D. D. G., & Saloma, C. P. (2015). *Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in Penaeus vannamei and P. monodon cultured in the Philippines*. 116, 251–254. <https://doi.org/10.3354/dao02919>

Poveda, D. (2017a). Camarón - *Reporte de Exportaciones Ecuatorianas*. Cámara Nacional de Acuicultura.

Poveda, D. (2017b). Camarón – *Reporte de Exportaciones Ecuatorianas Totales*. Cámara Nacional de Acuicultura.

Quynh, C. T. T., & Trang, V. T. (2019). Volatile composition, antioxidant property and antimicrobial activities against food-borne bacteria of vietnamese thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(3B), 127–136. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/57/3b/14494>

Rezny, B. R., & Evans, D. S. (2018). *Vibrio Parahaemolyticus*. In *JAMA: The Journal of the American Medical Association* (Vol. 236, Issue 7). <https://doi.org/10.1001/jama.1976.03270080014016>

Rodríguez-Camacho, J., Méndez-Gómez, E., Rivas-Montaño, A., & Cortés-Ruiz, J. (2014). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista Bio Ciencias*, 2(4), 282–292. <https://doi.org/10.15741/revbio.02.04.06>

Saavedra-Olivos, K., Peralta-Ortiz, T., Ordinola-Zapata, A., Sandoval-Ramayoni, J., Vieyra-Peña,

- E., Zapata-Cruz, M., Hidalgo-Mogollón, A., Morán-Ávila, B., Mendoza-Neyra, O., Mendoza-Dioses, M., & Campoverde-Peña, S. (2018). Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(1), 328. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>
- Salehi, B., Abu-Darwish, M. S., Tarawneh, A. H., Cabral, C., Gadetskaya, A. V., Salgueiro, L., Hosseinabadi, T., Rajabi, S., Chanda, W., Sharifi-Rad, M., Mulaudzi, R. B., Ayatollahi, S. A., Kobarfard, F., Arserim-Uçar, D. K., Sharifi-Rad, J., Ata, A., Baghalpour, N., & Contreras, M. del M. (2019). Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science and Technology*, 85, 287–306. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.020>
- Soo, T. C. C., Devadas, S., Mohamed Din, M. S., & Bhassu, S. (2019). Differential transcriptome analysis of the disease tolerant Madagascar-Malaysia crossbred black tiger shrimp, *Penaeus monodon* hepatopancreas in response to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection: inference on immune gene response and in. *Gut Pathogens*, 11(39), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0319-4>
- Sorroza, L., Campoverde, M., & Santacruz, R. (2017). Estudio preliminar de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 49, 1–7.
- Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 30(2), 57–71.
- Tomazelli, J., Kuhn, F., Padilha, P., Vicente, L., Costa, S., Boligon, A., Scapinello, J., Nesi, C., Dal Magro, J., & Lamo, C. (2017). Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78(2), 311–317. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08716>
- Trinh, S. A., Leyn, S. A., Rodionov, I. D., Godzik, A., & Satchell, K. J. F. (2018). Draft genome sequences of two *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with gastroenteritis after raw seafood ingestion in Colorado. *Genome Announcements*, 6(3), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01387-17>
- Varela-Mejías, A., & Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 1–14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N., & Aranguren-Caro, L. (2017). Acute hepatopancreatic necrosis: a review of the disease in *Penaeus vannamei*. *Agron. Mesoam*, 28(3), 735–745. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>
- Yang, Q., & Defoirdt, T. (2015). Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environmental Microbiology*, 17(4), 960–968. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12420>
- Yang, Q., Julyantoro, G. S., Wang, Z., Lin2, B., Rubin, R. A., Vora, G. J., & Defoirdt, T. (2017). Indole signalling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental Microbiology*, August, 1–38. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13714>
- Yang, Q., Lin, B., Sasmita, G., Pande, J., Vora, G. J., & Defoirdt, T. (2017). Indole signalling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental Microbiology*, 19(5), 1987–2004. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13714>