



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales

## INFORME FINAL

Aplicación de inmunoestimulantes de origen natural en el cultivo de tilapia para la  
prevención de Estreptococosis en Guatemala

Equipo de investigación

Coordinadora

M.Sc. Dora Carolina Marroquín Mora.

Investigador Asociado

M.Sc. Josué Rodolfo García Pérez.

Auxiliar de Investigación I

T.A María Isabel Pérez.

Centro de Estudios del Mar y Acuicultura -CEMA-  
Instituto de Investigaciones Hidrobiológicas -IIH-

Guatemala 25 de octubre de 2016

### **3. CONTRAPORTADA**

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Augusto Saúl Guerra Gutiérrez  
Coordinador del Programa de Recursos Naturales y Ambiente

M.Sc. Dora Carolina Marroquín Mora  
Coordinador del proyecto

M.Sc. Josué Rodolfo García Pérez  
Investigador

T.A María Isabel Pérez  
Auxiliar de investigación

Partida Presupuestaria  
4.8.26.2.46  
Año de ejecución: 2015

#### 4. CONTENIDO GENERAL

5. RESUMEN .....	7
6. ABSTRACT .....	8
7. INTRODUCCION .....	9
8. MARCO TEÓRICO .....	11
9. METODOLOGÍA .....	18
10. RESULTADOS .....	31
11. DISCUSION DE RESULTADOS .....	44
12. CONCLUSIONES .....	47
13. REFERENCIAS .....	48
14. APENDICES .....	54
15. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN .....	55

## INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	Aislamiento de las bacterias patógenas colectadas en abril 2015	19
Figura No. 2	Infección vía IP con <i>Streptococcus agalactiae</i>	21
Figura No. 3	Preparación de las dietas experimentales (Izq: Laboratorio / Der: Finca)	24
Figura No. 4	Tratamientos con orégano y probiótico	25
Figura No. 5	Infraestructura de la Fase II condiciones semi-controladas	27
Figura No. 6	Extracción de sangre	28
Figura No. 7	Tubos heparinizados con sangre después de 12,000 rpm	29
Figura No. 8	Kits comerciales para determinar proteína total y glucosa total en plasma	29
Figura No. 9	Recuento diferencial de eritrocitos y leucocitos	30
Figura No. 10	Signología de <i>Streptococcus agalactiae</i>	31
Figura No. 11	Tipificación bacteriana con Microgen Strep <sup>®</sup>	32
Figura No. 12	Signología más frecuente en los primeros días de infección	34
Figura No. 13	Grafica del crecimiento en condiciones controladas	35
Figura No. 14	Calidad fisicoquímica de agua en los tratamientos evaluados, en un periodo de treinta días. a) NO <sub>3</sub> , b) NH <sub>4</sub> , c) NO <sub>2</sub> , d) pH, e) OD, f) TDS. Los valores se expresan en mg/mL, por el tiempo de evaluación, exceptuando el de pH que adimensional	36
Figura No. 15	Resistencia a la infección vía IP de <i>Streptococcus agalactiae</i>	37
Figura No. 16	Porcentaje de las lesiones ulcerativas post infección	38
Figura No. 17:	Vinculación docente. Izq: Identificación de <i>S. agalactidae</i>	
	Der: Métodos hematológicos como herramienta de la acuicultura	55
Figura No. 18:	Proyecto de vinculación, finca acuícola productora de alevines	57

## INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1.	Tratamientos para la determinación de la LD <sub>50</sub> de <i>Streptococcus agalactiae</i>	20
Tabla No. 2	Ponderación de las lesiones dérmicas, ocasionadas por infección experimental de <i>S. agalactiae</i> vía IM, en la región dorsal de organismos de tilapia	22
Tabla No. 3	Tratamientos: Fase experimental I	25
Tabla No. 4	Tratamientos realizados prueba de activación del sistema inmunológico	28
Tabla No. 5	Resultados de la determinación de la LD <sub>50</sub> de la infección experimental con <i>S. galactiae</i>	33
Tabla No. 6	Resumen de los parámetros zoometricos	34
Tabla No. 7	Distribución de costos, calculo de la Tasa de retorno	39
Tabla No. 8	Bioquímica y Hematología FASE II	41

Aplicación de inmunoestimulantes de origen natural en el cultivo de tilapia para la prevención de Estreptococosis en Guatemala.

## 5. RESUMEN

La infección por *Streptococcus agalactiae* constituye una patología severa para el cultivo de tilapia a nivel mundial. Esta infección causa mortalidades y pérdidas económicas alrededor del mundo. La presente investigación evaluó el efecto del extracto etanólico de *Lippia graveolens* y el probiótico *Bacillus subtilis*, sobre el sistema inmunológico en *Oreochromis niloticus* frente a la infección experimental por *S. agalactiae*. Se evaluaron tres porcentajes de inclusión (0.5%, 1% y 2%) de *L. graveolens* y tres concentraciones bacterianas del probiótico *B. subtilis* ( $10^1$ ,  $10^3$  y  $10^5$  ufc/g de alimento), ambos incorporados al alimento. Los resultados reflejan que la inclusión del extracto etanólico de *L. graveolens* al 0.5%, y de probiótico *B. subtilis* a  $10^3$  ufc/g, funcionan como inmunoestimulantes ya que estas concentraciones permiten alcanzar sobrevivencias de 93% y 90%, respectivamente, en poblaciones de tilapia infectadas experimentalmente con *S. agalactiae*. En la evaluación de la bioquímica sanguínea, se determinó que la glucosa disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando se administra 0.5% de extracto etanólico de *L. graveolens* en el alimento. Esto sugiere que la respuesta de estrés es menor, debido a que la demanda de energía disminuye y reduce el desequilibrio fisiológico.

## 6. ABSTRACT

The *Streptococcus agalactiae* infection is a severe pathology for the worldwide tilapia culture. The infection cause mortality and economic loss around the world. This study evaluated the effect of *Lippia graveolens* ethanolic extract and the probiotic *Bacillus subtilis* to enhance the immune system of *Oreochromis niloticus* against *S. agalactiae* infection. Three treatments were evaluated with *L. graveolens* extract inclusion at (0.5%, 1%, 2%) and three treatments with *B. subtilis* ( $10^1$ ,  $10^3$  y  $10^5$  ufc/g of feed), both included in feed . The result showed that treatment with *L. graveolens* ethanolic extract at 0.5% and  $10^3$  ufc/g of *B. subtilis* can enhance the immunosystem, increasing the survival rate up to 93% and 90%, respectively, in tilapia culture experimental infected with *S. agalactiae*. The biochemical blood parameters show that the glucose reduce significantly ( $p < 0.05$ ) when *L. graveolens* was included at 0.5% in the feed. This suggests the stress is less therefore the energy demand reduce the physiological balance as well.



## 7. INTRODUCCION

Las infecciones por *Streptococcus* spp, constituyen una de las patologías más severas para el cultivo de tilapia a nivel mundial, causan mortalidades y pérdidas económicas (Eldar, Horivitez, & Bercovier, 1997). Los primeros reportes por infecciones del género *Streptococcus* comienzan en la década de los 50' en Japón, 90' en Israel y varios países de Europa. En el año 2000 se reporta para América (Hoshino, Sano, & Morimoto, 1958; Inglis, Roberts, & Bromage, 1993; Plumb, 1999; Plumb, Schachte, Gaines, Peltier & Carroll, 1974).

Durante los últimos ocho años se han reportado brotes por bacterias del género *Streptococcus* en 13 países de Latinoamérica (Sheehan, 2009), siendo la especie *Streptococcus agalactiae* (Lehmann & Neumann, 1896) la más común (Musa, Wei, Musa, Hamdan, & Leong, 2009; Suanyuk, Kanghear, Khongpradit, & Supamattaya, 2005; Wei, 2010). En Guatemala anualmente se alcanza mortalidades promedio de 20% a 30% en granjas infectadas con este patógeno; en casos extremos se llega a tener una mortalidad del 90% (Dirección General de Pesca y Acuicultura, Agosto 2010: Curso de Tilapia, Chiquimula. Situación Actual del recurso acuícola).

*S. agalactiae* es una de las especies bacterianas más frecuentes en cultivos de tilapia. Esta se asocia comúnmente a climas subtropicales y de agua dulce y marina (Evans et al., 2002). Puede llegar a causar enfermedades de origen crónico o agudo. Los signos clínicos crónicos están relacionados a lesiones cutáneas y musculares, letargia e inapetencia. Los signos clínicos agudos pueden ser letales en plazos cortos de tiempo, debido a la pérdida de fluidos, especialmente de la parte del tracto digestivo, mostrando siempre letargia, tendencia a estar en el fondo del estanque y reducción en la tasa alimenticia (Widanarni & Tanbiyaskur, 2015).

Para el control de *S. agalactiae* se han utilizado diversos antibióticos, siendo oxitetraciclina y florfenicol los indicados para dicha infecciones (Gaikowski, 2009), aunque estos ha causado un desbalance en la dinámica de los microorganismos que cohabitan en el estanque de cultivo (Gomez-Gil, Roque, & Turnbull, 2000). Por lo tanto, las terapias con antibióticos están siendo descartadas, como parte de tratamientos curativos y/o preventivos.

En la última década se ha incrementado la tendencia al uso de productos eco amigables para el remplazo de fármacos y químicos en la acuicultura (Lødemel, Mayhew, Myklebust, Olsen, Espelid, & Ringø, 2001; Ostrand, Glenn, Gannam, & Hanson, 2012; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn 2009; 2010; Zheng, Tan, Liu, Zhou, Xiang, & Wang, 2009).

Algunas de las terapias alternativas, utilizadas a nivel mundial son: fitoterapéuticos y probióticos, los cuales cumplen con funciones inmunológicas y antibacterianas a través de las estructuras celulares, como lo estructuras de polisacáridos, lípidos y glucanos (Kolkovski, 2011-2012) en el caso de los probióticos y compuestos fenólicos, polisacáridos, proteoglicanos y flavonoides (Harikrishnan, Balasundarm, & Heo, 2011) en el caso de las plantas medicinales.

En Guatemala el uso de medicina alternativa en la acuicultura es un tema nuevo, que ha ido tomando fuerza en los últimos años. Esto debido a que actualmente la acuicultura guatemalteca está afrontando serios problemas sanitarios, por la aparición de nuevas agentes bacterianos y agentes bacterianos resistentes a los antibióticos disponibles (Marroquín & García, 2014).

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de terapias alternativas para el control de enfermedades de origen bacteriano en sistemas de producción de tilapia, a través del efecto que causa la incorporación a la dieta de un extracto fluido etanólico de *Lippia graveolens* (Kunth) (orégano especie nativa en Guatemala) y *Bacillus subtilis* (Cohn 1872) (probiótico: bacteria ATCC), sobre el sistema inmunológico, para la prevención de la infección por *S. agalactiae* (Lehmann & Neumann, 1896).

## 8. MARCO TEÓRICO

### 8.1 *Estado actual de la acuicultura*

La acuicultura es la producción y crianza de plantas y animales acuáticos en todos los ambientes acuáticos, incluyendo estanques, ríos, lagos y océanos. Actualmente se cultivan alrededor de 310 especies de organismos acuícolas, excluyendo plantas acuáticas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). La producción mundial de productos acuícolas ha aumentado en las últimas cinco décadas, con un promedio anual de crecimiento de 3.2% (García, 2013). En el grupo de especies acuícola más cultivadas, se encuentran carpas seguido por tilapia (Bostock et al., 2010) posicionándose como especie cosmopolita a nivel mundial.

La producción de tilapia está ampliamente distribuida alrededor de América siendo Estados Unidos, México, Honduras, Nicaragua, Ecuador, Costa Rica, Brasil y Colombia los mayores productores (Wantanabe, Losordo, Fitzsimmons, & Hanley 2002). La producción de tilapia en América es menor a la de Asia, especialmente cuando se compara con China, el mayor productor a nivel mundial. La producción se ha ido intensificando, con una expansión rápida durante las últimas décadas, dando como resultado el desarrollo de nuevas especies de híbridos mono-sexo de tilapia y la tecnificación del cultivo. La producción de tilapia para los países de América fue de 200 TM en 1970, 526 TM en el 2000 y 434,696 TM en el 2011 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013b), siendo la tilapia la especie acuícola, después del camarón con mayor frecuencia en los países de América.

En Guatemala durante el año de 2001 la producción se incrementa de manera exponencial, sin embargo, no existen datos actualizados de las unidades de producción y del volumen de producción (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013a). Se estima que Guatemala produjo cerca de 5,500 TM en el 2001 y para el 2015 se estima que fue de 9,600 TM, lo cual es un incremento considerable para la industria acuícola guatemalteca.

### 8.2 *Enfermedades bacterianas en tilapia*

Las enfermedades en los peces, especialmente en el caso de peces de cultivo, provienen de una interacción entre el medio ambiente, agente etiológico y el estrés. El estrés provoca un desorden fisiológico, deprimiendo el sistema inmunológico, causando lesiones que son puerta de entrada para una gran diversidad de patógenos. También puede originar enfermedades de distintas etiologías, siendo las infecciones de mayor importancia a nivel nacional causadas por las bacterias Gram positivas.

### 8.2.1 *Streptococosis en tilapia*

El término estreptococosis es utilizado para describir enfermedades bacterianas originadas por bacterias del grupo Gram positivo incluyendo estreptococos, lactococcus y vibrios, los cuales pueden afectar a organismos acuáticos de agua dulce y marina (Zlotkin, Hershko, & Eldar, 1998). Las pérdidas a nivel mundial por estreptococosis son de alrededor de 150,000,000 USD anuales (Eldar et al., 1997). Existen diversas cepas bacterianas de estreptococos patógenas en tilapia. Las cepas bacterianas más comunes son: *S. inae*, *S. constantelos*, *S. uveris* y *S. agalatiade* entre otras (Plumb & Hanson, 2010). La expresión de la estreptococosis en tilapia surge a través de efectos de estrés como: deterioro de calidad, altas concentraciones de amonio, pH fluctuante, bajas concentraciones de oxígeno, altas densidades y depresión del sistema inmunológico. Dicha afección se convierte en uno de los brotes más serios en el cultivo de tilapia a nivel mundial (Park, 2009).

La sintomatología general externa que presentan los peces es: exoftalmia, hemorragias oculares, hemorragias en la base de las aletas, abdomen y ano. Algunos peces presentan ulceraciones en la superficie corporal, lo que se corresponde a daños musculares en las cuales se observa contenido líquido viscoso incoloro (Amal & Zamri-Saad, 2011). En casos crónicos la musculatura toma una coloración café. A nivel interno se observa esplenomegalia, renomegalia, hepatomegalia, bazo pálido, hemorragia perirenal y hepática, hidroperecardio, pericarditis, saculitis aérea, presencia de contenido líquido hemorrágico en la vejiga natatoria, ascitis y esclerotización muscular y granulomas en los órganos hematopoyéticos (Buller, 2004).

#### 8.2.1.1 *Diagnóstico de estreptococosis*

El diagnóstico presuntivo se basa en las lesiones generales ocasionados por microorganismos. En improntas de los tejidos hematopoyéticos teñidos con tinciones diferenciales se puede apreciar la estructura cocoide de las bacterias. Histológicamente cuando el patógeno llega a los centros de filtración como la meninges provoca menincefalomeningitis, perdiéndose la estructura cerebral de los organismos (Buller, 2004). Los métodos tradicionales de diagnóstico confirmatorio incluyen el cultivo microbiológico en agares selectivos y diferenciales y la identificación por PCR.

### 8.2.1.2 *Tratamiento para estreptococosis*

Algunos de los tratamientos más utilizados son: amoxicilina, eritromicina, oxitetraciclina y enrofloxacin. En los últimos años se ha observado un incremento de la resistencia bacteriana, *S. garvie* por ejemplo, es resistente a oxitetraciclina y eritromicina. Provocando así una sobredosificación para el control. Se han desarrollado vacunas, pero éstas están bajo control y desarrollo con lo cual no aseguran un control de dicha afección (Noga, 2000).

### 8.3 *Alternativas terapéuticas de origen vegetal*

Los extractos de plantas medicinales son mezclas complejas de numerosos compuestos obtenidos de diversas partes de plantas. Se caracterizan por tener una composición muy diversa, especialmente químicos como compuestos fenólicos, polisacáridos, proteoglicanos y flavonoides (Harikrishnan, Balasundaram, & Heo, 2011). Todos los metabolitos secundarios generalmente ejercen una función inmunológica, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, analgésica, anticancerígena, insecticida, anticoccidial y como promotores de crecimiento (Tipu, Pasha, & Alie, 2002).

#### 8.3.1 *Lippia graveolens (Kunth), nombre común orégano*

Es una planta de la familia Verbenaceae, nativa del sur de Estados Unidos, México, y América Central. Se conoce comúnmente como orégano, orégano silvestre y orégano mexicano. Con este nombre se conoce a más de 53 plantas de diferentes especies e incluso familias, que por sus aceites esenciales de aromas parecidos han sido usados indistintamente (Standley, Williams, & Gibson, 1970).

*L. graveolens* es reconocida por poseer múltiples propiedades medicinales, siendo ampliamente utilizada en la medicina tradicional (Pascual, Slowing, Carretero, Sanchez, & Villar, 2001). La planta crece en bosques secos y espinosos subtropicales, en forma de arbustos finos de hasta 3 m. Presenta hojas de 2-4 cm de largo. Las hojas aromáticas, secas o frescas, son utilizadas en América Central como saborizante de alimentos, a nivel farmacéutico e industrial (Standley et al., 1970).

En Guatemala la planta se encuentra en El Progreso, Chiquimula, Petén y Zacapa, hasta altitudes de 350 msnm. Las hojas de la planta son colectadas en época de floración en lugares de crecimiento silvestre y secadas a la sombra. La planta posee saponinas y taninos triterpenos (Cáceres, 1996).

Es un arbusto delgado de hasta 2 m de alto, presenta hojas en peciolos de 5-10 mm de largo, oblongas a elípticas de 2-4 cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, a veces agudas, redondeadas o subcordadas a la base, densamente pilosas, suaves al tacto, glandulares y densamente tomentosas o pilosas al envés. La composición fitoquímica del género *Lippia* demuestra que éste contiene: aceite esencial, glicósidos saponínicos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales. La corteza y la raíz contienen glicósidos saponínicos y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocembrina, naringenina) y lapachenol (Cáceres, 1996; Standley et al., 1970).

#### 8.4 *Alternativas terapéuticas de origen microbiano*

Los probióticos son agentes terapéuticos que alteran directa o indirectamente la composición de la comunidad microbiana en la que se encuentran. Muchas especies de bacterias son frecuentemente utilizadas como probióticos en la acuicultura. Los probióticos son una alternativa a la aplicación profiláctica de antibióticos y biocidas. Estas bacterias benéficas compiten con los patógenos bacterianos por nutrientes, inhibiendo de ese modo su crecimiento. Representan una opción viable para el tratamiento y control de enfermedades bacterianas. Las bacterias más utilizadas en la acuicultura han sido las del género *Bacillus*., *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y levaduras, estas cepas pueden ser utilizadas como mezclas o independientemente (Reneau, 2007; Son, Chang, Wu, Guu, Chiu, & Cheng, 2009; Wang, Li & Lin, 2008)

##### 8.4.1 *Género Bacillus*

Son bacterias Gram positivas y presentan catalasa positiva, *Bacillus subtilis* (Cohn 1872) pertenecen a este género. Su morfología general es de forma redonda de cadena larga; son aeróbicas, formadores de endoesporas, lo que les permite tolerar condiciones ambientales extremas. *B. subtilis* no es considerado patógeno; sin embargo puede contaminar alimentos, aunque raramente causan intoxicación alimenticia. Sus esporas pueden sobrevivir el calor extremo (Bergey, Krieg, & Holt, 1984; Wang, Li, & Lin, 2008).

*B. subtilis* son predominantemente aerobios, la presencia de oxígeno resulta en abundante crecimiento, con la formación de 2,3-butanodiol, acetoina y CO<sub>2</sub> (gas carbónico) como productos principales. En ambientes con reducción de oxígeno se puede evidenciar crecimiento y fermentación débil en medios que contengan glucosa.

Normalmente son cosmopolitas ampliamente distribuidos, que suelen encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, y materia vegetal en descomposición. Poseen un alto poder de adaptación a diversos ambientes mediante la formación de endosporas; estructuras resistentes frente a la falta de nutrientes y situaciones adversas (Bergey, Krieg, & Holt, 1984).

#### 8.5 *Sistema inmunológico en peces óseos*

La función esencial del sistema inmune en peces óseos es la defensa contra patógenos bacterianos, parasitarios, fúngicos y víricos. Los peces presentan una respuesta inmunológica bien desarrollada e integrada, similar en muchos casos a la de los mamíferos.

El sistema inmunológico de los peces tiene dos componentes: innato y adquirido, ambos poseen una parte humoral y una celular. La capacidad del sistema inmune puede variar de acuerdo a factores como: edad, sexo, alimentación y ambiente, entre otros (Olabuenaga, 2000).

##### 8.5.1 *Sistema inmunológico*

La piel de los peces constituye la primera línea de defensa contra patógenos, siendo de las más importantes las membranas mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal. Además de las escamas, el mucus que recubre la piel es un importante mecanismo de defensa, pues contiene una variedad de compuestos antimicrobianos y antiparasíticos como: lisozimas y proteasas, factores del complemento, proteína reactiva C, lectinas, interferones, eicosanoides, transferrina, péptidos como piscidinas, somatostatina y ACTH, y diversos carbohidratos (Fletcher, 1981)

##### 8.5.1.1 *Células y complejos celulares inmunocompetentes*

Las células involucradas en el sistema inmune son los leucocitos o glóbulos blancos, su clasificación se basa en sus características morfológicas: linfocitos, granulocitos y monocitos o macrófagos (Ellis, 1977). La cantidad de leucocitos totales circulantes en sangre es muy variable dependiendo de las especies y de las condiciones fisiológicas.

- **Linfocitos**

Los linfocitos son células altamente diferenciadas con capacidad de respuesta frente a los estímulos inmunológicos (Ellis, 1977). Morfológicamente se han clasificado en varios grupos dependiendo del tamaño. En general, los linfocitos maduros, que son los mayoritarios, son células pequeñas, de borde irregular, cuyo interior está casi en su totalidad ocupado por un núcleo con la cromatina muy agrupada.

A nivel funcional, son los responsables de la respuesta inmune específica humoral y celular, que se traduce en la producción de anticuerpos, la capacidad citolítica, el proceso de memoria inmunológica y la liberación de factores reguladores de la función inmune, como las linfocinas (Campbell & Murru, 1990; Yoshinaga, Okamoto, Kurata, & Ikeda, 1994).

- **Granulocitos**

Se caracterizan por la presencia de gránulos en su citoplasma. En peces teleósteos, se han descrito los tres tipos celulares por su morfología, pero no siempre están presentes y no son comparables funcionalmente con sus análogos de mamíferos (Olabuenaga, 2000):

- **Neutrófilos**

Estas células denominadas también heterófilos, polimorfonucleares (PMNs) o simplemente granulocitos, se caracterizan morfológicamente por un núcleo excéntrico multilobulado (dos o tres lóbulos), con la cromatina densa y agrupada que se tiñe púrpura oscuro con tinción de Giemsa o Wright. Entre las principales funciones de los neutrófilos se encuentran la fagocitosis (O'Neill, 1985; Olabuenaga, 2000), y la actividad microbicida mediada por el proceso denominado explosión respiratoria, que consiste en la capacidad de convertir el oxígeno molecular en una serie de compuestos o metabolitos de oxígeno (ROS), entre ellos el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), potentes microbicidas capaces de dañar moléculas orgánicas (Plyzycz, Galvan, & Bayne, 1989).

- **Eosinófilos**

Se han descrito como células redondas que presentan un núcleo a menudo bilobulado y excéntrico, y un citoplasma azul pálido con gránulos de forma alargada o esférica, que se tiñen con colorantes ácidos en medio alcalino (Campbell, 1988). Se ha denominado a todos los eosinófilos de teleósteos como HGEs (eosinófilos granulares homogéneos, del inglés Homogeneous Granule Eosinophils).



Esta morfología coincide con la de los eosinófilos de mamíferos, sin embargo, no ha podido demostrarse una analogía similar respecto a sus funciones (Hine, 1992).

- **Basófilos**

Se describen como células con citoplasma ligeramente basófilo y grandes gránulos redondeados que a menudo ocultan el núcleo y que recuerdan a los basófilos y mastocitos de mamíferos. Sin embargo, se conoce muy poco de ellos y según estudios ultra estructurales y citoquímicos se pueden confundir con eosinófilos y no se pueden hacer analogías con las células de mamíferos. Se les considera ausentes en la circulación de la mayoría de especies salmónidas (Campbell & Murru, 1990; Ellis, 1977; Hine, 1992).

- **Monocitos/Macrófagos**

La morfología de estas células recuerda a los monocitos de los mamíferos (Ellis, 1977), pero la identificación de estas células por parte de los investigadores como monocitos, macrófagos o células transicionales en sangre, ha hecho que se utilice indistintamente el término monocito o macrófago, mientras que siempre se habla de macrófagos cuando se localizan en tejidos (Campbell, 1988).

Los monocitos/macrófagos son grandes leucocitos con citoplasma azul-gris o azul brillante con tinción Giemsa, y ocasionalmente vacuolado, en el que puede observarse pseudopodia. El núcleo ocupa entre un medio y un tercio del volumen celular y su forma es variable, redonda u ovalada, a menudo con una ligera invaginación, o con forma de riñón.

Los macrófagos constituyen la principal célula fagocítica en los peces, por su capacidad de ingerir y digerir material extraño, inerte o antigénico, así como restos celulares resultantes de la respuesta inflamatoria u otros procesos degenerativos (Agius, 1985; MacArthur & Fletcher, 1985).

## 9. METODOLOGÍA

Para determinar el efecto del extracto etanólico de punto súper crítico de *Lippia graveolens* (Kunth) y el probiótico ATCC 6051 *Bacillus subtilis* (Cohn, 1972), sobre el sistema inmunológico en *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), la presente investigación se dividió en dos fase: En la fase I "Condiciones controladas", se determino la concentración de extracto *L. graveolens* y *B. subtilis* que permiten resistir la infección de *Streptococcus agalactiae* (Lehmann & Neumann, 1896). También se determino si esta concentración tienen efecto sobre el crecimientos de los organismos evaluados. Esta fase se realizó en el Laboratorio de Investigación Aplicada, controlando todas las condiciones del cultivo. Al finalizar esta fase se realizó el análisis económico de viabilidad para incorporación de los inmunoestimulantes en los sistemas de producción, utilizando como parámetro de evaluación la tasa de retorno porcentual por cada uno de los tratamientos evaluados.

En la fase II "Condiciones semi-controladas" se evaluó el extracto de *L. graveolens* que este presento mejor resultados en la fase I. En esta etapa se evaluó el efecto del extracto sobre el sistema inmunológico. Esta fase se desarrollo en la Estación Experimental de Monterrio (Cema/Usac), simulando las condiciones normales de un cultivo de tilapia de la Costa Sur de Guatemala. Para determinar el efecto sobre el sistema inmunológico, se evaluaron parametrsos de hematología y bioquímica sanguínea, como indicadores de inmunocompetencia.

### 9.1 Fase I condiciones controladas

#### 9.1.1 Aislamiento bacteriano cepa *Streptococcus agalactiae*

El aislamiento bacteriano se realizó en el mes abril 2015, en una granja de producción de tilapia de engorde, con posible brote de estreptococosis. Se evaluaron 30 juveniles sub-adultos con peso promedio de  $400 \pm 50$  g. Todos los organismos fueron evaluados macroscópicamente de acuerdo al protocolo sanitario del Laboratorio de Sanidad Acuicola (2014).

El aislamiento y tipificación de las bacterias patógenas, se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Buller (2004). En resumen, se tomaron muestras bacteriológicas de los órganos indicadores de salud: riñón anterior, bazo, meninges e hígado. Conjuntamente se tomaron muestras de sangre, úlceras y áreas hemorrágicas (Figura 1).

Las muestras fueron sembradas inicialmente en tripticasa soya agar (TSA) suplementado con sangre de carnero al 5%, y transportadas al Laboratorio de Sanidad Acuícola (LSA), para ser incubadas por un período de 48 a 72 horas a 30°C (Figura 1). Posterior a ello se tomó las dos colonias predominantes y fueron resembradas en agar brain heart infusion (BHI: por sus siglas en inglés), este procedimiento se repitió hasta conseguir que las colonias fueran puras.

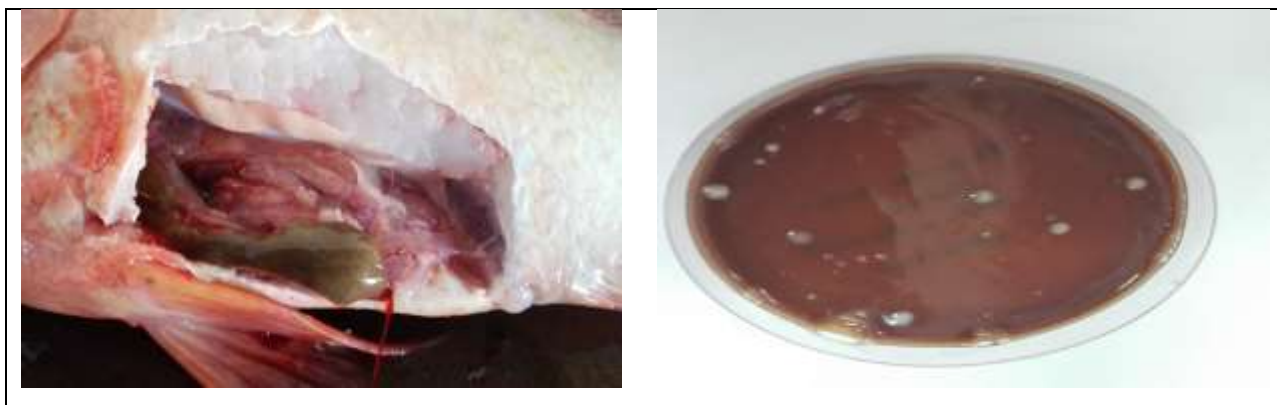


Figura No. 1: aislamiento de las bacterias patógenas colectadas en abril 2015.

Posteriormente, se realizó la tipificación bacteriana a través las pruebas de tinción de Gram, pruebas de oxidasa, determinación de capacidad de hemólisis, prueba de reacción KOH, siembra en agares selectivos y prueba de identificación a través de Microgen® Strep y Microgen® A+B, para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las cepas bacterianas identificadas fueron conservadas en agar TSA + 5% de sangre de carnero a 4°C como cepas puras y fueron resembradas cada 15 días en el mismo tipo de agar.

#### 9.1.2 *Determinación de la LD<sub>50</sub> para Streptococcus agalactiae*

Para el cálculo de la LD<sub>50</sub> se utilizó dos vías de administración; peritoneal (IP) e intramuscular (IM), esto debido a que las evaluaciones preliminares con la bacteria aislada es de baja patogenicidad. Se evaluaron las dos vías de infección conjuntamente para expresar la enfermedad en un período de diez días, hasta causar el 50% de mortalidad en *O. niloticus*.

Se utilizaron 90 peces *O. niloticus* ( $17 \pm 4.5$  g), divididos en nueve tratamientos. Se consideró como replica a cada uno de los organismos evaluados. El experimento fue realizado en acuarios de 30 L.

Las condiciones ambientales para cada uno de los acuarios fueron: aireación constante, temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  y oxígeno disuelto de  $3 \pm 1$  mg/L, sin alimentación ni recambio de agua por un período de diez días. La suspensión bacteriana para la infección, fue tomada de un cultivo microbiológico fresco ( $< 24$  h). La suspensión bacteriana se ajustó a una concentración que equivale a un rango de absorbancia de 0.950 - 1050, a una longitud de onda de 600 nm, la cual equivale a una concentración de  $2.3 \times 10^9$  ufc/mL, posterior a ello se realizaron diluciones seriadas dobles de  $10^8$  a  $10^1$  ufc/mL. Los tratamientos evaluados se muestra en la tabla 1.

Todos los organismos evaluados se mantuvieron sin alimentación por 24 h, previo al experimento. La bacteria de *S. agalactiae* fue inyectada en la cavidad peritoneal (vía IP) a una relación de 50  $\mu\text{l/g}$  de peso (Figura 2). Al mismo tiempo se inyectó en la parte muscular dorsal de los organismos (vía IM) a la misma relación y concentración que la vía IP, con la finalidad de provocar úlceras dérmicas en la parte dorsal de la estructura muscular. Para el tratamiento control se inyectó en ambas vías solución salina 0.85% en la misma relación que las demás vías de infección.

Tabla 1.

*Tratamientos para la determinación de la LD<sub>50</sub> de Streptococcus agalactiae*

Tratamiento ID	Dosis bacteriana
Tratamiento 1:	Dosis $10^8$ UFC/g
Tratamiento 2:	Dosis $10^7$ UFC/g
Tratamiento 3:	Dosis $10^6$ UFC/g
Tratamiento 4:	Dosis $10^5$ UFC/g
Tratamiento 5:	Dosis $10^4$ UFC/g
Tratamiento 6:	Dosis $10^3$ UFC/g
Tratamiento 7:	Dosis $10^2$ UFC/g
Tratamiento 8:	Dosis $10^1$ UFC/g
Tratamiento 9:	Control

Nota: UFC: unidades formadoras de colonia



Figura 2: Infección experimental de juveniles de tilapia usando vía IP con *Streptococcus agalactiae*







El experimento duró diez días. Diariamente se registró la mortalidad y se tomaron fotos de las lesiones ulcerativas en el área dorsal. Todo los peces muertos se retiraban de los acuarios. Los organismos moribundos se colectaron y se tomaron muestras microbiológicas, sembraron en agar TSA + 5% de sangre de ternero, para tratar de re aislar la bacteria *S. agalactiae*, confirmando así la causa de la signología observada.

Para determinar el grado de severidad de las lesiones dérmicas ocasionadas por la inoculación intramuscular (IM) de la bacteria *S. agalactiae*, se utilizó la siguiente tabal de evaluación (Tabla 2): úlcera tipo S; corresponde a una lesión pequeña, con o sin pérdida de escamas, signos de inflamación, lesión no profunda, con inicios hemorrágicos. Úlcera de tipo M; corresponde a una lesión dérmica poco profunda, pérdida de epitelio cuticular, hemorrágica o no hemorrágica, presencia moderada de exudado y de tamaño menor a un centímetro. Y finalmente úlcera de tipo L; corresponde a una úlcera dérmica profunda, hemorrágica, pérdida de epitelio cuticular y muscular, perdida de tejido cuticular periférico, daños visibles a nivel óseo.

Para determinar la LD<sub>50</sub> se utilizó un regresión lineal de los datos obtenidos en el experimento concentración bacteria vs mortalidad alcanzada, en el programa StatPlus

Tabla 2:

*Ponderación de las lesiones dérmicas, ocasionadas por infección experimental de S. agalactiae vía IM, en la región dorsal de organismos de tilapia*

Tipo de Ulcera	Fotografía grado I	Fotografía grado II
Tipo S		
Ulcera tipo M		
Ulcera tipo L		

### 9.1.3 *Aclimatación y acondicionamiento de organismos*

Se utilizaron alevines de tilapia *O. niloticus* con peso inicial de  $1 \pm 0.1$  g, obtenidos en el Centro de Producción Acuícola María Linda, ubicado en el Departamento de Escuintla. Los peces fueron transportados al Laboratorio de Sanidad Acuícola en bolsas plásticas de 25 lb, llenadas con oxígeno puro y agua a una relación 70 : 30.

Los peces fueron aclimatados durante dos semanas. Posterior a ello se colocaron en un sistema de recirculación de agua, hasta alcanzar un peso promedio de 11 g. Todos los organismos fueron alimentados de acuerdo al peso promedio y biomasa dentro del sistema. La ración alimenticia fue dividida en cuatro raciones y ajustada semanalmente de acuerdo al crecimiento de los organismos.

### 9.1.4 *Preparación de las dietas experimentales*

Las dietas experimentales fueron preparadas en el Laboratorio de Sanidad Acuícola, utilizando concentrado de tilapia 38% PC (proteína cruda) de marca comercial. Se utilizó la inclusión de el extracto etanólico de *L. graveolens* proporcionado por el Centro Universitario del Oriente (Cunori), de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Usac) en mayo del año 2015. El extracto de *L. graveolens* fue tipificado y extraído a través de la metodología extracción de fluido supercrítico utilizando CO<sub>2</sub> como solvente y etanol 95% (ETOH 95%) como cosolvente, descrita por Rodas, García, Salomón y Nufio, (2015). El extracto fue concentrado hasta alcanzar una concentración de 25,000 ppm de Thymol, almacenado en un recipiente oscuro de plástico a temperatura ambiente de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

El extracto fue incorporado a ración de: 0.5%, 1% y 2% del alimento balanceado. Para la incorporación del extracto de orégano se utilizó alcohol 95% como medio de incorporación, a una relación de 200  $\mu\text{l/g}$  (de alimento). El extracto fue rociado lentamente de manera uniforme y homogenizado de forma manual. Posteriormente se secó por 24 h a 30°C, y se empacó en contenedores herméticos de plástico, identificados según el porcentaje de inclusión del extracto (Figura 3).



*Figura 3:* Preparación de las dietas experimentales (Izq: Laboratorio / Der: Finca)

Para la inclusión de *B. subtilis*, se utilizó la bacteria ATCC 6051, proporcionada por Agrobiotek Ltda. *B. subtilis* fue incorporado al alimento balanceado de tilapia, a concentraciones bacterianas de  $10^1$ ,  $10^3$  y  $10^5$  ufc/g de alimento. Para su incorporación se utilizó una suspensión del pellet bacteriano ajustado a la densidad bacteriana necesaria. La suspensión fue realizada con solución salina estéril 0.85%. El procedimiento de incorporación fue rociando con bomba manual de manera uniforme sobre el concentrado, asegurándose de alcanzar la dosis correcta por gramo de alimento. Se secó del concentrado por 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$ , y empacó en contenedores herméticos de plástico debidamente identificados. A la dieta utilizada como control, se incorporo solución salina estéril 0.85% siguiendo el procedimiento antes descrito.

#### 9.1.5 *Diseño experimental para la fase I*

Se utilizó un total de 315 juveniles de tilapia ( $11 \pm 0.2$  g) en un sistema de acuarios de 60 L, alimentados con las dietas experimentales antes descritas, durante un período de 30 días. Los peces fueron divididos en siete tratamientos con tres replicas cada uno, tal como se muestra en la tabla 3, y en la figura 4:



Tabla 3:

*Tratamientos: Fase experimental I.*

ID tratamiento	%
Tratamiento ORG 0.5%:	Orégano 0.5%
Tratamiento ORG 1.0%:	Orégano 1.0%
Tratamiento ORG 2.0%:	Orégano 2.0%
Tratamiento BACX10 <sup>1</sup> :	Probiótico 10 <sup>1</sup> ufc/g
Tratamiento BACX10 <sup>3</sup> :	Probiótico 10 <sup>3</sup> ufc/g
Tratamiento BACX10 <sup>5</sup> :	Probiótico 10 <sup>5</sup> ufc/g
Tratamiento CONTROL:	Control

Nota: UFC: unidades formadoras de colonia



*Figura 4: Tratamientos con orégano y probiótico*

Para determinar la evolución en el crecimiento de los organismos en los tratamientos, se evaluaron parámetros zootécnicos a cada diez días. Los parámetros utilizados fueron los descritos por Zheng, Tan, Liu, Zhou, Xiang, & Wang, (2009) siendo estos:

- a) Ganancia de peso (WG%) =  $100 \times (\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Peso inicial}$
- b) Tasa de crecimiento específico (SGR) =  $100 \times \ln(\text{Peso final} / \text{Peso inicial}) / \text{Días en experimento}$
- c) Factor de conversión alimenticia (FCA) =  $\text{Alimento consumido (g)} / \text{ganancia de peso.}$

Se realizaron recambios de agua del 30% del volumen total del acuario cada tres días, esto con la finalidad de mantener la calidad de agua sin fluctuaciones que pudieran ocasionar estrés en los organismos. Se tomaron muestras de calidad de agua previo a realizar el recambio de agua de los acuarios. Evaluaron parámetros físico y químicos de agua.

En la parte química se evaluó amonio total, nitritos, y nitratos, a través de espectrofotometría con kits de marca comercial Merck Spectroquan NOVA 60. La parte física se evaluó a través de una sonda multiparametria (YSI:85), incluyendo; oxígeno disuelto, pH, conductividad y turbidez.

#### 9.1.6 *Desafío a la infección de Streptococcus agalactiae*

Al finalizar el experimento de treinta días con las dietas experimentales, se realizó un desafío de resistencia a la bacteria *S. agalactiae*. La preparación de inóculo bacteriano se hizo en caldo tripticasa soya (TSB), cultivada por 36 h a 30°C. El pellet bacteriano fue obtenido por centrifugación a 12,000 rpm por 5 min. Se descartó el sobre nadante y se lavó el pellet bacteriano con solución salina 0.85%, este procedimiento se repitió tres veces, con el fin de remover productos extracelulares. La solución bacteriana se ajustó su densidad celular de acuerdo a lo obtenido en el experimento de determinación de la LD<sub>50</sub>, anteriormente descrito.

Todos los organismos fueron inyectados vía IP y IM, con la solución bacteriana de *S. agalactiae* a una relación de 50 µl/g, ajustada la densidad bacteriana según el experimento de determinación de la LD<sub>50</sub>. El período de evaluación fue de diez días post infección. La mortalidad fue registrada todos los días y se registró el tipo de úlcera ocasionada por la infección vía IM (Tipo S, M o L). Durante el desafío de resistencia bacteriana, todos los tratamientos se dejaron de alimentar y se detuvieron los recambios de agua.

### 9.1.7 *Análisis de Factores Económicos*

Se realizó un análisis de los factores económicos, para determinar la viabilidad de la incorporación de los agentes naturales a las dietas propuestas. El parámetro evaluado fue el propuesto por Morales (2009), quien utilizó la tasa marginal de retorno (MRR) como indicador de viabilidad.

Para dicho cálculo se listaron los costos variables más importantes de la producción de tilapia. Se asumió un rendimiento final de 100 lb por cada ciclo. Se asumió que el ciclo tarda en promedio cinco meses, para ser comercializado. Para el cálculo de MRR, se asumió que hubo mortalidad hasta la última etapa de producción, previo a la comercialización, esto debido a que en la etapa final de comercialización los organismos se vuelven más susceptibles a la infección por *S. agalactiae*.

La simulación del rendimiento productivo se logró utilizando valores de mortalidad y factor de conversión alimenticia, obtenidas en el experimento, precio del concentrado y semilla fueron los precios actuales del mercado, así como el precio promedio de venta de organismos adultos de tilapia. Finalmente se incluyó el costo que se incurre al adicionar los agentes naturales a las dietas comerciales.

### 9.2 *Fase II condiciones semi-controladas*

Se analizaron los datos obtenidos en la fase I, determinando que la inclusión de orégano 0.5%, fue el tratamiento que presentó mejores resultados en: resistencia a la enfermedad, parámetros zootécnicos y análisis económico. Se utilizó un total de 240 juveniles de tilapia ( $50 \pm 5$  g) en estanque rectangulares de  $12 \text{ m}^3$  (Figura 5).



Figura 5: Infraestructura de la Fase II condiciones semi-controladas

Los peces fueron alimentados durante un periodo de 30 días, y divididos en 2 tratamientos. Las replicas correspondieron a cada organismo en el estanque. Los tratamientos se detallan en la tabla 4:

Tabla 4:

*Tratamientos utilizados en la prueba de activación del sistema inmunológico.*

ID Tratamiento	Composición
Tratamiento A:	Orégano 0.5%
Tratamiento B:	Control

Nota: Control: es el tratamiento sin incorporación de extracto, simulando las condiciones normales de alimentación de un cultivo de tilapia, nivel proteico del 32% proteína cruda.

### 9.2.1 *Hematología y bioquímica sanguínea*

Se analizó la hematología y bioquímica sanguínea de las tilapias adultas en cultivo. Se extrajo 300 µl de sangre por punción bajo la línea lateral, cerca del pedúnculo caudal, para evaluar glicemia, proteína total y leucograma (Figura 6).



*Figura 6:* Extracción de sangre

### 9.2.1.1 *Hematocrito*

Se utilizó la metodología de Ballx, (1969), llenando los capilares heparinizados hasta 3/4 partes de su longitud total y se centrifugo a 12,000 rpm por 5 min. (Figura 7). El calculo del hematocrito fue a través de la relación porcentual entre el total del fluido sanguíneo y la fracción de eritrocitos vista.



Figura 7: Tubos heparinizados con sangre después de 12,000 rpm

### 9.2.1.2 *Proteína y glucosa total en plasma*

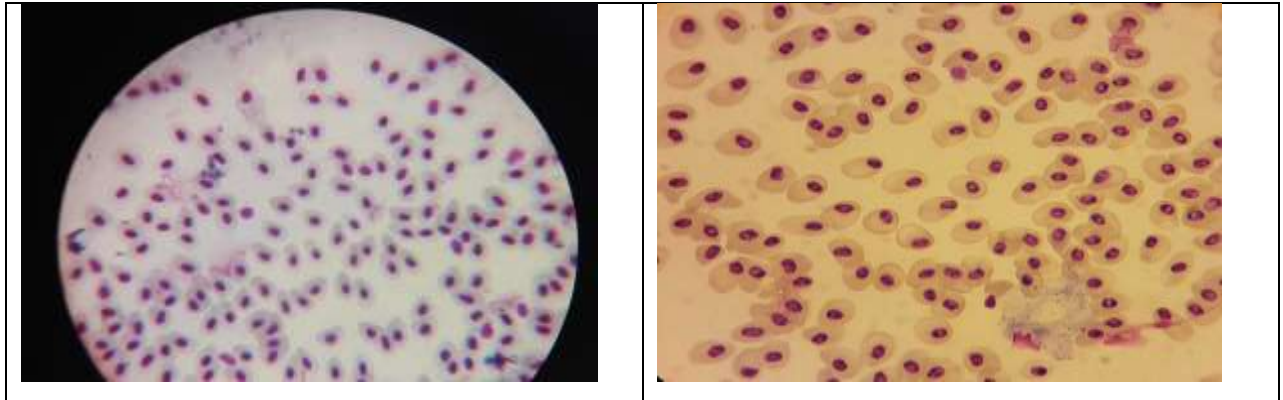
Se utilizó la metodología de Houston y Wilde (1969), a través de gravimetría y con ayuda de kits de detección de proteína total y glucosa en plasma (Wiener Lab. 169009 y 4574/97) (Figura 8).



Figura 8: Kits comerciales para determinar proteína total y glucosa total en plasma.

### 9.2.1.3 *Leucograma*

Se utilizó una modificación de la metodología de Blaxhall y Daisley (1973), en la cual se usa un frotis de sangre teñidos con Giemsa. Se realizó un recuento total de 1000 células describiendo el porcentaje relativo y haciendo la diferenciación de las células leucocitarias a través de microscopia de luz con objeto de 100X, con ayuda de un microscopio Nikon G593 (Figura 9).



*Figura 9: Recuento diferencial de eritrocitos y leucocitos*

### 9.3 *Análisis estadístico*

Los resultados se analizaron con análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.05$ ), para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos y se utilizó una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), para las variables: peso inicial ( $W_0$ ), peso final ( $W_f$ ), ganancia de peso (WG), tasa de crecimiento específico (SGR), factor de conversión alimenticia (FCR), glicemia, proteína. Se utilizó una prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ) para la variable de mortalidad. Los análisis fueron realizados en el programa estadístico MINITAB 17.1

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Fase I condiciones controladas

#### 10.1.1 Aislamiento de la cepa bacteriana

Durante la evaluación macroscópica de los organismos se presentaron los siguientes signos clínicos: exoftalmia uni y/o bilateral, cataratas unilaterales, ruptura de aletas, úlceras dérmicas, hemorragia multifocal, esplenomegalia, hipertrofia hepática, pericarditis y esclerotizacion de la parte dorsal del músculo (Figura 10).



Figura 10: Signología de *Streptococcus agalactiae*

De las muestras bacteriológicas colectadas (órganos hematopoyéticos), se identificó una cepa bacteriana del genero *Streptococcus*, perteneciente al grupo de bacterias Gram positivas. La cepa aislada no presentó evidencia de hemolisis, actividad negativa para prueba de lactosa y oxidasa; y actividad positiva para la pruebas de KOH.

De acuerdo a la tipificación bacteriana se obtuvo un 99.32% de probabilidad de ser *Streptococcus agalactiae* (Figura 11). Conjuntamente se pudo aislar diversas especies de *Aeromonas*, las cuales se clasifican como agentes bacterianos secundarios, que podrían asociarse a la infección de *S. agalactiae*. Entre las especies más frecuentes se encuentran *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii*.

<b>Identification Analysis</b>					
	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. porcinus</i>	<i>G. haemolysans</i>	<i>S. anginosus/ intermedius</i>	<i>S. constellatus</i>
<b>Select ID Choice</b>	Yes	No	No	No	No
<b>Probability</b>	1/31,981	1/10,486,022	1/18,803,662	1/25,228,177	1/43,507,573
<b>Percent Probability</b>	99.32%	0.3%	0.17%	0.13%	0.07%
<b>Likelihood</b>	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
<b>Human Isolate</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Tests against</b>					
<b>Test 1</b>	RIB (99%)	RIB (99%)	HIP (0.1%)	HIP (0.1%)	HIP (0.1%)
<b>Test 2</b>	BHE (98%)	ESC (99%)	ARG (0.1%)	ESC (99.9%)	ESC (99.9%)
<b>Test 3</b>		BHE (95%)	PYR (81%)	LAC (85%)	BHE (80%)
<b>Additional Tests</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Acid from Glycerol</b>	10%	84%	0.1%	0.1%	0.1%
<b>Acid from Trehalose</b>	99.9%	98%	0.1%	96%	99%
<b>Acid from Mannitol</b>	7%	98%	12%	28%	5%
<b>Esculin + 6.5% NaCl</b>	30%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
<b>Colony Pigmentation</b>	25%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
<b>Additional Comments</b>				6	6
	6 <i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> and <i>S. intermedius</i> belong to the Anginosus group				

Figura 11: Tipificación bacteriana en Microgen Strep®

### 10.1.2 Determinación de la LD<sub>50</sub> para *Streptococcus agalactiae*

El efectos de la bacteria *S. agalactiae* aislada del brote en abril 2015, variación de acuerdo a la concentración bacteriana suministrada. En cuanto la dosis bacteriana (ufc/mL) aumentó, se pudo observar una mayor patogenicidad, representándose en mayor mortalidad y mayores daños a nivel dérmico. El tratamiento T9 (control) y los tratamientos de T1 – T6 ufc/mL, no presentaron mortalidad durante los diez días de evaluación, aunque se si pudo observar lesiones ulcerativas pequeñas (Tipo S). La mortalidad y úlceras dérmicas tipo M y L, se presentaron en los tratamientos T7 y T8, cuatro días post infección. La concentración 10<sup>7</sup> ufc/mL induce a los signos clínicos de enfermedad, pero no es una dosis letal para los organismos evaluados, durante un período de diez días.



La concentración  $10^8$  ufc/mL posee una letalidad de 40%, 10 días post infección, y todos los organismos evaluados úlceras a nivel dérmico, tipo S, M y L. (Tabla 5).

Tabla 5:

*Resultados de la determinación de la LD50 de la infección experimental con S. galactiae.*

ID	Concentración bacteriana ufc/mL	Numero peces (1D)	Numero peces (10D)	Número de peces con úlceras Tipo S	Número de peces con úlceras Tipo M	Número de peces con úlceras Tipo L	% Mortalidad acumulada
T1	$10^1$	10	10	0	0	0	0
T2	$10^2$	10	10	0	0	0	0
T3	$10^3$	10	10	0	0	0	0
T4	$10^4$	10	10	2	0	0	0
T5	$10^5$	10	10	2	0	0	0
T6	$10^6$	10	10	1	0	0	0
T7	$10^7$	10	3	3	4	2	30%
T8	$10^8$	10	4	1	3	6	40%
T9	Control	10	10	0	0	0	0%

Nota: úlcera tipo: (S) pequeña, (M) mediana y (L) grande. 1D: día uno, 10D: día diez. También se muestra la frecuencia ulcerativa, la ponderación utilizada es de acuerdo a la propuesta en la tabla 2.

La mortalidad inició a los 4 días post infección para los tratamientos T7 y T8. Los primeros signos clínicos observados durante el período de infección fueron oscurecimiento de piel, exceso de mucus y movimientos respiratorios acelerados. Mientras que los signos clínicos como erosión de las aletas pectorales, pérdida de escamas e inicio de las úlceras dérmicas fueron observados dos días post infección (Figura 12).



Figura 12: Signología más frecuente en los primeros días de infección.

### 10.1.3 Evaluación de los tratamientos con inclusión de orégano y probiótico

Durante la evaluación se obtuvo una sobrevivencia del 100% en los tratamientos evaluados con orégano, 95% para los tratamientos de con probióticos y el control. Los resultados de crecimiento, ganancia de peso y conversión alimenticia se resumen en la Tabla 6:

Tabla 6:

#### Resumen de los parámetros zométricos

Tratamiento	Wo (g)	Wf (g)	WG (%)	SGR (g/d)	FCA
ORG <sub>0.5%</sub>	10.83± 0.31 <sup>a</sup>	19.10±1.07 <sup>a</sup>	76.45 <sup>a</sup>	7.05 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>
ORG <sub>1%</sub>	11.45±1.00 <sup>a</sup>	20.34±1.99 <sup>a</sup>	77.67 <sup>a</sup>	7.28 <sup>a</sup>	1.53 <sup>b</sup>
ORG <sub>2%</sub>	10.69±0.33 <sup>a</sup>	19.42±0.92 <sup>a</sup>	81.71 <sup>a</sup>	7.22 <sup>a</sup>	1.13 <sup>c</sup>
BAC <sub>10x1</sub>	10.93±0.17 <sup>a</sup>	20.20±4.58 <sup>a</sup>	84.81 <sup>a</sup>	7.42 <sup>a</sup>	1.82 <sup>d</sup>
BAC <sub>10x3</sub>	11.04±0.33 <sup>a</sup>	19.37±0.53 <sup>a</sup>	75.50 <sup>a</sup>	7.07 <sup>a</sup>	1.51 <sup>e</sup>
BAC <sub>10x5</sub>	11.02±0.06 <sup>a</sup>	20.95±2.37 <sup>a</sup>	90.18 <sup>a</sup>	7.65 <sup>a</sup>	1.46 <sup>f</sup>
CONTROL	11.01± 0.01 <sup>a</sup>	18.85±0.77 <sup>a</sup>	71.21 <sup>a</sup>	6.86 <sup>a</sup>	1.85 <sup>g</sup>

Nota: ORG: Tratamiento de orégano, BAC: Tratamiento de probiótico. Wo: peso inicial, Wf: peso final, WG%: porcentaje de ganancia de peso, SGR: Tasa de crecimiento específico, FCA: factor de conversión alimenticia. Los datos están expresados en media ± desviación estándar, los grupos con diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ), están indicados con superíndices

El peso ganado en todos los tratamientos fue ligeramente mayor que el control, aunque no presentó diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ). El crecimiento reportado fue lineal, al igual que el incremento en la biomasa (Figura 13).

Se puede observar un incremento mayor durante los primeros quince días de cultivo, posterior a ello se reduce, pero se sigue manteniéndose constante para todos los tratamientos. Todos los tratamientos mostraron una reducción en el factor de conversión alimenticia con respecto al control. Este fue el único parámetro que obtuvo una diferencia significativa ( $p \leq 0.01$ ).

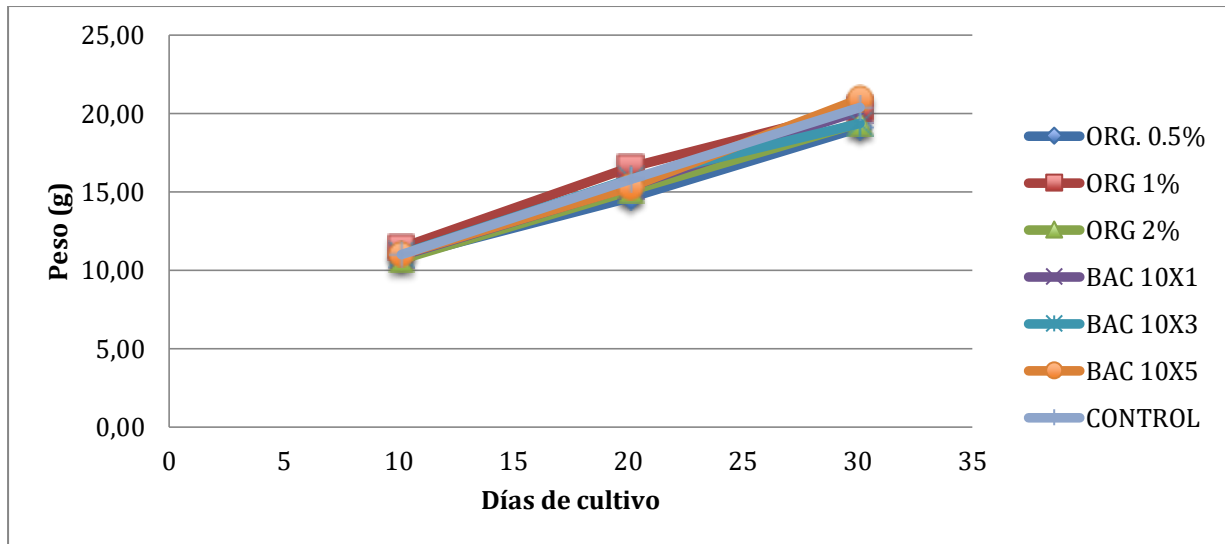


Figura 13: Grafica del crecimiento en condiciones controladas.

#### 10.1.4 Calidad de agua

Los valores de calidad de agua obtenidos durante el experimento se muestran en la Figura 14. El grupo de parámetros correspondientes a compuestos nitrogenados presentan un incremento con respecto al inicio, aunque los valores se encuentran dentro de los rangos tolerables, dicho efecto se evidencia en todos los tratamientos. Cabe resaltar que los compuestos nitrogenados se encuentran ligeramente bajos, en los tratamientos con probióticos, con respecto a los demás tratamientos, especialmente el parámetro de  $\text{NH}_4$ .

En los tratamientos con orégano (0.5%, 1% y 2%), se pudo observar una tendencia de incremento de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , mayor respecto al control principalmente. De acuerdo a los parámetros de calidad de agua físicos se puede observar que los niveles de oxígeno, temperatura, pH y total de sólidos disueltos, se mantuvieron estables durante el tiempo de evaluación. A pesar que el oxígeno se encontró como sub-óptimo.

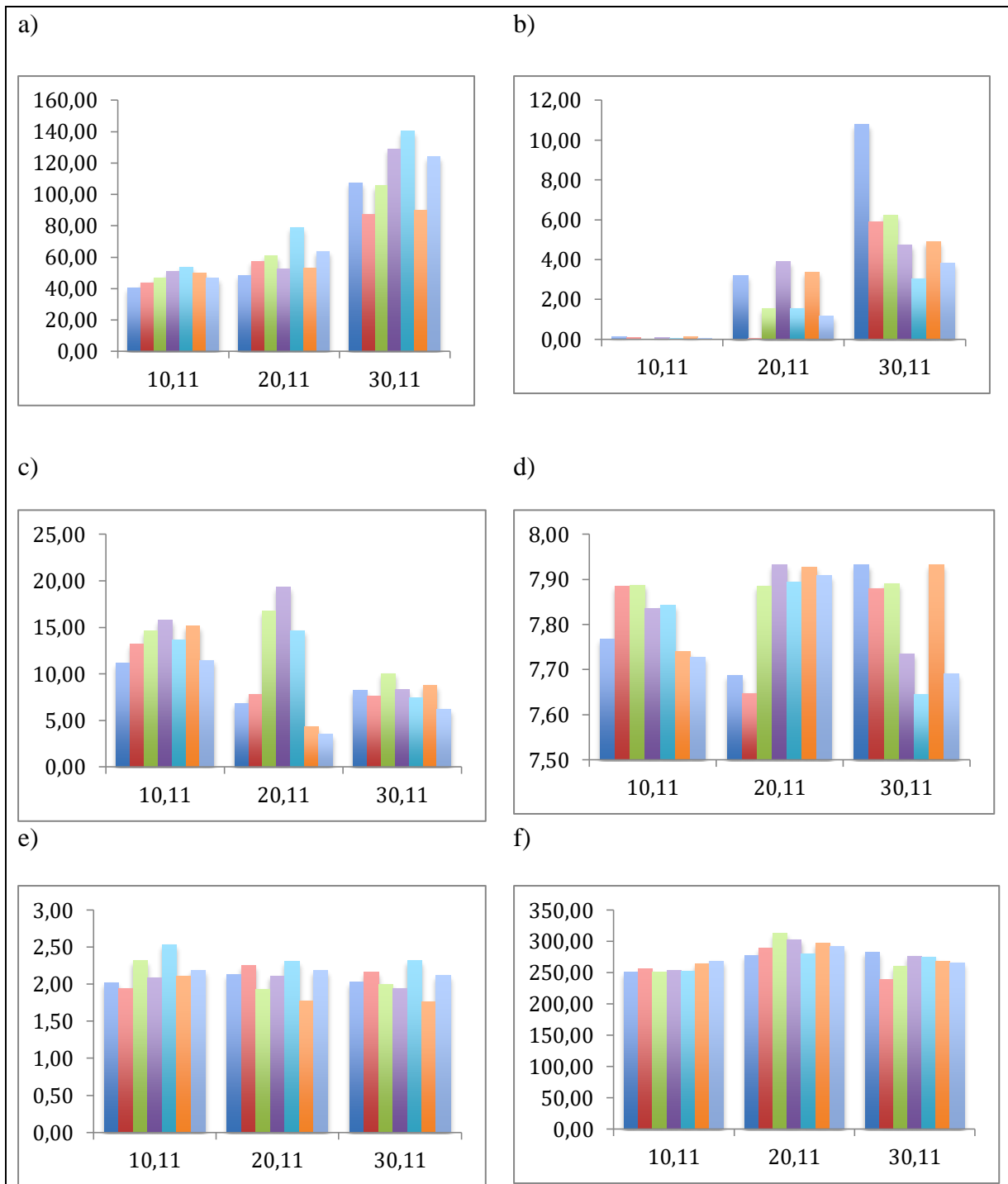


Figura 14: Calidad fisicoquímica de agua en los tratamientos evaluados, en un periodo de treinta días. a) NO<sub>3</sub>, b) NH<sub>4</sub>, c) NO<sub>2</sub>, d) pH, e) OD, f) TDS. Los valores se expresan en mg/mL, por el tiempo de evaluación, exceptuando el de pH que adimensional.

### 10.1.5 Desafío con la bacteria *Streptococcus agalactiae*

Para determinar la resistencia a la estreptococosis, se realizó una infección vía IP y IM. Los tratamientos evaluados poseen diferencia significativa ( $p \leq 0.01$ ). De los tratamientos evaluados, se obtuvo la menor mortalidad en el tratamiento ORG 0.5% con una mortalidad acumulada de 7%, seguido por BAC 10X3, ORG 1 y 2%, con mortalidades de 10 y 13%, respectivamente.

Se obtuvo la mayor mortalidad en los tratamientos de BAC 10X1 y 10X5 con mortalidades de 20% cada tratamiento. Cabe resaltar que todos los tratamientos mejoraron la resistencia a la infección bacteria causada por *S. agalactiae*, con respecto al tratamiento control (Figura 15).

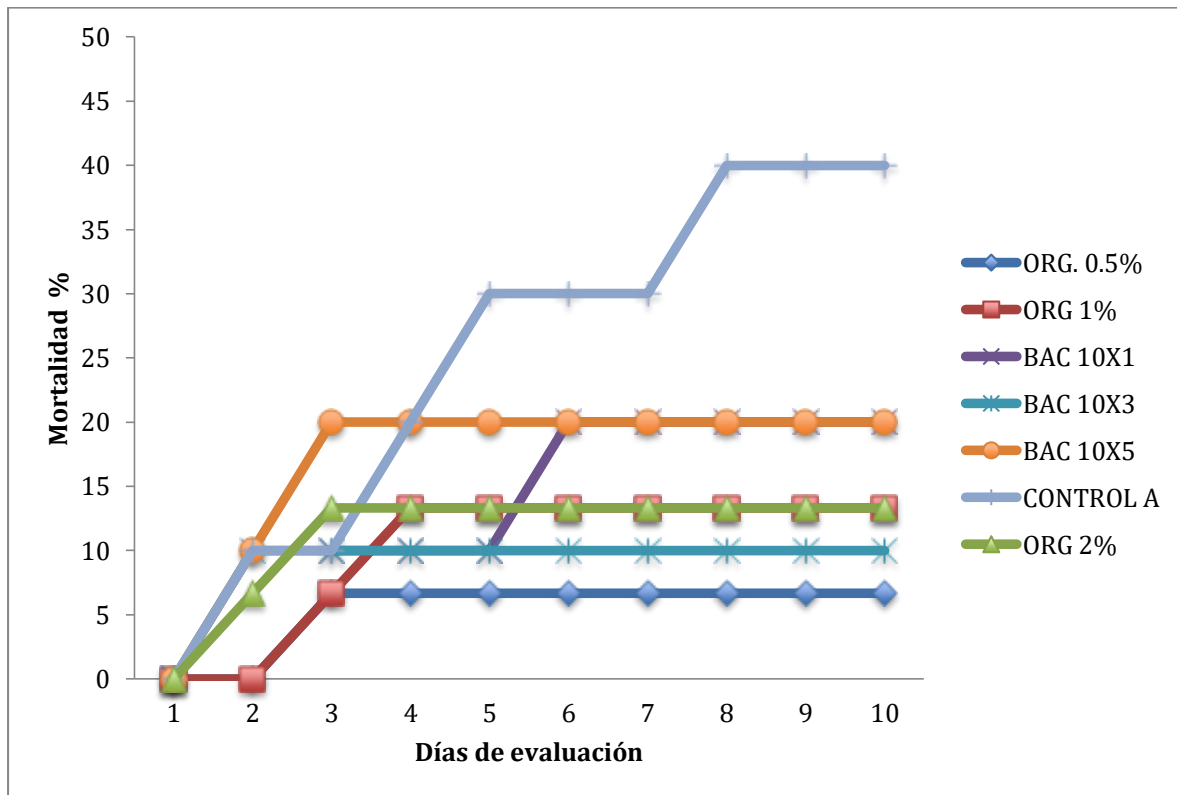


Figura 15: Resistencia a la infección vía IP de *Streptococcus agalactiae*.

La frecuencia de úlceras por tratamiento se presenta en la Figura 16. Se puede observar que existe una mayor frecuencia de úlceras tipo S en los tratamientos de orégano (0.5, 1 y 2%). Mientras que en los tratamientos con probióticos tienden a aumentar su frecuencia las úlceras y el grado de intensidad de la lesión.

En el caso de las lesiones tipo L, se pudo observar mayor frecuencia para los tratamientos BAC 10X1, 10X3 y control. Mientras que los tratamientos ORG presentan una frecuencia menor del 10%, por lo que infiere que este tratamiento limita los efectos de la infección reduciendo la incidencia de lesiones dérmicas. Existe una diferencia significativa marcada entre el grupo de tratamiento respecto a la frecuencia de lesiones ulcerativas y control.

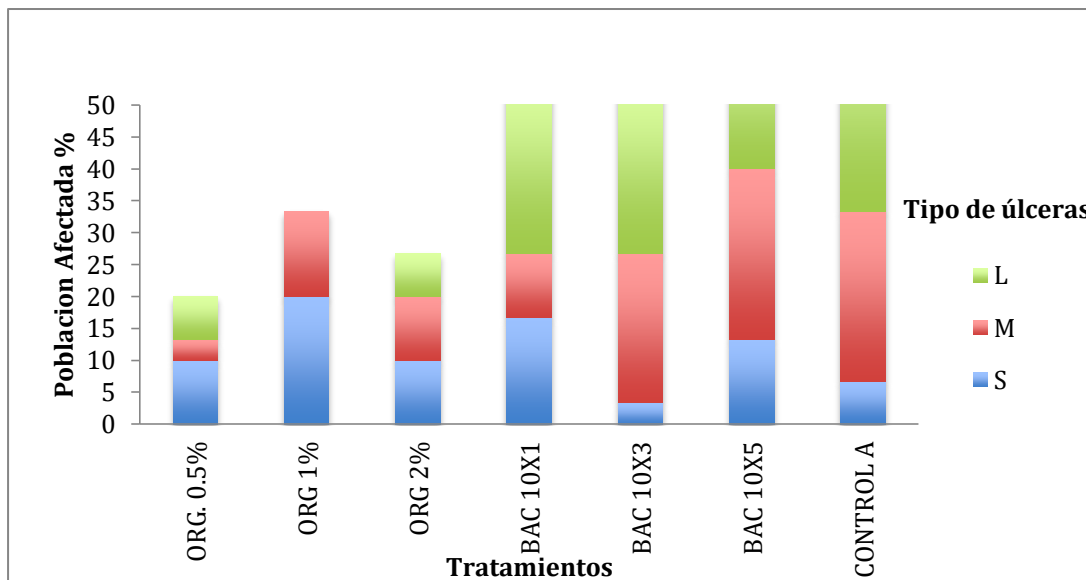


Figura 16: Porcentaje de las lesiones ulcerativas post infección.

#### 10.1.6 Viabilidad económica

Para establecer la variabilidad económica de la adición de inmunostimulantes se utilizó la tasa marginal de retorno MRR como indicador de viabilidad. Para dicho cálculo únicamente se tomaron en cuenta los costos variables, ya que son los que están directamente relacionados a la producción. El análisis se describe en la tabla 7:

Tabla 7:

*Distribución de costos, calculo de la Tasa de retorno.*

Proyección	ORG <sub>0.5%</sub>	ORG <sub>1%</sub>	ORG <sub>2%</sub>	BAC <sub>10X1</sub>	BAC <sub>10X3</sub>	BAC <sub>10X5</sub>	CNT
Rendimiento estimado alcanzar (lb)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Precio de venta (QTZ/lb)	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
<b>Beneficio bruto</b>	<b>1200.0</b>	<b>1200.0</b>	<b>1200.0</b>	<b>1200.00</b>	<b>1200.00</b>	<b>1200.00</b>	<b>1200.0</b>
<b>Biomasa previo a la infección</b>	<b>107.53</b>	<b>111.11</b>	<b>114.94</b>	<b>125.00</b>	<b>111.11</b>	<b>125.00</b>	<b>166.67</b>
FCA	1.29	1.53	1.13	1.82	1.51	1.46	1.85
Total de Alimento según FCA	138.44	170.53	129.99	227.51	167.32	183.03	308.33
Costo de alimento (lb)	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Sobrevivencia (%)	93	90	87	80	90	80	60
Costo unitario de semilla (QTZ)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Total de semilla a utilizar (unit)	107.53	111.11	114.94	125.00	111.11	125.00	166.67
Total de vehículo de incorporación de la dieta (L)	5.77	5.55	5.09	6.00	6.00	6.00	
<b>Costos Variables de Producción</b>							
Costo total de alimento	484.53	596.87	454.96	796.30	585.62	640.62	1079.17
Costo total de semilla	53.76	55.56	57.47	62.50	55.56	62.50	83.33
Costo por Inclusión del agente (QTZ)	68.10	136.20	272.40	17.40	19.80	27.00	0.00
Costo del vehículo (QTZ)	69.28	66.55	61.10	30.00	30.00	30.00	0.00
<b>TOTAL COSTOS VARIABLES</b>	<b>675.66</b>	<b>855.17</b>	<b>845.93</b>	<b>906.20</b>	<b>690.97</b>	<b>760.12</b>	<b>1162.50</b>
<b>BENEFICIO NETO</b>	<b>524.34</b>	<b>344.83</b>	<b>354.07</b>	<b>293.80</b>	<b>509.03</b>	<b>439.88</b>	<b>37.50</b>
MRR	0.78	0.40	0.42	0.32	0.74	0.58	0.03
Retorno porcentual	77.60	40.32	41.86	32.42	73.67	57.87	3.23

Nota: QTZ: quetzales

El cálculo de la Tasa Marginal de Retorno nos indica que el tratamiento en el cual se obtuvo mayor rentabilidad, aún teniendo un aumento en los costos variables, fue el tratamiento con adición de orégano 0.5%, obteniendo una tasa de retorno porcentual del 77.60%, seguido por el tratamiento de probiótico BAC 10X3, con una tasa del 73.67%. A pesar de que en ambos tratamientos se obtuvo un incremento de 20% en los costos variables de producción, siguen siendo económicamente viable el uso de los agentes naturales para la prevención de las infecciones con *S. agalactiae*.

## 10.2 Fase II condiciones semi-controladas

### 10.2.1 Actividad inmunológica en los organismos

Para la evaluación de la actividad inmunológica de los organismos de *O. niloticus*, se eligió al mejor tratamiento con las mejores resultados en los experimentos de resistencia a la enfermedad, parámetros zootécnicos y análisis económico. El tratamiento de ORG 0.5%, presentó el factor de conversión alimenticia más bajo, mayor resistencia a la infección *S. agalactiae*, reducción de úlceras de tipo M- L y una tasa de retorno porcentual más alta en el análisis económico.

En la evaluación de treinta días con la dieta ORG 0.5%, suministrada a organismos de 50 g, se determinó que la concentración de proteína total en plasma, no vario significativamente ( $p \geq 0.05$ ) entre el valor inicial y final. Se observó un ligero aumento a los 15 días de evaluación. La glicemia reflejó diferencia significativa entre el tratamiento y el control ( $p \leq 0.05$ ). Siendo la concentración de glucosa al final del control la que presenta el valor mas alto de todas las determinaciones (Tabla 8).

El leucograma evidenció diferencia significativa entre los tratamientos, reflejando que los valores en el tratamiento de orégano se encuentran por debajo del control. La serie de linfocitos y trombocitos fue la que mayor diferencia refleja entre ambos tratamientos.



Tabla 8:

*Bioquímica y Hematología FASE II*

	ORG <sub>0.5%</sub>	Control	ORG <sub>0.5%</sub>	Control	ORG <sub>0.5%</sub>	Control
	(Io)	(Io)	(M)	(M)	(F)	(F)
Glicemia (g/dL)	40.1±5.2 <sup>a</sup>	50.1±5.1 <sup>ab</sup>	65.2±10.8 <sup>ab</sup>	60.3±7.1 <sup>ab</sup>	66.5±7.73 <sup>ab</sup>	104.5±20.48 <sup>b</sup>
Proteína (g/dL)	3.1±0.25 <sup>a</sup>	3.2±0.45 <sup>a</sup>	3.3±0.49 <sup>a</sup>	4.1±0.45 <sup>a</sup>	3.7±0.73 <sup>a</sup>	4.2±0.46 <sup>a</sup>
Eritrocitos (#)	1884±17	1621±28	1164±22	1605±29	1726±25	1412±21
Leucocitos (#)	39±0.9	47±1.2	33±0.7	38±0.4	30±0.8	52±1.1
Hematocrito (%)	40.7±5.7	37.5±5.8	37.8±3.6	37.9±3.42	30.8±3.3	41.1±5.4
Granulocitos (%)	18	13	33	24	20	12
Monocitos (%)	13	13	12	18	13	15
Linfocitos (%)	31	55	48	42	50	15
Trombocitos (%)	38	19	6	16	17	58

Nota: Io: evaluación inicial, M: evaluación media, F: evaluación final.

### 10.3 Matriz de resultados

Objetivo General		
<p>Evaluar la actividad inmunoestimulante <i>in vivo</i> de un extracto de planta medicinal y un probiótico en <i>Oreochromis niloticus</i> infectadas con <i>Streptococcus agalactiae</i>.</p>		
Objetivos Específicos	Resultados esperados	Resultados obtenidos
<p>Determinar la concentración del extracto de planta medicinal y probióticos en cultivo de tilapia</p>	<p>Dieta con inclusión de orégano y probiótico que active el sistema inmune.</p>	<p>Inclusión de orégano al 0.5% (Tabla No. 8).</p>
<p>Establecer la capacidad de resistencia a Estreptococosis en tilapia a través del inmunoestimulante propuesto.</p>	<p>Dieta con inclusión de orégano y probiótico, que reduzca mortalidad y presencia de úlceras dérmicas.</p>	<p>Inclusión de orégano al 0.5% obtuvo una mortalidad después de diez días post infección de 7% (Figura no. 15) Frecuencia de úlceras tipo S-M-L, post infección, se reduce con la dieta de inclusión orégano 0.5% (Figura No. 16)</p>
<p>Determinar la concentración promotora de crecimiento y estado de salud de tilapia a través de los inmunoestimulantes propuestos</p>	<p>Dieta con inclusión de orégano y probiótico, tiene la capacidad de generar una mayor ganancia de peso</p>	<p>No existe diferencia significativa (<math>p&gt;0.05</math>) entre los tratamientos que indique que los compuestos propuestos sirvan como promotor de crecimiento. (Tabla No. 6)</p>

---

<p>Evaluar los efectos de producción adversos de los inmunoestimulantes.</p>	<p>Dieta con inclusión de orégano y probiótico que ocasione efectos de producción adversos</p>	<p>Existe una mayor excreción de productos nitrogenados en agua (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>), en los tratamientos con inclusión de orégano vs el control. (ver figura No. 14)</p>
<p>Determinar la viabilidad del uso de inmunoestimulantes en los cultivos de tilapia</p>	<p>Determinar la viabilidad de utilizar agentes naturales como inmunoestimulantes para prevención de enfermedades</p>	<p>Tratamiento con orégano al 0.5%, obteniendo una tasa de retorno porcentual del 77.60%, siendo económicamente viable (ver tabla no. 7)</p>

---

## 11. DISCUSION

En general, las infecciones por *Streptococcus agalactiae* dependen de varios factores para producir la enfermedad. La infección puede reportarse como cuadros agudos o bien crónicos. La clave de la infección bacteriana para este patógeno es: capacidad de virulencia de las cepas, concentración del producto bacteriano para la infección, especie o variedad de organismos y respuesta individual al medio ambiente entre otros (Snieszko, 1975).

El aislamiento bacteriano de *S. agalactiae* del brote de abril 2015, presentó signos clínicos similares a lo reportados por Evans et al., (2002) en Kuwait, Amal & Zamri-Saad, (2001) en Malasia y Salvador, Muller, Freitas, Leonhardt, Pretto-Giordano, y Dias, (2005) en Brasil. Aunque difiere un poco de estos reportes en cuanto a que no se reporta granulomas con infiltración y congestión de meninges. La cepa aislada de *S. agalactiae* posee características fenotípicas diferentes a lo reportado por Buller, (2004) y Kusuda, Kawai, Salati, Bnner, y Fryer, (1991), ya que no muestra formación beta y/o alfa hemolisis en agar sangre, siendo un factor importante para determinar factores de virulencia de la cepa bacteriana (Fuller et al, 2002). Por lo tanto se infiere que la expresión del cepa de *S. agalactiae* aislada, puede tener vías alternas de infección así como expresión (signos clínicos) diverso.

La LD<sub>50</sub> de *S. agalactiae* para el presente estudio, fue de  $2.3 \times 10^8$  ufc/ml, concentración que se encuentra por arriba a lo reportado por Evans, Panisk, Klesius, & Al-Ablani, (2006); Evans, Wiedenmayer, Klesius, & Shoemaker, (2004) y Pasnik, Evans, y Klesius, (2005), quienes reportan mortalidad hasta del 90% con concentraciones de  $1.0 \times 10^6$  a  $1.89 \times 10^4$  ufc/g. Estos autores también reportan que a concentraciones de  $1 \times 10^2$  ufc/g, se presentan signos típicos de estreptococosis en un periodo de 48 h, lo que difiere de esta investigación ya que los signos típicos de estreptococosis se mostraron a las 72 h post infección.

Comparando datos de otros autores con el presente estudio, la bacteria posee una menor patogenicidad, posiblemente por no presentar factores de virulencia como la formación de beta hemolisis, o como reporta Widanarni & Tanbiyaskur, (2015), debido a que las bacterias que causan enfermedad de origen crónico poseen factores de virulencia bajos, lo cual incide en la mortalidad y expresión de la enfermedad en tiempos prolongados.

El presente estudio prepararon seis dietas experimentales con diversos porcentajes de inclusión de extracto etanólico de *L. graveolens* y *B. subtilis*, para la prevención de *S. agalactiae*. Los resultados indican que el mejor tratamiento para reducir la mortalidad hasta un 93% post infección de *S. agalactiae*, es la inclusión de extracto de orégano 0.5% en una dieta comercial de tilapia. Resultados similares reporta Zheng, et al., (2009), con dietas de 0.0485% extracto de carvacrol y 0.0015% de extracto de thymol, los cuales son los componentes principales del orégano. Estas dietas logran reducir mortalidades por infección bacteriana hasta un 21%.

La presente investigación demostró que los agentes naturales propuestos pueden reducir la mortalidad post infección de *S. agalactiae*, lo cual contribuye a las nuevas investigaciones en el área de fitoterapéuticos y uso de probióticos en la acuicultura. A pesar que los mecanismos de acción de probióticos y extractos de plantas medicinales, no son bien definidos en la actualidad.

La forma de actuar de los extractos de plantas medicinales es a través de la propiedades lipofílica y su estructura química (Conner, 1993; Farag, Daw, Hewedi, & Baroty, 1989). En el caso del orégano se sugiera que es a través las propiedades carvacrol y thymol (Conner, 1993) y la cantidad de fenoles los cuales destruyen la membrana celular bacteriana, dejando expuesto todo el material nuclear al medio en que se encuentren.

En el caso de los probióticos, estos poseen la habilidad de liberar sustancias químicas con efectos bactericidas o bacteriostáticos sobre bacterias patógenas, las cuales crecen de manera oportunistas (Vershuere, Rombaut, Sorgeloos, & Verstarete, 2000). El género *Bacillus*, puede excluir a otras bacterias a través de productos extracelulares, bacteriocinas, sideróforos, enzimas lisosomas y proteasas (Moriarty 1998; Vershuere, et al., 2000).

Adicionalmente, se pudo determinar que la dieta de orégano 0.5%, mantiene los niveles de glicemia estables, lo que sugiere que la respuesta al estrés es menor, ya que en condiciones de estrés se eleva la producción de glucosa (Iwama, Thomas, Forsyth, & Vijayan, 1999), lo cual provoca una aumento en la demanda de energía produciendo así un desequilibrio fisiológico que puede ser la razón de las infecciones de patógenos por una depresión en el sistema inmunológico. Esta condición también podría explicar la reducción del factor de conversión alimenticia de la Fase I, ya que a menor demanda de energía, los nutrimentos son convertidos en músculo.

La serie leucocitaria indicó que para organismos que recibieron el tratamiento de orégano 0.5%, se observa valores normales de linfocitos, granulocitos, trombocitos y monocitos, mientras que organismo que no lo recibieron aumento el porcentaje de trombocitos y linfocitos, lo cual indica Rondon, (2002) y Ruiz, Fernandez, & De Blas, (2003), son procesos de estrés acompañados del inicio de infecciones bacterias, causadas por la pérdida de la homeostasis en los organismos.

No existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados para los parámetros de crecimiento y tasa de crecimiento específico, lo cual difiere de los autores como Citarasu, (2010) y Sivaram, Babu, Citrarasu, Immanuel, Murugadas, & Marian (2004) que demuestran que los extractos acuosos de hojas, raíces y corteza de plantas incrementan los parámetros de crecimiento en los organismos. Por lo tanto se infiere que los extractos de plantas medicinales y probióticos no siempre afectan a los rendimientos productivos pero si tienen un efecto directo con la resistencia a patógenos bacterianos.

## 12. CONCLUSIONES

1. Se recomienda la inclusión de orégano al 0.5% y de probiótico  $10^3$  ufc/g, como concentración inmunoestimulante para el cultivo de tilapia. Estas concentraciones permiten alcanzar sobrevivencias de 93% y 90%, respectivamente, en poblaciones de tilapia infectadas con *S. agalactiae*.
2. El tratamiento de orégano 0.5%, mejoró la resistencia a la infección de *S. agalactiae* en tilapia, reduciendo la mortalidad a un 7%; y la frecuencia y severidad de úlceras dérmicas, siendo la úlcera tipo S la más predominante en tilapias inmunoestimuladas.
3. Ninguna de las concentraciones de inmunoestimulantes evaluadas evidenció efectos significativos sobre el crecimiento, por lo que se asume que no tienen efecto como promotores de crecimiento. Sin embargo, la aplicación de los inmunoestimulantes en todas las concentraciones evaluadas redujeron el factor de conversión alimenticia con respecto al control.
4. En las concentraciones evaluadas, ninguno de los tratamientos, inclusión de extracto etanólico de *Lippia graveolens* e inclusión de *Bacillus subtilis*, tienen efectos adversos en los organismos inmunoestimulados.
5. La adicción de orégano 0.5% y probiótico  $10^3$  ufc/g en la alimentación de tilapia, es económicamente viable en poblaciones afectadas por *S. agalactiae*. Con la inclusión de estos tratamientos se pueden alcanzar tasas de retorno de 77.6% y 73.7%, respectivamente.

### 13. REFERENCIAS

- Agius, C. (1985). The melano-macrophage centres of fish: A review. En: Fish Immunology. M.J. Manning y M.F. Tatner. Academic Press. Londres.
- Amal, M.N.A & Zamri-saad, M. (2011). Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195-206.
- Bergey, D. H., Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. United States of America: William and Wilkins, Baltimore.
- Blaxhall, P, & Daisley, K. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal Fish Biology*, 5(1), 771-781
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K. (2010). Aquaculture: global status and trends. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. *Series B, Biological Sciences*, 365, 2897–2912.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual*. United Kingdom: Centre for Agriculture and Biosciences International.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Campbell, T.W. (1988). Fish cytology and hematology. *Veterinary Clinics of North America*, 18, 349-364.
- Campbell, T. W., & Murru, F. (1990). An introduction to fish hematology. *Compendium of Continuing Education in Veterinary Science*, 12, 525-533.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18, 403-414.
- Conner, D. E. (1993). Naturally occurring compounds. En P. Davidson & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in foods*, , 361-375 pp. New York: Marcel Dekker.
- Eldar, A., Horivitez, A., & Bercovier, H. (1997). Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 56(1), 175-183.
- Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*, 11, 435-491.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., & Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garviae* from wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 561-569.



- Evans, J. J., Wiedenmayer, A. A., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2004), Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. *Aquaculture*, 233, 15–21.
- Evans, J. J., Klesius, P. H., Gilbert, P. M., Shoemaker, C. A., Al Sarawi, M. A., Landsberg, J., & Al Zenki S. (2002). Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, 25, 505–513.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., & Baroty, G.S. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52, 665-667.
- Fletcher, T. C. (1981). Non-antibody molecules and the defence mechanisms of fish. In: Pickering, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*, Academy Press, 2, 171-183.
- Food and Agriculture Organization of United Nations. (2010). World aquaculture 2010. Fisheries aquaculture, F. A. O., & Paper, T. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/014/ba0132e/ba0132e.pdf>
- Food and Agriculture Organization (2013a). Acuicultura [base de datos]. Roma: Food and Agriculture Organization of United Nations Statics. Disponible [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/\\*/S](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/*/S) [2014, 15 de Junio].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013b). FAO Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture. FAO Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture, 1–307. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>
- Fuller, J. D., Camus, A. C., Duncan, C. L., Nizet, V., Bast, D. J., Thune, C., De Azavedo, J. C. (2002). Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *S. iniae* disease. *Infection and Immunity*, 70, 5730-5739..
- Gaikowski, M. A. (Junio, 2009). Uso de alimento medicado con Aquaflor® (florfenicol) para controlar la mortalidad causada por *Streptococcus iniae* en tilapia (*Oreochromis* spp.): Eliminación de residuos y efectividad en el campo. *Congreso Manejo de Streptococcus en Peces de Aguas Cálidas*, México.
- García, J. (2013). Analysis of Competitiveness of Tilapia Industry: Case Guatemala vs. Honduras. Tesis de Maestría en Acuicultura, National Taiwan Ocean University, Taiwan.

- Gomez-Gil, B., Roque, A., & Turnbull, J. F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organism. *Aquaculture*, *191*, 259-270.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, *317*, 1-15.
- Hine, P. M. (1992). The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunology*, *2*, 79-88.
- Hoshino, T., Sano, T., & Morimoto, Y. (1958). A Streptococcus pathogenic to fish. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, *44*, 57-58.
- Houston, A., & Wilde, M. (1969). Haematology and blood volume of thermally acclimated brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *28(1)*, 877-885.
- Inglis, V., Roberts, R. J., & Bromage, N. R. (1993), Streptococcal Infections. En: Bacterial Diseases of fish, 290 p. New York: Halsted.
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., & Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *8*, 35-56
- Kolkovski, S. (2012). Medicina verde en acuicultura. *Revista Aquafeed*, *5(2)*, 12-14.
- Kolkovski, S., & Kolkovski, J. (2011). Herbal medicine in aquaculture. *International Aquafeed*, *14 (2)*, 28-31.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R., & Fryer, J. L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systemic Bacteriology*, *41*, 406-409.
- Laboratorio Sanidad Acuicola (2014). *Manual para evaluación macroscopía de organismos acuáticos*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Centros de Estudios del Mar y Acuicultura.
- Lødemel, J., Mayhew, T. M., Myklebust, R., Olsen, R. E., Espelid, S., & Ringø, E. (2001) Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Aquaculture Research*, *32*, 935–945.
- MacArthur, J. I., & Fletcher, T. C. (1985) Phagocytosis in Fish. En: Fish Immunology. M.J. Manning y M.F. Tatner. *Academic Press*, *1*, 29-46.
- Marroquín, C., & García, J. (2014). *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.* Informe Final (2015- 4.8.26.7.27).

Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Programa de Ciencias Básicas.

- Morales, E. (2009). *Evaluación y análisis financiera para la producción de tilapia en el municipio de Masagua, Escuintla*. Tesis de Maestría en Economía Financiera. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Moriarty, D.J. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, *164*, 351-358.
- Musa, N., Wei, L., Musa, N., Hamdan R. H., & Leong, L. K. (2009). Short communication: Streptococcosis in red tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farm in Malaysia. *Aquaculture Resources*, *40*, 630-632
- Noga, E. (2000). *Fish diseases: diagnosis and treatment*. Blackwell. EEUU.
- O'Neill, J. G., (1989). Ontogeny of the lymphoid organs in an antarctic teleost, *Harpagifer antarcticus*(Notothenioidei: Perciformes). *Developmental & Comparative Immunology*, *13*, 25-33.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Fish immune system. *Aquatic*, *64*(2), 205-215.
- Ostrand, S. L., Glenn, R. A., Gannam, A. L., & Hanson, K. C. (2012). Inhibitory Effects of Rosemary Oil on the In Vitro Growth of Six Common Finfish Pathogens. *North American Journal of Aquaculture*, *74*, 230–234.
- Park, S. I. (2009). Disease Control in Korean Aquaculture. *Fish Pathology*, *44*, 19–23.
- Pascual, M. E., Slowing K., Carretero E., Sanchez Mata D., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacol*, *76* (3), 201–214
- Pasnik, D. J., Evans, J. J., & Klesius, P. H. (2005). Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms*, *66*, 129-134.
- Plumb, J. A. (1999), *Tilapia bacterial diseases. In Health: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. Ames: Iowa State University.
- Plumb, J. A., & Hanson, D. (2010). *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*. Iowa, United States of America: Wiley-Blackwell.

- Plumb, J. A., Schachte, J. H., Gaines, J. L., Peltier, W., & Carroll B. (1974). *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103(2), 358-361.
- Plyzycz, B., Flory, C. M., Galvan, I., & Bayne, C. J. (1989) Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Developmental & Comparative Immunology*, 13, 217-224.
- Rodas, A., García, R., Salomón, G., & Nufio, S. (2015). *Evaluación y caracterización extractos botánicos supercríticos de orégano (Lippia graveolens) para el control de la Roya (Hemileia vastatrix) en el cultivo de café (Coffea arabica L.) en las zonas productoras del municipio de la Unión, departamento de Zacapa.* (Informe 2015- 4.8.24.2.41. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Programa de Recursos Naturales y Ambiente.
- Rattanachaiakunsoon, P., & Phumkhachorn, P. (2009). Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infecting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 579-582.
- Rattanachaiakunsoon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Science*, 76, 287-293.
- Reneau, A. (2007). *Studies in the selection of bacterial strains with probiotic potential against pathogenic Vibrio species.* Master Thesis, National Taiwan Ocean University, Taiwan.
- Rondon, I. (2004) Inmunoestimulantes en medicina veterinaria. *Orinoquia*, 8(2) 56-75.
- Ruiz, I., Fernandez, A. B., De Blas, I. (2003). El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Aquatic*, 18, 33-38.
- Salvador, R., Muller, E. E., Freitas, J. C., Leonhardt, L. H., Pretto-Giordano, L. G., & Dias, J. A. (2005). Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciencia Rural, Santa Maria* 35 (6), 1374-1378
- Sheehan, B. (2009). Estreptococosis en tilapia: ¿Un problema más complejo de lo esperado?. *Congreso Manejo de Streptococcus en Peces de Aguas Cálidas*, Congreso, México.
- Sivaram, V., Babu, M. M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadas, S., & Marian, M. P., (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with

- herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237, 9-20.
- Sniezko, S. F. (1975). History and present Status of fish diseases. *Journal of Wildlife Diseases*, 11, 446-459.
- Son, V. M., Chang, C. C., Wu, M. C., Guu, Y. K., Chiu, C. H., & Cheng, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 691–8.
- Standley, P., Williams, L., & Gibson, D. (1970). *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany.
- Suanyuk, N., Kanghear, H., Khongpradit, R., & Supamattaya, K. (2005). *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27, 307-319.
- Tipu, M. A., Pasha, T. N., & Ali, Z. (2002). Comparative efficacy of salinomycin sodium and Neem fruit (*Azadiracht indica*) as feed additive anticoccidials in broilers. *Science Alert: International Journal of Poultry Science.*, 1(4), 91-93.
- Vershuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 655-671.
- Wang, Y. B., Li, J. R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1-4), 1–4.
- Wantanabe, W. O., Losordo, T. M., Fitzsimmons, K., & Hanley, F. (2002). Tilapia production systems in the Americas: Technological advances, trends, and challenges. *Reviews in Fisheries Sciences*, 364, 465-498.
- Wei, N. (2010). *The application of Streptococcus iniae vaccine and egg yolk immunoglobulin (IgY) from hen pre-immunized with the same vaccine on Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Tesis de Maestria en Acuicultura. National Taiwan Ocean Univeristy, Taiwan.
- Windanarni, W., & Tanbiyaskur, H. (2015). Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for the control of Streptococcosis in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal of Biological Sciencis*, 18 (2), 59-66.

- Yoshinaga, K., Okamoto, N., Kurata, O., & Ikeda, Y. (1994). Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathology*, 29, 1-4.
- 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, 214–218.
- Zlotkin, A., Hershko, H., Eldar, A. (1998) Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4065–4067.

#### 14. APENDICES

## 15. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN

Las actividades del segundo semestre del año 2015, se enfocaron en transmitir las actividades y logros alcanzados por el proyecto DIGI titulado: Aplicación de inmunostimulantes de origen natural en el cultivo de tilapia para la prevención de Estreptococosis en Guatemala, a la comunidad académica y productora

Para ello se impartieron charlas informativas sobre el uso y beneficio de la inclusión de productos naturales a las dietas de tilapia, frente a infecciones de *S. agalactiae*. La población a la que se dirigieron las charlas fue a estudiantes de sexto ciclo de la carrera en Licenciatura en Acuicultura impartida en el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura (Figura 17), donde se enseñaron métodos presuntivos para la identificación de Estreptococosis en tilapia, hematología como herramienta de detección de enfermedades en la acuicultura, terapias alternativas para el control y manejo de enfermedades, y uso del extracto etanólico de *L. graveolens* en dietas comerciales de tilapia.



Figura 17: Vinculación docente. Izq: Identificación de *S. agalactidae*. Der: Métodos hematológicos como herramienta de en la acuicultura.

También se tuvo la oportunidad de tener un espacio de 30 minutos para exponer los avances de la investigación a quince productores del área sur de Guatemala en el curso de sanidad acuícola básica impartido en las instalaciones del Centros de Estudios del Mar y Acuicultura.

En dicha presentación se explicó de manera resumida logros alcanzados dentro de la investigación. También se motivó a los pequeños productores a utilizar el extracto de orégano como modulador del sistema inmunológico para prevenir enfermedades bacterianas.

Como consecuencia de la charla informativa realizada en octubre 2015 a los productores de la costa sur de Guatemala, personal de una finca productora de alevines, contactó al grupo de investigadores del proyecto para realizar una prueba en estanques de producción de alevín.

Para ello se realizó una visita a la finca acuícola, donde se realizó un análisis sanitario de la población a estudiar, se capacitó al personal de finca para la incorporación del extracto de orégano en el alimento y finalmente se capacitó al personal para llevar datos de producción, que permitieran la evaluación de la eficiencia del orégano. (Figura 18).

Para dicha evaluación se utilizó un total de 20,000 alevines de tilapia (0.01 g) en estanques circulares de 5 m de diámetro. Los organismos fueron divididos en dos tratamientos, uno con la dieta experimental de 0.5% de extracto de orégano y el otro con la dieta que utiliza usualmente la finca. El período de evaluación fue de dos meses, durante el cual se registró mortalidad durante todo el experimento para observar si existe una diferencia entre los tratamientos.

De acuerdo a los datos proporcionados por el gerente de la granja acuícola, se observó menor porcentaje de mortalidad acumulada durante el estudio. Se obtuvo una mortalidad menor del 5%, con respecto al tratamiento control. También reporta que durante los meses de monitoreo se pudo observar una menor disparidad de tallas. Por lo tanto se asume que el tratamiento de orégano ayudó a mejorar la digestibilidad del alimento en los organismos, reflejado una menor variedad en el peso y talla de los organismos. Sin embargo, también reporta que en los estanques circulares, en las paredes se observaba mayor depósito de sólidos, provenientes del concentrado, lo cual de alguna manera puede afectar a la calidad de agua.

Finalmente se presentaron los resultados preliminares de la investigación en el uno de los cursos de la maestría en evaluación de proyectos de la Facultad de Ingeniería, como parte de la vinculación académica y la investigación.





Estanquería de la granja acuícola



Preparación de la solución de con orégano



Preparación de la dieta



Producto final



Evaluación Sanitaria preliminar



Organismos en evaluación

*Figura 18:* Proyecto de vinculación, finca acuícola productora de alevines.