



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

**Capacidad antibacteriana de *Oedogonium capillare*, *Citrus limon* y
Mangifera indica como control de infecciones bacterianas en
*Carassius auratus***

Tesis

(Idónea Comunicación de Resultados)

que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

Presenta

Roxana López Simeon

DIRECTORA: Dra. María del Pilar Negrete Redondo
ASESORA: M. en C. María Guadalupe Figueroa Torres
ASESOR: M. en C. Jorge Manuel Romero Jarero

CONTENIDO

	páginas
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS	13
HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Adquisición de los organismos vegetales y obtención de los extractos	15
Pruebas in vitro con las cepas bacterianas	17
Obtención de plásmidos	19
Pruebas in vivo	22
RESULTADOS	28
Pruebas in vitro	28
Pruebas in vivo	40
DISCUSIONES	52
CONCLUSIONES	60
LITERATURA CITADA	62

RESUMEN

En la primera fase del presente estudio se comprobó, *in vitro*, la capacidad de los extractos que se obtuvieron a partir del alga verde dulceacuícola *Oedogonium capillare*, el limón *Citrus limon* y el mango *Mangifera indica*, para inhibir el crecimiento de 23 diferentes especies de bacterias, tanto patógenas de humanos como de importancia ictiopatógena, pertenecientes a las familias: *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae* y *Vibrionaceae*. Las diferentes cepas bacterianas silvestres se aislaron a partir de peces *Carassius auratus*, cultivados en granjas acuícolas del estado de Morelos, México. Posterior a su purificación se identificaron utilizando la técnica del API-20E y API-20NE. Las algas se recolectaron de los estanques para su cultivo en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Xochimilco; el limón y el mango se compraron en un mercado de la Ciudad de México. Una vez secos y homogeneizados los organismos, se obtuvieron los respectivos extractos por medio de extracciones hexánicas, alcohólicas o hidrolíticas. Para determinar la sensibilidad antibiótica de las bacterias a la actividad de los extractos se instrumentó el sistema estandarizado de pruebas de difusión de discos. Se comparó la actividad antibacteriana de los antibióticos comerciales de mayor uso en la acuicultura: kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina con respecto a los extractos de origen natural. Se efectuó la técnica de lisis alcalina para la extracción de plásmidos resistentes a antibióticos para determinar su presencia en todas las cepas bacterianas. Se realizaron replicas de todo el experimento usando cepas de la American Type Culture Collection (ATCC). Se comparó el comportamiento antibacteriano de los extractos vegetales con cada uno de los antibióticos comerciales por medio de la medición de los diámetros de los halos de inhibición. Se aplicó la correlación de Pearson obteniendo altos coeficientes de correlación entre la forma de actuar del extracto hexánico del alga y los antibióticos empleados en este estudio. La actividad antibacteriana de *O. capillare*, está más relacionada con la actividad de la kanamicina que con la actividad de los otros dos antibióticos. Se obtuvieron bajos coeficientes de correlación entre la

actividad antibacteriana de los restantes extractos y los antibióticos comerciales. En todas las cepas de colección se registró mayor actividad antibacteriana de los extractos, el promedio de los diámetros de los halos de inhibición de las especies de las cuatro familias bacterianas de este grupo fue mayor que los del grupo silvestre, posiblemente debido a la presencia de plásmidos-R en este último grupo. Para efectuar las pruebas *in vivo* correspondientes a la segunda fase del experimento y comprobar la capacidad antibacteriana del extracto *O. capillare*, se instrumentó el uso de ésta en diferentes etapas: en la primera se comprobó la actividad del extracto hexánico de *O. capillare* a partir de la administración del tratamiento a través de tres vías, alimento, intramuscular y baños, después de haberse inoculado experimentalmente a los peces con 1 mL de 10^4 ufc/mL de la bacteria *V. fluvialis* por cada 100 g de pez. El uso del extracto por estas vías no fue efectivo. Con base en los resultados anteriores se diseñó una segunda fase en la cual los diferentes tratamientos se administraron antes y después de provocar experimentalmente la infección. Se registró que los peces tratados con el alga seca adicionada al alimento antes y después de ser infectados superaron la infección en un 80% registrando diferencias significativas con el testigo. Así mismo los peces tratados con el extracto alcohólico de *O. capillare* registraron sobrevivencia mayor al 80% obteniendo diferencias significativas con el testigo y el extracto hexánico vía intramuscular y alimento, lo que nos indica que estos dos tratamientos fueron los que mostraron mayor efectividad en contra de *V. fluvialis*.

ABSTRACT

In the first stage of the present study it was proved, *in vitro*, the ability of extracts obtained from the: fresh water green alga *Oedogonium capillare*, lemon *Citrus limon* and mango *Mangifera indica*, order to inhibit the growth of 23 different bacteria species, either pathogenic for humans as of ichthyopathogenic importance, belonging to the families Pseudomonadaceae, Enterobacteriae, Aeromonadaceae and Vibrionaceae. The different wild bacteria strains were isolated from *Carassius auratus* fish, cultivated in aquaculture farms in the state of Morelos, Mexico. After their purification they were identified by API-20E and API-20NE technique. The algae were recollected from the ponds for their culture at Center of Biologic and Aquaculture Researchs of Xochimilco, lemon and mango were bought in a Mexico City's market. Once the organisms were dried and homogenized, the respective extracts were obtained by means of hexanic, alcoholic or hydrolytic extractions. In order to determine the antibiotic sensitivity of bacterias toward the extracts' activity the standardized system of diffusion disc tests was used. The antibacterial activity of commercial antibiotics of greater use in aquaculture was compared: kanamycin, chloramphenicol and tetracycline in relation to the natural origin extracts. The alkaline lysis technique was performed for the extraction of resistant plasmids to antibiotics, in order to determine their presence in all bacteria strains. Replicas of all the experiment were done using strains from American Type Culture Collection (ATCC). The behavior of the three extracts as antibacterial was compared with each of the commercial antibiotics by means of a Pearson correlation analysis. High coefficients of correlation were obtained between the performance of hexanic extract of the alga and the antibiotics used in this study. The antibacterial activity of *O. capillare* is more related with the activity of kanamycin than with the activity of the other two antibiotics. Low coefficients of correlation were obtained between the antibacterial activity of the remaining extracts and commercial antibiotics. In collection strains greater antibacterial activity of extracts were registered, the average diameter of inhibition halo of the four bacteria families in this group was greater than the wild

group, possibly due to presence of plasmids-R in this last group. To carry out the test *in vivo* corresponding to second stage of the experiment and verify antibacterial capacity of the *O. capillare* extract, the use of this was instrumented in different stages: in the first one, activity of the hexanic extract of *O. capillare* was proved from the administration of the treatment through the three pathways: feed, intramuscular and baths after the fish had been experimentally inoculated with 1 mL of 10^4 ufc/mL of the *V. fluvialis* bacteria for every 100 gr of fish. The use of the extract by this pathways was not effective. Based on the obtained results a second stage was designed in which the different treatments were administered before and after experimentally provoking the infection. It was registered that fish treated with the dry alga added to feed before and after being infected overcame the infection in 80% registering significant differences with the control group. Thereafter, the fish treated with alcoholic extract of *O. capillare* registered a major survival of 80% obtaining significant differences with the control group and the hexanic extract intramuscularly and orally, what indicates that these two treatments showed greatest efficiency against *V. fluvialis*.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista económico el cultivo de peces es una actividad que puede utilizarse como un eficaz método para incrementar la producción de alimento tanto para consumo humano y animal como para crear nuevas fuentes de ingresos que permitan la diversificación de la economía regional. Otras finalidades del cultivo de peces consisten en la repoblación, así como el mejoramiento y la comercialización de peces de ornato (Wheaton, 1982).

En México se ha desarrollado la acuicultura con fines de consumo humano, deportivo y esparcimiento. Sin embargo, últimamente el “acuarismo” ha cobrado fuerte interés como estrategia importante de ingreso económico (Negrete *et al.*, 2004b).

El valor total del comercio a nivel internacional de peces de ornato al mayoreo se estima en 900 millones de dólares. El valor estimado de la reventa (menudeo) del pez de acuario es de tres mil dólares mientras que el costo del pescado para consumo humano es de tres dólares por kg, aproximadamente; el precio del pez de ornato es de 300 dólares por kg (Bernabé, 1989; Negrete *et al.*, 2004b).

Dentro de la Familia Cyprinidae se encuentran una gran variedad de especies que se cultivan para su venta como ornato, una de las especies principales sometidas a cultivo a nivel mundial es el pez dorado (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758), por lo que es de las especies que mayor cantidad de variedades tiene (Bardach, 1986); comúnmente este pez es conocido como pez dorado, es de origen oriental y posee una gran belleza, misma que lo ha llevado a ser una de las especies de mayor demanda comercial tanto en Europa como en México (Milis y Beber, 1995).

Esta especie pertenece a la familia *Cyprinidae* (Ciprínidos), tiene un tamaño de hasta 25 cm. Si bien las carpas son de color gris oliva, actualmente, y debido a múltiples cruces, el color y la forma es difícil de describir, pero en general carecen

de dientes verdaderos, en su lugar poseen callosidades dentales en la garganta, que actúan contra una placa palatal. Las aletas son angostas y su boca es protractil. Los perfiles superior e inferior son convexos. Carecen de aleta adiposa; la aleta caudal es marginada y dotada de dos lóbulos iguales. Se trata de un pez ovíparo que alcanza la madurez sexual a los tres años, siendo fecundados los huevos externamente por el macho. Son omnívoros, no presentan ningún tipo de problemas de alimentación con base en hojuelas, principalmente las preparadas para peces de agua fría (Bardach, 1986).

Las granjas acuícolas son cuerpos de agua modificados con fines de cultivo para diferentes organismos acuáticos (Landaw, 1991). La eficiencia de una granja acuícola se puede determinar con base en diversos aspectos como la productividad, la calidad del producto, la resistencia a enfermedades y a factores ambientales entre otros (Ponce, 1991).

El cultivo de peces se ve frecuentemente afectado por variaciones ambientales, procedimientos inadecuados de manejo, alta densidad de poblaciones, uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, temperatura desfavorable, e inadecuada calidad química del agua. Todos estos factores provocan gran estrés en los peces, que les ocasiona importantes alteraciones fisiológicas y disminución en sus mecanismos de defensa, lo que los hace más susceptibles a las enfermedades infecciosas ocasionadas por patógenos oportunistas que están presentes en el ambiente.

Las enfermedades infecciosas constituyen un factor importante que limita considerablemente el potencial productivo y comercial de las empresas acuícolas (Torreola, 1988).

Los factores biológicos son en general causantes de un gran número de pérdidas en la acuicultura debido a la gran diversidad de organismos que existen en el

agua, entre los cuales están los virus, las bacterias, los hongos, los protozoos y los metazoos (Brown, 2000)

Las infecciones causadas por bacterias en granjas acuícolas, provocan mortalidades muy elevadas (Roberts, 1981), produciendo graves pérdidas económicas, sobre todo a los grupos rurales que las cultivan. Estos patógenos pueden ser parte de la microbiota bacteriana normal tanto del agua como de los mismos organismos, o pueden ingresar a los organismos por contagio, vertical y horizontal, de los peces que son incorporados al sistema de cultivo sin previa cuarentena y por medio del agua o del alimento (Austin y Austin, 1999).

En peces *Carassius auratus*, se han registrado diferentes infecciones bacterianas, como la septicemia hemorrágica causada por: *Pseudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio parahaemolyticus*, las cuales también pueden provocar gastroenteritis en el humano (Lee *et al.*, 1981). Algunos patógenos que forman parte de la microbiota normal de los peces, pueden también ser nocivos para el humano, como es el caso de *Vibrio cholerae* (Lamothe, 1991).

Negrete *et al.*, (2004) comprobaron la capacidad que tiene *Vibrio fluvialis* para causar infecciones en *Carassius auratus*, obteniendo que esta bacteria es un patógeno altamente virulento con DL_{50} de $10^{4.5}$ ufc/mL y que se transmite por contacto directo.

Para prevenir estas infecciones los acuicultores aplican de manera indiscriminada antibióticos como la oxitetraciclina y tetraciclina así como el cloramfenicol y kanamicina en grandes cantidades, ya sea en los estanques o incorporado al alimento, así mismo, los utilizan rutinariamente como factor de crecimiento (Romero y Salas, 1993; Madigan *et al.*, 2000).

Un antibiótico es una sustancia derivada de un ser vivo capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de una población bacteriana (Arista, 2005). Algunos antibióticos pueden hacerse más efectivos mediante modificaciones químicas; son los llamados antibióticos semisintéticos. Existen antibióticos de amplio espectro, es decir, que actúa tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas y antibióticos de corto espectro que sólo actúan en contra de un grupo de organismos (Madigan *et al.*, 2000).

Gran número de antibióticos son agrupados con base en su estructura química. Los principales grupos de antibióticos son las sulfas, las penicilinas y los aminoglicósidos. Este último grupo de antibióticos es uno de los más utilizados en la acuicultura; los antibióticos aminoglicósidos contienen en su estructura aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos a otros aminoazúcares. En este grupo se encuentran antibióticos como la estreptomicina, la kanamicina, la gentamicina y las tetraciclinas. Los antibióticos aminoglicósidos se utilizan para el tratamiento de bacterias Gram negativas; estos actúan inhibiendo la síntesis de proteína interfiriendo con la unidad 30 S del ribosoma (Madigan *et al.*, 2000).

En la acuicultura los tratamientos con antibióticos se pueden aplicar ya sea en el agua, por medio de baños, combinados con el alimento, y cuando los organismos son de alto valor para la granja, como pueden ser los reproductores, se les puede dar tratamiento individual dosificando al organismo intramuscularmente. Para cada infección que presente el cultivo en una granja acuícola se debe llevar a cabo un análisis adecuado de la misma, identificando el patógeno y posteriormente seleccionando el tipo de antibiótico que se va a aplicar, la dosis y la vía de administración del mismo (Brown, 2000), con el fin de no provocar resistencia en las cepas bacterianas que conforman la flora bacteriana de los peces en cultivo en la granja y así contrarrestar con mayor facilidad las epizootias.

Sin embargo, en la práctica, los acuicultores no tienen estos cuidados por lo que los antibióticos son utilizados indiscriminadamente provocando que las células

bacterianas desarrollen resistencia a estos a través de plásmidos, los cuales son elementos genéticos extracromosomales llamados factor R, estos plásmidos contienen genes que codifican nuevas enzimas que inactivan al antibiótico, o genes que evitan la incorporación o bien bombean hacia fuera al antibiótico. Los plásmidos resistentes a los antibióticos aminoglicósidos contienen enzimas que modifican químicamente a los antibióticos, bien por fosforilación, acetilación o adenilación (Madigan *et al.*, 2000). Los plásmidos se transfieren genéticamente por conjugación, trasducción o transformación (Davis, 1990) y que promueven la transferencia cromosomal. Son considerados, por lo tanto, elementos importantes para la evolución de las células bacterianas que les confieren la capacidad de resistir los efectos tóxicos de los antibióticos y esta capacidad la pueden heredar a su descendencia y/o transmitirla de forma horizontal (Tortora *et al.*, 1997).

Aunado a esto, los antibióticos de origen químico utilizados en los cultivos de peces se administran mezclándolos con el alimento que se dispersa en el agua, dosificándose directamente al ambiente y produciendo altos niveles de contaminación ambiental ya que disueltos en agua difícilmente se degradan, asociado a esto los peces absorben los antibióticos (como la oxitetraciclina) por medio del tracto intestinal de una forma muy lenta (Miranda y Zemelman, 2002), provocando que los organismos en cultivo no asimilen los antibióticos adecuadamente y si se le suma el hecho de que los acuicultores no esperan el tiempo reglamentario de desintoxicación de los peces, vendiendo el producto para consumo antes de tiempo, los plásmidos y los antibióticos son adquiridos por los consumidores (Álvarez *et al.*, 1999).

El surgimiento de ambientes selectivos cada vez más agresivos para las bacterias, como los hospitales, industrias y actividades agropecuarias como la acuicultura, donde se utilizan una gran cantidad de antimicrobiales como prevención y tratamiento de infecciones, han aumentado la capacidad y la frecuencia en la incorporación de genes resistentes en las bacterias. Por otra parte la cada vez

más degradada calidad sanitaria en las comunidades establece rutas de diseminación de los microorganismos resistentes (Mirelles – Pereira *et al.*, 2002).

Con base en lo anterior, es importante buscar nuevas alternativas naturales no solamente para prevenir las infecciones bacterianas, sino también para evitar el uso de antibióticos y como consecuencia la proliferación de plásmidos que son responsables de la resistencia a antibióticos. Estas alternativas han sido consideradas como prácticas no agresivas para los organismos (Austin *et al.*, 1992).

Actualmente, plantas medicinales incluyendo entre ellas a una gran variedad de algas tanto de agua dulce como de ambientes marinos, se emplean para preparar tinturas y extractos, o como materia cruda para obtener sus principios activos. La medicina herbolaria ha obtenido resultados satisfactorios como antibióticos, antisépticos y antimalariales, al dosificar los componentes químicos y farmacológicos (Lima *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que algas marinas de diferentes especies poseen alto efecto bactericida contra: *Alteromonas macleodii*, *A. rubra*, *A. undina*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Vibrio spp* (Austin y Billaud, 1992).

Otros extractos obtenidos de algas han demostrado potente efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia bacteriana así como propiedades antimicrobianas contra patógenos de organismos acuáticos, de ésta forma Immanuel *et al.* (2004), han comprobado la capacidad antibiótica de *Sargassum wightii* y *Ulva lactuca* contra *Vibrio parahaemolyticus* en camarón, esta última al igual que las algas verdes marinas *Sphaerococcus coronopifolus*, *Enteromorpha linza*, *Cladophora coelothrix*, *Oodium tomesitosum*; algas cafés: *Colopomenia sinuosa*, *Padina pavonica*; algas rojas *Gelidium sp.*, *Laurencia obtusa*, *Polisiphonia sp.*, *Hyphenia museoformis* y *Galaxuara rugosa* también poseen actividad antimicrobial contra *Staphylococcus aureus*. Contra *Escherichia coli*, enteropatógenos de humanos,

registraron actividad las algas verdes, dulce acuícolas: *Spirogyra* sp., *Chara* y *Cladophora* (Mesmar y Abussaud, 1991; Samira-Etahiri *et al.*, 2001).

Por otro lado Wijffels *et al.* (2003), reportan en diferentes especies de *Laurencia majuscula* y *L. obtusa*, potente actividad contra bacterias patógenas de humanos como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp.

En patógenos de peces se han probado específicamente el pino, el ajo, la cebolla, la manzanilla cabezona, la esencia de clavo, el colorín, la castaña, sin respuesta, ya que sólo tienen efectos sobre algunos nemátodos, virus y protozoarios y no con bacterias (Ocampo y Auró, 1996).

Abutbul *et al.* (2004), utilizaron la planta del romero (*Rossmarinus officinalis*) para inhibir al *Streptococcus iniae* inoculado en tilapia, obtuvieron un efecto bacteriostático que inhibió su crecimiento, además demostraron de esta forma el potencial que puede tener un tratamiento alternativo con base en plantas. Abutbul *et al.* (2005), efectuaron la evaluación de la capacidad antibacterial de 104 plantas desérticas y encontraron que *Hammada scoparia* inhibió a *Aeromonas hydrophila* y a *Vibrio alginolyticus*; *Streptococcus iniae* fue inhibido por *Ochradenus baccatus* y *Raseada stenostachya*, todas estas bacterias patógenas de peces.

El alga *Oedogonium capillare*, pertenece a la familia *Oedogoniaceae* (Chlorophyta), es filamentosa, está constituida de células vegetativas cilíndricas de 36-38 µm de diámetro y 36-210 µm de longitud, esta especie es dioica, posee estructuras reproductoras masculinas llamadas macrandros con anteridios de 30-48 µm de longitud, las estructuras femeninas u oogonios son solitarios y cilíndricos, abiertos en la parte superior por un poro que va de 30-50 µm de diámetro y 45-75 µm de longitud. Las oosporas son globoides u ovoides, con una pared opaca de 30-40 µm de diámetro y 35-64 µm de longitud (Tiffany y Britton, 1952; Hirn, 1960; Gauthier-Lievre, 1963).

Esta alga verde es planctónica o bentónica, común en cuerpos de agua dulce (Landaw, 1991), suele ser benéfica para los acuarios si se mantiene en cantidad moderada. Muchos peces e invertebrados suelen alimentarse de ella (Smith, 1992). Se encuentra fácilmente en México, su proliferación es abundante durante los meses de marzo a julio. Para esta alga existen varios usos conocidos: es usada para retener la humedad en plantas rígidas cuando éstas se transportan para su venta, además la presencia de estos organismos en Xochimilco permite el desarrollo de otras plantas y microorganismos asociados que los ajolotes (organismos endémicos y en peligro de extinción) utilizan como alimento, lo que les permite un mejor desarrollo de esta especie endémica, además de proveerlos de sombra y protección contra sus depredadores (Smith, 1992).

Además de las algas se ha detectado propiedades antibacterianas de plantas superiores como el tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rossmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*), bálsamo de limón (*Melissa officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), milenrama (*Achillea millefolium*), clavo (*Syzygium aromaticum*), granada (*Punica granatum*), jambolan (*Syzygium cumini*) y guayaba (*Psidium guajaba*) (Nascimento *et al.*, 2002); así como la actividad del extracto crudo que contenía pimiento rojo (*Capsicum frutescens*), limón (*Citrus limon*) y pera (*Opuntia vulgaris*) (Mtambo *et al.*, 1999).

El fruto del *Citrus limon* es un tipo especial de baya denominado hesperído, que consiste en una epidermis y una pulpa carnosa con diez segmentos característicos (carpelos) unidos alrededor de un eje central. La corteza o epidermis comprende dos partes, una exterior, coloreada o flavelo y una interior, blanca y esponjosa denominada alvedo. El flavedo está cubierto de cera y lleva numerosos lípidos. Los estomas quedan relegados a la parte de la corteza situada entre las glándulas de aceite (Whiteside *et al.*, 1996).

El limón (*C. limon*) cuenta con una producción anual de 1,252,774.86 ton de éstas 422.4 mil son procesadas por la industria, principalmente para la extracción de

aceites, donde se utiliza únicamente el jugo y en algunas ocasiones la cáscara, dejando un desperdicio de casi el 50% del producto (SAGARPA, 2004). Estos productos de desecho de limón tienen sustancias como la pectina que es una sustancia mucilaginoso que otorga a la pared celular la habilidad de absorber grandes cantidades de agua, y por lo tanto poder tener capacidad de inhibir el proceso infeccioso (Potiyevski *et al.*, 1991).

En diversos estudios se ha reportado en *C. limon* la presencia de pectinas, como compuestos de este fruto. La pectina es considerada una fibra no digerible y soluble que tiene efectos fisiológicos en el tracto gastrointestinal, entre estas actividades ayuda al vaciado gástrico retrasado reduciendo el tiempo de transición, disminuye la absorción de la glucosa, tiene la capacidad de absorber y gelificar el agua, además de ser un posible inhibidor de infecciones bacterianas (Potiyevski *et al.*, 1991; Olano – Martín *et al.*, 2002).

El fruto del mango, *Mangifera indica*, es una gran drupa carnosa monoembrionica, posee mesocarpo comestible de diferente grosor según los cultivares y las condiciones de cultivo. Su peso varía desde 150 g hasta 2 kg. Su forma también es variable, pero generalmente es ovoide-oblonga, notoriamente aplanada, redondeada, u obtusa a ambos extremos, de 4-25 cm de largo y 1.5-10 cm de grosor. El color puede estar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta. La cáscara es gruesa, frecuentemente con lenticelas blancas prominentes; la carne es de color amarillo o anaranjado, jugosa y sabrosa. La semilla es ovoide, oblonga, alargada, estando recubierta por un endocarpo grueso y leñoso con una capa fibrosa externa, que se puede extender dentro de la carne (Nakasone y Paull, 1999). Este fruto al igual que el limón tiene en su estructura pectina que es una sustancia que permite la acumulación de grandes cantidades de agua en las células, y que (Potiyevski *et al.*, 1991) Es un producto de gran demanda a nivel mundial, por lo tanto tiene un alto potencial económico. En el año 2004 su producción anual fue de 1,577,477 toneladas en México (SAGARPA, 2004). El problema con esta fruta radica en el gran desperdicio que de ella se

obtiene, ya que en el mango la cáscara y el hueso corresponden al 40 o 50 por ciento del peso bruto del producto, por lo tanto se requiere desarrollar tecnologías de aprovechamiento para estos desechos (PUA, 2003).

Con base en lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo probar *in vitro* e *in vivo*, la capacidad antibacteriana del alga *Oedogonium capillare*, del limón, *Citrus limon*, del mango, *Mangifera indica*, contra diferentes especies de bacterias, tanto silvestres como de colección, las cuales son patógenas de peces *Carassius auratus* y de otras especies acuáticas susceptibles a cultivo e inclusive para el humano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde los años cuarenta, el uso de antibióticos en el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano se hizo común (Garrod *et al.*, 1973). En los años setenta se comenzó a registrar la resistencia bacteriana a los antibióticos por medio de la adquisición y transferencia de plásmidos (factor R) debido al contacto frecuente de los antibióticos con las bacterias (Heinz y Reichenbach, 1982).

Aunado a esto se ha observado que las bacterias transfieren estos plásmidos de forma vertical y también entre especies, éste último aspecto se convierte en un problema de salud debido a que los seres humanos al tener contacto con las bacterias (por manipulación de los peces o por consumo de los mismos), adquieren las bacterias con los plásmidos y al presentarse una enfermedad por bacterias en los humanos los antibióticos se vuelven ineficientes (Angulo, 2000; Mirelles – Pereira *et al.*, 2002).

A nivel mundial, en la acuicultura se han utilizado antibióticos de origen químico durante mucho tiempo como tratamiento de las enfermedades bacterianas más comunes (Bromage *et al.*, 1994). Entre los antibióticos recomendados y registrados en las normas de salud agropecuarias de la mayoría de los países están la Oxitetraciclina, Cloramfenicol y Sulfadimetoxina trimetoprim (Brown, 2000).

La utilización de antibióticos en la acuicultura es de uso cotidiano, incorporados en el alimento, éstos se dispersan en el agua e indirectamente en el ambiente (Angulo, 2000), tomando en cuenta que a los peces se les alimenta dos veces al día (Omoregie, 2001), se les estarían aplicando dos dosis diarias de antibióticos en forma sistemática.

Esta práctica se asocia a estrategias de crecimiento y engorda de los organismos cultivados (Romero y Salas, 1993; Mandigan *et al.*, 2000), por lo que hoy en día la

resistencia bacteriana después del uso de antibióticos en la acuicultura se presenta en lapsos de tiempo muy cortos (Angulo, 2000).

Sumado a esto, se tiene que tomar en cuenta los elevados índices de contaminación que causa el uso irracional e indiscriminado de los antibióticos químicos debido a la gran dosificación del producto en el agua y a la difícil degradación de los antibióticos de origen químico en el ambiente (Angulo, 2000).

Debido al incremento de bacterias resistentes y a las continuas epizootias cortas después de los tratamientos, se sugiere que se deben hacer investigaciones con tratamientos alternativos de nulo o bajo impacto negativo para los peces para el hombre y para el ambiente así como el empleo de métodos profilácticos, debiendo ser ésta una prioridad (Dalsgaard y Madsen, 2000).

Se tienen que buscar sustancias activas alternativas para el control de bacterias patógenas de peces que se puedan utilizar de forma preventiva y/ o correctiva de las infecciones, sin afectar al hombre, a otros consumidores y al ambiente.

Así, en el presente estudio se propone el empleo de extractos de vegetales: *Citrus limon*, *Mangifera indica* y *Oedogonium capillare*, como alternativas naturales de control de infecciones de origen bacteriano en la carpa dorada (*Carassius auratus*).

OBJETIVOS

Objetivo general

Probar la capacidad antibacteriana de extractos vegetales de *Oedogonium capillare*, *Citrus limon* y *Mangifera indica*, como factores de control de infecciones de origen bacteriano en la carpa dorada (*Carassius auratus*), *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

- Obtener extractos vegetales a partir de *Oedogonium capillare*, *Citrus limon* y *Mangifera indica*.
- Aislar e identificar las cepas bacterianas obtenidas de peces con signos de infección.
- Evaluar la capacidad antibacteriana *in vitro* de los extractos obtenidos, directamente sobre bacterias patógenas de peces.
- Comprobar la capacidad antibacteriana *in vivo* de los extractos obtenidos, sobre peces inoculados con *Vibrio fluvialis* aislada de peces con signos de infección.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si los extractos obtenidos de *Oedogonium capillare*, *Citrus limon* y *Mangifera indica*, poseen capacidad antibacteriana, entonces peces *Carassius auratus* infectados experimentalmente con dosis infectiva de *Vibrio fluvialis*, recuperarán el estado “normal” de salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Adquisición de los organismos vegetales y obtención de los extractos

Los ejemplares de *O. capillare* fueron recolectados de estanques de cultivo de ranas, en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuáticas, en Xochimilco.

Cuando las algas presentaron crecimiento masivo, se recolectaron con red de cuchara y se seleccionaron manualmente los ejemplares más vigorosos tomando en cuenta su tamaño, estructura, pureza y color. La hojarasca y los desechos orgánicos circundantes fueron removidos de la superficie del agua antes de efectuar el muestreo. Las algas fueron identificadas en el laboratorio de Ficología de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, basándose en las descripciones de Gauthier y Lievre (1963); Hirn (1960) y Tiffany y Britton (1952).

Se recolectaron 45 kg, peso húmedo del alga, las cuales se lavaron bajo flujo constante de agua limpia, removiéndose de esta forma toda la materia extraña. El material se observó con microscopio de disección para determinar y verificar su estado de salud y completa limpieza. Las muestras se secaron en la oscuridad a 18° C para evitar la degradación de los pigmentos por efecto de la luz solar, y para evitar la pérdida de sus propiedades químicas.

Las algas fueron homogeneizadas con un homogeneizador eléctrico. El producto obtenido (2 kg) fue sometido a dos extracciones consecutivas con 1 L de hexano, a temperatura de reflujo durante 5 h. La primera extracción se concentró en un rotovapor de vacío y se obtuvo finalmente 150 g de extracto crudo, que fue empleado para efectuar las pruebas preliminares de su actividad antibiótica. La segunda extracción se llevó a cabo usándose una columna cromatográfica de sílica gel (230-400 mesh-Merck), y éter de cloroformo etílico (4:1 v/v) como eluyente; de ahí se obtuvieron seis fracciones para el análisis microbiológico.

Simultáneamente se colectó 1 kg más de alga *Oedogonium capillare*, a la cual también se le aplicó el proceso de lavado descrito anteriormente, estas algas se sometieron a extracción alcohólica, para ello se colocó el alga fresca y limpia en frascos color ámbar de 1 L ; a los frascos se les agregó 500 g de alga 500 mL de etanol y 250 mL de agua destilada, se cerraron perfectamente y se colocaron en un lugar fresco y sin luz. Los frascos ya preparados se dejaron reposar durante un mes agitándolos cada tercer día, pasado el mes de reposo los componentes de los frascos se filtraron para obtener el extracto final (Martínez, 1998).

En un mercado de la Ciudad de México se compraron 10 kg de *Citrus limon*, se les extrajo todo el jugo desechándolo ya que para este experimento sólo se ocupó la cáscara y el bagazo (Angulo, 2000).

Las cáscaras de *C. limon* se lavaron manualmente bajo el flujo constante de agua limpia, para remover toda la materia orgánica y organismos ajenos a ellos. Posteriormente se secó una porción de las cáscaras adquiridas en papel absorbente dentro de una estufa de calor seco a 40° C hasta que perdieron toda el agua, para hacer el proceso de extracción. Ya secas las cáscaras de *C. limon* se molieron con un mortero de porcelana hasta que quedaron pulverizadas. Del producto molido se tomó una muestra de 25 g y se colocó en un matraz con solución ácida a pH 3 a temperatura de 90° C, posteriormente se efectuó la hidrólisis ácida durante 60 min. Posteriormente el producto de la hidrólisis se paso por filtros de fibra de vidrio, para obtener el extracto (Abutbul *et al.*, 2005).

Al mismo tiempo se tomaron 500 g de cáscaras limpias y frescas y se colocaron en un frasco color ámbar de 1L, se adicionó 500 mL de etanol y 250 mL de agua destilada, posteriormente el frasco se cerró y se colocó al abrigo de la luz durante treinta días, se agitó cada tercer día. Posteriormente, treinta días después, se filtró el material para así obtener el extracto (Martínez, 1998).

Para obtener el extracto a partir de *Mangifera indica* se compraron 10 kg de su fruto en un mercado de la Ciudad de México, a los cuales se les removió manualmente las cáscaras desechando la pulpa y el hueso, se trasladaron al laboratorio y se lavaron manualmente bajo el flujo constante de agua limpia, para remover toda la materia orgánica y organismos ajenos a ellos. Posteriormente se secó una porción de las cáscaras, en papel absorbente dentro de una estufa de calor seco a 50° C, hasta que perdieron toda el agua, para hacer el proceso de extracción. Las cáscaras de *M. indica* secas, se sometieron al proceso de molido con un mortero de porcelana hasta que quedaron pulverizadas. La molienda obtenida de la cáscara del mango se sometió a hidrólisis ácida durante 75 min a pH 3.2 y temperatura de 90° C. El producto de la hidrólisis se paso por filtros de fibra de vidrio, para obtener el extracto (Abutbul *et al.*, 2005).

La porción de mango que no se secó se colocó en frascos de cristal de color ámbar de 1 L y se le agregó alcohol etílico comercial y agua destilada en proporción 2:1, finalmente los frascos se cerraron y se dejaron reposar durante un mes removiendo el material cada tercer día; al término de este periodo se coló el extracto obtenido (Martínez, 1998).

Pruebas *in vitro* con las cepas bacterianas

Las bacterias silvestres se obtuvieron de 30 peces *Carassius auratus* cultivados en granjas del estado de Morelos, los cuales presentaron signos y lesiones de bacteriosis: exoftalmia, úlceras en la piel, aletas hemorrágicas, forúnculos, patrones alterados de nado y boqueo en la superficie del agua (Austin y Austin, 1999).

Los peces infectados se extrajeron de los estanques de cultivo con una red de cuchara, se colocaron en una tina con agua y fueron anestesiados con sulfometano de tricaína (0.1 g/L), la superficie del cuerpo de cada uno de los peces se desinfectó, pasando por ella un algodón con alcohol. Después de

practicada la eutanasia, se efectuaron las disecciones haciendo cortes por arriba de la línea lateral y a lo largo del cuerpo, desde el opérculo y hasta el ano, exponiendo de esta manera el riñón (Roberts, 1981; Michel, 1980; Munro, 1982). Las muestras de riñón de los peces se extrajeron con una asa bacteriológica estéril, se sembraron en tubos con agua peptonada alcalina (pH 9) y se incubaron a 20° C durante 24 h. Posteriormente, se sembraron en placas de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) e infusión cerebro corazón (ICC) y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Las colonias obtenidas fueron sometidas al proceso de purificación por medio de resiembras sucesivas en placas agar del mismo medio de cultivo tantas veces como fue necesario dependiendo de la cepa y hasta obtener la homogeneidad en la morfología celular, se efectuó la tinción de Gram. Finalmente las cepas Gram negativas fueron identificadas usando las galerías comerciales API-20 y API-20E (Analytical Profile Index, 1997; 1989) y pruebas bioquímicas complementarias siguiendo los criterios de: Dalsgaard *et al.*, 1998; Altewegg *et al.*, 1990; Colwell *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1981; Furniss *et al.*, 1977; Cowan, 1974; Brenner *et al.*, 1983 y Holt *et al.*, 1994. Al grupo de bacterias aislado e identificado de los peces *C. auratus* extraídos de la granja del estado de Morelos se les nominó “silvestres” para propósitos de este estudio (cuadro 1).

Las cepas bacterianas de la American Type Culture Collection (ATCC): a) *Alcaligenes faecalis* (ATCC 35655) y *Flavobacterium marinum* (ATCC 9200); b) de la familia Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Serratia plymuthica* (ATCC 35656); c) de la familia Pseudomonadaceae: *Pseudomonas cepaciae* (ATCC9056) y *Pseudomonas aureginosa* (27853 ATCC); d) de la familia Aeromonadaceae: *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654); y e) de la familia Vibrionaceae: *Vibrio alginolyticus* (17802 ATCC), (ATCC: Rockville, Maryland, EE.UU.); estas bacterias fueron elegidas debido a que son patógenos de peces y existía alta probabilidad de encontrarlas en forma

“silvestre” en los peces colectados de la granja del estado de Morelos. Este grupo fue nominado de “colección” para propósitos del presente estudio (Cuadro 2).

Las cepas de colección se sembraron en placas de agar (ACC), dependiendo de la especie, las cepas se incubaron a temperatura ambiente o a 35° C durante 24 h. A partir de los cultivos obtenidos, tanto las cepas “silvestres” como de “colección”, se sembraron en tubos con caldo de Möller y Hinton (M-H), hasta obtener turbidez 0.5 de Mc Farland (Díaz *et al.*, 1998); posteriormente cada cepa se sembró en forma estriada usando un hisopo estéril en placas de agar del mismo medio. Previamente, las cajas de Petri se dividieron en tres secciones iguales, después de 15 min de ser sembradas, las cepas en las placas de agar de M-H, en cada una de las secciones se colocó un disco de papel filtro de 0.5 cm de diámetro, previamente esterilizado e impregnado con 30 µg/mL del extracto obtenido a partir del *O. capillare*, *C. limon* y *M. indica*; además se impregnaron papeles filtro con 30 µg/mL de los antibióticos comerciales de mayor uso en acuicultura: kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina. Se agregaron como control dos discos de papel filtro impregnados uno con alcohol 96° y otro con hexano. Se incubaron a temperatura ambiente o a 35 °C, dependiendo de la cepa durante 24 h. Finalmente, los halos de inhibición se midieron con un vernier, incluyendo el diámetro de los discos (Barry y Thornsberry, 1985; Giono, 1983; Stanley, 1986) (Cuadros 1, 2 ,5 y 6). Se consideraron los halos mayores a 7 mm (SANOFI) para ser aceptados como respuesta sensible.

Obtención de plásmidos

Con el objeto de comprobar la resistencia bacteriana a los antibióticos, se efectuó la extracción de plásmidos, para lo que se empleó la técnica de lisis alcalina (Birnboim y Dolly, 1979). Las cepas tanto “silvestres” como de “colección” se sembraron en placas con agar de Luria- Bertani (LB), y se incubaron a 30° C, durante 24 h, posteriormente las colonias que crecieron se resembraron en tubos con 5 mL de caldo de LB, se incubaron a baño maría con agitación, a 30° C

durante 24 h. Se transfirieron 2 mL del cultivo a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 14000 g/seg durante 30 seg, y se removió el sobrenadante. La pastilla que permanece en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 μ l de solución de lisosima, esto se resuspendió agitándose con un vortex durante 1 min, posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregó 200 μ l de duodecil sulfato de sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después de lo cual se añadieron 150 μ l de Acetato de Sodio 3 M, nuevamente se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 14000 g/seg, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril, se añadieron 1000 μ l de etanol frío y se incubó 30 min para posteriormente centrifugarse 30 min a 14000 g/seg, se removió el sobrenadante, la pastilla se disolvió con 100 μ l de acetato de sodio 0.1M y tris 0.05M pH 8, reprecipitando en 300 μ l de etanol frío.

El sobrenadante se eliminó y se agregaron 10 μ l de solución amortiguadora de muestra 5X (sacarosa al 25%, acetato de sodio 5mM, azul de bromofenol al 0.05% y SDS al .1%) (Birnboim y Dolly, 1979).

Las extracciones se trataron con RNAsa pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de 0.01 μ g/mL, se incubaron en baño maría a 60 °C durante 10 min.

Se aplicaron 10 μ l de las muestras obtenidas en los pozos de los geles de agarosa al 0.6% para el análisis de electroforesis. Los geles se prepararon con amortiguador de Borato TB de corrida al 0.5X y 0.6X de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70 V de voltaje, 250 W de poder. Los geles se tiñeron durante 45 min y se revelaron con una solución de bromuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 μ g/mL. Una vez revelados los geles, se lavaron con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio y se colocaron en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías de los geles se tomaron con transiluminador con cámara fotográfica Polaroid instantánea con cartuchos de película polaroid 667.

Las extracciones procedentes de las cepas aisladas se corrieron en gel simultáneamente con el marcador de peso molecular conocido: GENE RULER™ 1kb DNA LADDER .

Las cepas de colección de la American Type Culture Collection (ATCC) a las que se les efectuó la extracción de plásmidos fueron; a) *Alcaligenes faecalis* (ATCC 35655) y *Flavobacterium marinum* (ATCC 9200); b) de la familia Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Serratia plymuthica* (ATCC 35656); c) de la familia Pseudomonadaceae: *Pseudomonas cepaciae* (ATCC9056) y *Pseudomonas aureginosa* (27853 ATCC); d) de la familia Aeromonadaceae: *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654); y e) de la familia Vibrionaceae: *Vibrio alginolyticus* (17802 ATCC), (ATCC: Rockville, MD, USA).

Todo el experimento se replicó tres veces, tanto para las cepas silvestres como para las cepas de colección registrándose en los cuadros 1, 2, 5 y 6 el promedio de la longitud de los halos obtenidos por especie.

Con base en la respuesta de los extractos para inhibir a las bacterias tanto “silvestres” como de “colección” se calculó la correlación de Pearson con base en la respuesta funcional de estos con los antibióticos comerciales más comúnmente utilizados en la acuicultura, kanamicina, oxitetraciclina y cloramfenicol, para evaluar la similitud en la respuesta funcional de los antibióticos con los extractos de *O. capillare*, *C. limon* y *M. indica* (Siegel y Castellan, 1988) (Cuadros 3 y 4).

Pruebas *in vivo*

Para efectuar las pruebas *in vivo*, se adquirieron en una granja del estado de Morelos 100 peces *C. auratus* sanos, con longitud total entre 10 y 15 cm. Los peces se sometieron a periodo de aclimatación y observación por lo que fueron colocados en una tina durante ocho días antes de ser inoculados. Se sustituyeron los peces que presentaron signos, lesiones o comportamiento “anormal” (boqueo, nado irregular, exoftalmia, anorexia, descamación o inflamación abdominal) por peces sanos (Roberts, 1994).

De las cepas aisladas e identificadas durante la fase *in vitro* del experimento se seleccionó a la cepa *Vibrio fluvialis* para inducir la infección en los peces *C. auratus*. Se utilizó una concentración de 10^4 ufc/mL, para producir únicamente signos de bacteriosis general (Negrete *et al.*, 2004a).

Los tratamientos a los que fueron sometidos los peces infectados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*, se aplicaron únicamente con *O. Capillare* (Figura 1) y no con *C. limon* y *M. indica*, debido a que tanto el extracto limón como el de mango tuvieron baja respuesta en las pruebas *in vitro*.

Para preparar el inóculo se extrajo de las placas de agar cerebro corazón (BHA), con una asa bacteriológica calibrada a 3mm de diámetro, tres asadas de la cepa *Vibrio fluviales*, se sembraron en viales con 50 mL de caldo BHI y se incubaron en baño maría con agitación a 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente los inóculos se diluyeron a la décima desde 10^7 y hasta 10^3 (APHA *et al.* 1992), para determinar la viabilidad del inóculo y la dosis infectiva (cantidad unidades formadoras de colonia por mililitro de inóculo administrado a los peces) y así obtener las diferentes concentraciones de inóculos.

Con los peces sometidos previamente a observación se implementaron diez acuarios con diez peces cada uno.

El inóculo se aplicó intramuscularmente sobre la región dorsal de los peces, previamente desinfectada con alcohol. Es importante establecer que tanto los acuarios experimentales como el acuario control se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que las que se registraron en los estanques de cultivo: a 22 °C, pH 7 y nitratos y nitritos con 5 mg/mL de cada uno de estos componentes.

En un primer acuario, (grupo control), los peces fueron inoculados con 1 mL de solución salina estéril al 0.8%, por cada 100 g de peso del pez (Michael, 1982), con el objeto de reproducir el impacto experimental sobre los peces de este grupo y observar el estrés producido por la inyección (Negrete y Romero, 1998b) (Figura 1).

El segundo acuario que se registró como testigo, únicamente se inocularon a los peces con 1mL de 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis* por cada 100 g de pez, pero no se les administró ningún tratamiento (Michael, 1982).

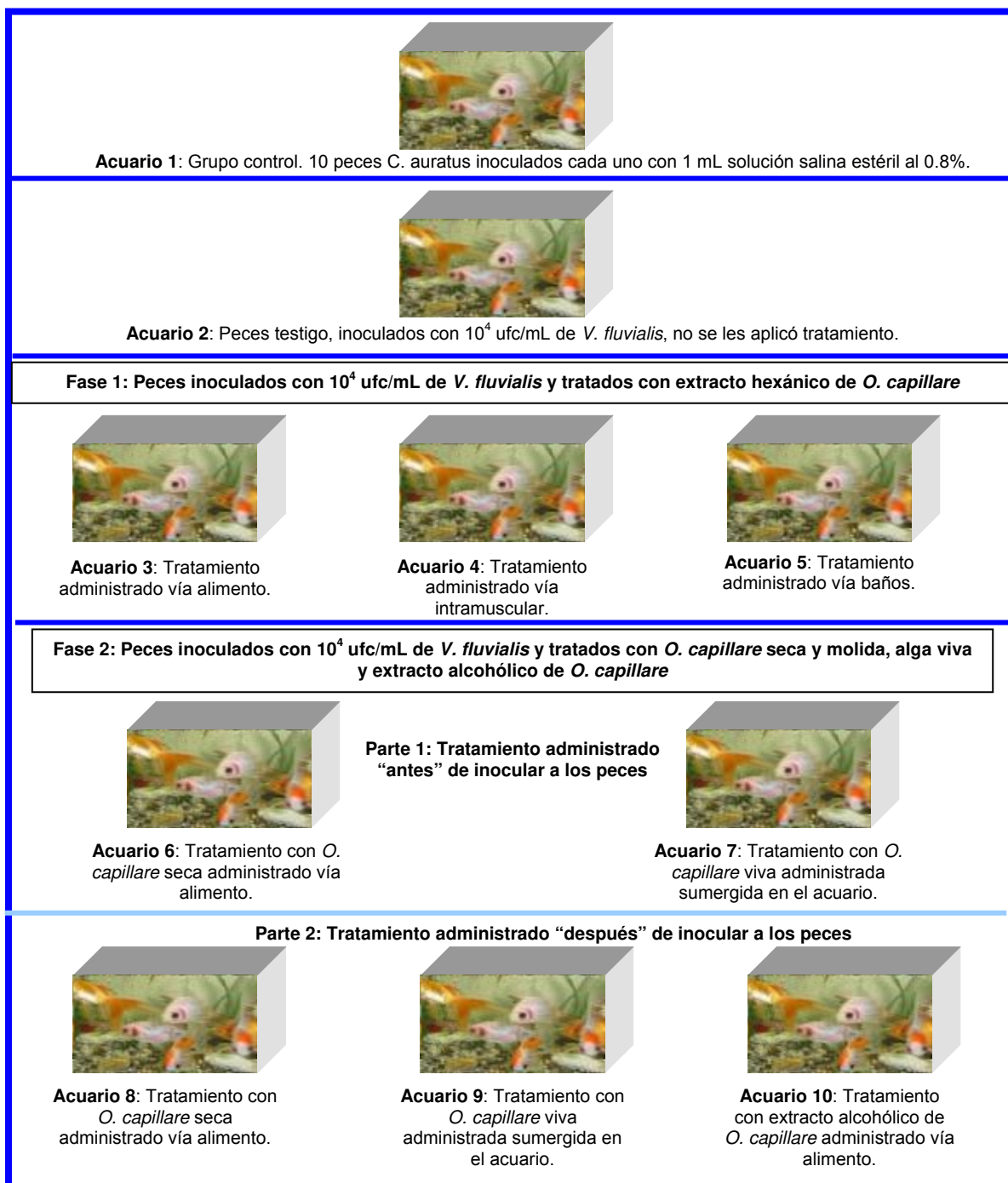
Para la fase 1 del experimento se implementó un primer grupo de tres acuarios (acuarios 3, 4 y 5), fueron inoculados también con la misma dosis de *V. fluvialis* del grupo testigo.

En el momento en que los peces inoculados de los tres acuarios piloto restantes iniciaron el cuadro clínico de bacteriosis, cada uno de los lotes experimentales se sometieron a diferentes vías de administración con el extracto hexánico del alga *O. capillare*, por un periodo de una semana (Figura 1).

A los peces del acuario 3 se les administró el tratamiento del extracto hexánico de *Oedogonium capillare* adicionado al alimento. El alimento se preparó mezclando 3 mL del extracto hexánico del alga en 1000 g de alimento comercial, se formaron pequeños pellets y se dejaron secar a temperatura ambiente. Ya secos los pellets se dieron de comer a los peces, sin embargo, los peces escupían el alimento por

lo que los pellets se recubrieron con aceite de hígado de bacalao para encubrir el sabor del extracto en el alimento y se administró 2 veces al día durante una semana.

Figura 1: Distribución de los acuarios para la aplicación de los diferentes tratamientos antes y después del inocular a los peces *C. auratus* con 10^4 ufc/mL.



Los peces ya inoculados con la dosis establecida con *V. fluvialis* del acuario 4 se trataron con el extracto hexánico del alga *O. capillare* por la vía de administración intramuscular. Dosificado en proporción de 4 mL de extracto por cada 100 g de peso del pez (Brown, 2000). Se prepararon jeringas de insulina cargadas con el extracto del alga filamentosa y cuando los peces iniciaron a presentar signos de infección se inyectaron sobre la región dorsal, previamente desinfectada con alcohol. Posterior a esto se hicieron las observaciones sobre la reacción de los peces al tratamiento diariamente durante una semana.

En el agua del acuario piloto 5 se adicionó la dosis 5 mL de extracto hexánico de *O. capillare* diariamente durante cuatro días (Brown, 2000). Los peces de este acuario se mantuvieron en observación durante ocho días.

La respuesta negativa de los peces al extracto hexánico de *O. capillare* en las pruebas piloto de la primera fase, indicó que se requería diseñar y probar nuevas formas de tratamiento con *O. capillare*, por lo que en esta investigación se implementó una segunda fase.

El desarrollo de la segunda fase del experimento *in vivo* se llevo a cabo en dos momentos diferentes: el primero (parte 1) se efectuó aplicando los diferentes tratamientos “antes” de inocular a los peces y el segundo (parte 2) se desarrolló con peces que fueron tratados “después” de ser infectados experimentalmente.

A los 10 peces del acuario 6, siete días antes de ser inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluviales*, se les administró el alimento preparado con el alga *O. capillare* seca y molida (sin extracción). Para la preparación del alimento se pesaron 100 gr del alga seca y molida y 100 g de alimento comercial para peces, ambos ingredientes se mezclaron hasta obtener una solución uniforme. A la mezcla se le adicionaron 10 mL de agar y se fusionó obteniendo una pasta, la cual se extendió y se dejó secar durante 72 h en una estufa de calor seco a 40 °C. El alimento seco se trituró y se administró a los peces dos veces al día.

El tratamiento utilizado con los 10 peces del acuario experimental 7 consistió en introducir en los acuarios 50 g de alga *Oedogonium capillare* viva y limpia siete días antes de que los peces fueran inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*.

En el acuario 8, a la misma cantidad de peces *C. auratus* se les aplicó el tratamiento en cuanto presentaron signos de bacteriosis posterior al inóculo de 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*, para este tratamiento se utilizó el alimento preparado con el alga *O. capillare* seca y molida (sin extracción). El alimento se les proporcionó a los peces dos veces por día durante siete días.

En el acuario experimental 9 al igual que en el acuario 7 el tratamiento consistió en introducir en los acuarios 50 g de alga *Oedogonium capillare* viva y limpia, el alga se colocó en cuanto los peces presentaron signos de infección después de ser inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*.

En el último acuario experimental (10) se administró el tratamiento en el alimento con el extracto alcohólico de *O. capillare* integrado, el cual se incorporó al alimento comercial para peces por el método de evaporación de alcohol descrito por Guerrero (1975) tomado de Marañón y Maya (1999). Se mezclaron 100 g de alimento seco con 100 mL del extracto alcohólico del alga, se dejó evaporar el alcohol para que el extracto se incorporara al tratamiento y se inició a administrar al día siguiente del inóculo, cuando los peces presentaron signos de infección. Se alimentaron de esta forma a los peces dos veces al día durante siete días.

A partir de ese momento y hasta la muerte de los individuos, o bien, la superación de la infección, se registraron los cambios de comportamiento, los signos y lesiones causados por la infección que mostraban los individuos tanto del grupo control como experimentales.

Para evaluar si existen diferencias entre los tratamientos, en relación a los signos y lesiones producidas por la infección, se realizó la prueba de rangos de Kruskal-Wallis (Siegel y Castellan, 1988). Además se realizó una comparación múltiple de las medias de los tratamientos obtenida de la suma de rangos de Wilcoxon (Siegel y Castellan, 1988).

RESULTADOS

Pruebas *in vitro*

Las cepas bacterianas aisladas de los peces de ornato *Carassius auratus* pertenecen a diferentes especies de las familias: a) Enterobacteriaceae: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp, *Serratia plymuthica*; b) Pseudomonadaceae: *Pseudomonas aeuroginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas vesicularis*; c) Aeromonadaceae: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sal. achromogenes*, *Aeromonas sal. masoucida*; y d) Vibrionaceae: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulmificus*, también se identificó la especie *Flavobacterium odoratum*.

Estas cepas fueron usadas para la fase *in vitro* del experimento y se registró su actividad como grupo “silvestre”.

Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de cada una de las cepas, tanto silvestres como de colección, se encuentran registrados en los cuadros 1 y 2.

Se puede observar que el extracto hexánico del alga *O. capillare* presentó actividad antibacteriana tanto en el grupo silvestre como en el de colección (cuadros 1 y 2).

Cuadro 1: Actividad antibiótica *in vitro* del extracto hexánico de *O. capillare* y los antibióticos comerciales en cepas bacterianas silvestres.

CEPA SILVESTRE	Extracto hexánico de <i>O. capillare</i> (mm)	Kanamicina (mm)	Cloramfenicol (mm)	Tetraciclina (mm)
<i>Flavobacterium odoratum</i>	0	0	0	0
Enterobacteriaceae				
<i>Citobacter freundii</i>	24	16	24	20
<i>Enterobacter agglomerans</i>	40	27	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
<i>Serratia plymuthica</i>	24	16	24	20
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0	0
Pseudomonadacea				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	30	20	20
<i>Pseudomonas cepacia</i>	45	45	45	45
<i>Pseudomonas diminuta</i>	22	24	23	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	40	30	20	20
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	45	31	11	12
<i>Pseudomonas putida</i>	20	21	11	0
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	14	23	30	14
Aeromonadaceae				
<i>Aeromonas caviae</i>	50	18	12	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	24	27	35	19
<i>Aeromonas salmonicida achromogenes</i>	16	17	35	21
<i>Aeromonas salmonicida masoucidal</i>	21	17	12	20
Vibrionaceae				
<i>Vibrio alginolyticus</i>	45	24	0	0
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor	15	20	21	9
<i>Vibrio fluviales</i>	45	22	25	26
<i>Vibrio hollisae</i>	45	30	12	9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19	24	9	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	20	19	0	0

Cuadro 2: Actividad antibiótica *in vitro* del extracto hexánico de *O. capillare* y los antibióticos comerciales en cepas bacterianas de colección.

CEPA DE COLECCIÓN	Extracto hexánico			
	De <i>O. capillare</i> (mm)	Kanamicina (mm)	Cloramfenicol (mm)	Tetraciclina (mm)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	56	0	20	0
<i>Flavobacterium marino</i>	16	19	0	16
Enterobacteriaceae				
<i>Escherichia coli</i>	46	20	17	
<i>Proteus vulgaris</i>	45	45	45	45
<i>Serratia plymuthica</i>	36	11	15	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	40	40	40
Pseudomonadaceae				
<i>Pseudomonas cepacia</i>	45	0	11	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58	24	20	26
Aeromonadaceae				
<i>Aeromonas caviae</i>	45	45	45	45
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45	45	45	45
Vibrionaceae				
<i>Vibrio alginolyticus</i>	45	22	11	16
<i>Vibrio campbellii</i>	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45	40	40	40
<i>Vibrio cholerae El Tor</i>	83	15	39	24
GRAM +				
<i>Bacillus subtilis</i>	56	22	19	10

En todas las familias bacterianas se presentó mayor actividad bactericida cuando se usó el extracto hexánico del alga, las familias Vibrionaceae y Pseudomonadaceae presentaron halos de inhibición de mayor diámetro, seguidas por las familias Enterobacteriaceae y Aeromonadaceae.

Cuadro 3: Coeficiente de Correlación de Pearson ($p < 0.05$) entre la actividad antibacteriana (mm) del extracto hexánico de *Oedogonium capillare* y antibióticos comerciales kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina contra cepas bacterianas silvestres.

CEPAS SILVESTRES	EXTRACTO	ANTIBIÓTICOS			CORRELACIÓN		
	<i>Extracto hexánico de O. capillare</i>	<i>Kn</i>	<i>Cl</i>	<i>Tc</i>	<i>O. capillare y Kanamicina</i>	<i>O. capillare y Cloramfenicol</i>	<i>O. capillare y Tetraciclina</i>
Enterobacteriaceae					1	0.34	0.34
<i>Citrobacter freundii</i>	24	16	24	20			
<i>Enterobacter agglomerans</i>	40	27	0	0			
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0			
<i>Serratia plymuthica</i>	24	16	24	20			
<i>Salmonella spp</i>	0	0	0	0			
Pseudomonadaceae					0.79	0.11	0.45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	30	20	20			
<i>Pseudomonas cepacia</i>	45	45	45	45			
<i>Pseudomonas diminuta</i>	22	24	23	24			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	40	30	20	20			
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	45	31	11	12			
<i>Pseudomonas putida</i>	20	21	11	0			
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	14	23	30	14			
Aeromonadaceae					(-).07	(-) .71	(-) .99
<i>Aeromonas caviae</i>	50	18	12	0			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	24	27	35	19			
<i>Aeromonas salmonicida achromogenes</i>	16	17	35	21			
<i>Aeromonas salmonicida masoucida</i>	21	17	12	20			
Vibrionaceae					0.6	0.05	0.42
<i>Vibrio alginolyticus</i>	45	24	0	0			
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor	15	20	21	9			
<i>Vibrio fluvialis</i>	45	22	25	26			
<i>Vibrio hollisae</i>	45	30	12	9			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19	24	9	0			
<i>Vibrio vulnificus</i>	20	19	0	0			
General					0.73	0.13	0.26

Kn - kanamicina, Cl - cloramfenicol, Tc - tetraciclina.

Cuadro 4: Coeficiente de Correlación de Pearson ($p < 0.05$) entre la actividad antibacteriana (mm) del extracto hexánico de *Oedogonium capillare* y los antibióticos kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina, contra cepas bacterianas de la American Type Collection (ATCC).

CEPAS DE COLECCIÓN	EXTRACTO	ANTIBIÓTICOS			CORRELACIÓN		
	<i>Extracto hexánico de O. capillare</i>	Kn	Cl	Tc	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>
					y Kanamicina	y Cloramfenicol	y Tetraciclina
Enterobacteriaceae					0.3	0.1	0.06
<i>Alcaligenes faecalis</i>	56	0	20	0			
<i>Escherichia coli</i>	46	20	17	0			
<i>Preotus vulgaris</i>	45	45	45	45			
<i>Serratia vulgaris</i>	36	11	15	0			
Pseudomonadaceae					1	1	1
<i>Pseudomonas cepacia</i>	45	0	11	13			
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	58	24	20	26			
Aeromonadaceae					1	1	1
<i>Aeromonas caviae</i>	45	45	45	45			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45	45	45	45			
Vibrionaceae					0.56	0.71	0.8
<i>Vibrio alginolyticus</i>	45	2	11	16			
<i>Vibrio campbellii</i>	0	0	0	0			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45	40	40	40			
Incerta sedis							
<i>Flavobacterium marino</i>	17	19	0	16			
Gram +							
<i>Bacillus subtilis</i>	56	22	19	10			
General					0.3	0.5	0.3

Kn - kanamicina, Cl - cloramfenicol, Tc - tetraclina.

El 50% de las cepas del grupo silvestre de las enterobacterias presentaron sensibilidad al extracto hexánico; específicamente *E. agglomerans* presentó mayor sensibilidad al extracto que a los antibióticos comerciales. *C. freudii* presentó

mayor sensibilidad, tanto al extracto como al cloramfenicol, que a la kanamicina y a la tetraciclina.

Al establecer el coeficiente de correlación de la actividad del extracto con cada uno de los antibióticos comerciales (cuadros 3 y 4) se obtuvo, que el extracto *O. capillare* presentó actividad antibacterial contra las enterobacterias de forma semejante a la kanamicina, la relación con la tetraciclina y el cloramfenicol no fue tan alta.

De las cepas de *Pseudomonas* el 57% presentó sensibilidad al extracto hexánico; *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. maltophilia* y *Ps. putida* registraron mayor sensibilidad para el extracto hexánico del alga que para cualquiera de los tres antibióticos. En contraste, *Ps. diminuta* y *Ps. vesicularis* fueron más sensibles a los antibióticos. Es notorio que en este grupo, *Ps. cepaciae* fue igualmente sensible tanto para el extracto hexánico del alga como para los tres antibióticos.

La actividad antibacterial del extracto hexánico de *O. capillare* está más relacionada nuevamente con la actividad de la kanamicina que con la actividad de los otros dos antibióticos.

El coeficiente de correlación de la actividad del extracto contra las especies de la familia de bacterias de las *Aeromonas*, grupo silvestres, fue negativo en relación con la actividad bactericida de los tres antibióticos usados, sin embargo, mostró poder más efectivo como bactericida dado que el 65% de las especies de este grupo presentó mayor sensibilidad al extracto hexánico algal; específicamente *Aeromonas caviae* fue marcadamente más sensible que todas las cepas, al formar el halo de inhibición de mayor diámetro, inclusive que las especies de las demás familias. El promedio de los tamaños de los halos de inhibición para las *Aeromonas* es marcadamente mayor que para los halos obtenidos con los otros tres antibióticos.

De las cepas de la familia de Vibrios, 65% registró mayor sensibilidad al extracto hexánico que a los antibióticos comerciales, mostrando relación con la actividad antibiótica de la kanamicina al registrar coeficiente de correlación de 0.6; *Vibrio fluvialis*, *V. alginolyticus*, y *V. hollisae* fueron notoriamente las especies de ésta familia más sensibles al extracto.

En todas las cepas de colección se presentó mayor actividad en el extracto hexánico de *O. capillare* que en las cepas silvestres. Se obtuvieron altos coeficientes de correlación entre la forma de actuar del extracto y los antibióticos (cuadros 3 y 4).

El promedio de los diámetros de inhibición de las especies de las cuatro familias bacterianas fueron mayores que las del grupo silvestre, específicamente para los casos en que se pudo comparar las mismas especies tanto silvestres como de colección: *E. coli*, *S. plymuthica*, *P. cepacia*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (cuadro 1), registraron halos de inhibición de menor diámetro que sus homologas de colección (cuadro 2). Con base en estos resultados se efectuó la extracción de plásmidos para comprobar si la presencia de este factor podría estar en las cepas silvestres alterando los resultados y confiriendo resistencias a las cepas que los portan contra los antibióticos. Como resultado del anterior procedimiento se obtuvo que todas las cepas silvestres portaron plásmidos-R, de manera contraria en las cepas de colección no se registró la presencia de plásmidos en ningún caso.

En el caso del extracto de *C. limon* obtenido por medio de hidrólisis ácida se observó que la actividad de este extracto es mínima comparada con la de los antibióticos kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina (cuadro 5 y 6).

El extracto hidrolítico de limón sólo provocó sensibilidad en dos de las cepas silvestres examinadas y en cuatro cepas de colección. Este extracto tuvo

coeficiente de correlación de 0.07 en cepas silvestres y de 0.06 en cepas de colección (cuadros 7 y 8).

Sin embargo, es importante comentar que se registró sensibilidad al extracto hidrolítico de *C. limon* por parte de las cepas *V. cholerae* El Tor, tanto silvestre como de colección, se observó en este caso incremento en la sensibilidad de la cepa de colección en comparación con la cepa silvestre, provocada posiblemente por la presencia de plásmidos en la cepa *V. cholerae* El Tor colectada de peces *C. auratus* cultivados en el estado de Morelos.

La respuesta del extracto hidrolítico de *M. indica*, en contra de las cepas de “colección” de la familia Aeromonadaceae es positiva ya que en las dos cepas de esta familia a las que se les aplicó la prueba las *Aeromonas* resultaron sensibles a este extracto, aunque cabe mencionar que la sensibilidad de estas cepas es limitada en comparación con la respuesta que tuvieron los antibióticos comerciales.

El extracto alcohólico de *C. limon* tuvo respuesta similar al extracto hidrolítico del mismo fruto, con porcentaje del 20% de antibacteriósisis en cepas silvestres y un 44% de antibacteriósisis en cepas de colección, con coeficientes de correlación bajos como lo demuestran los (cuadros 7 y 8).

En cuadros 5 y 6 se observó que el extracto alcohólico de *C. limon* provocó sensibilidad en las cepas tanto “silvestres” como de “colección” de *A. hydrophila*. Otra cepa que presentó elevada sensibilidad al extracto alcohólico del limón fue *V. fluvialis* con halo de inhibición de 16mm. La sensibilidad producida por este extracto en *Vibrio alginolyticus* fue mayor que la del cloramfenicol, pero el coeficiente de correlación entre estos dos extractos es de 0.25 en cepas silvestres y de 0.14 en cepas de colección, mostrando baja correlación entre estos.

Cuadro 5: Actividad antibiótica *in vitro* (mm) de los extractos hidrolíticos de *C. limon* y *M. indica*, de los extractos alcohólicos de *C. limon* y *M. indica* y de los antibióticos comerciales kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina en cepas bacterianas silvestres.

CEPA SILVESTRE	Extracto Hidrolítico de <i>C. limon</i>	Extracto Hidrolítico de <i>M. indica</i>	Extracto Alcohólico de <i>C. limon</i>	Extracto Alcohólico de <i>M. indica</i>	Extracto Alcohólico de <i>O. capillare</i>	Kanamicina
Enterobacteriaceae						
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0	0	0	0
Pseudomonadaceae						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	30
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0	0	0	0	0	45
<i>Pseudomonas diminuta</i>	10	9	0	0	0	24
Aeromonadaceae						
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	8	9	0	27
<i>Aeromonas sal. masoucidal</i>	0	0	0	0	0	17
Vibrionaceae						
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor	8	6	0	0	0	20
<i>Vibrio fluvialis</i>	0	0	16	17	16	22
<i>Vibrio vulnificus</i>	0	0	0	14	18	19

Cuadro 6: Actividad antibiótica *in vitro* (mm) de los extractos hidrolíticos de *C. limon* y *M. indica*, de los extractos *indica* y *O. capillare* y de los antibióticos comerciales kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina en cepas bacterianas de

CEPA DE COLECCIÓN	Extracto	Extracto	Extracto	Extracto	Extracto	Kanamicina C
	Hidrolítico de <i>C. limon</i>	Hidrolítico de <i>M. indica</i>	Alcohólico de <i>C. limon</i>	Alcohólico de <i>M. indica</i>	Alcohólico de <i>O. capillare</i>	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	0	0	0	0	0
Enterobacteriaceae						
<i>Escherichia coli</i>	8	6	0	0	0	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	17	13	28	40
Pseudomonadaceae						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	6	0	0	0	24
Aeromonadaceae						
<i>Aeromonas caviae</i>	0	19	0	0	0	45
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13	13	11	10	17	45
Vibrionaceae						
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	15	13	27	22
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	11	10	0	40
<i>Vibrio cholerae</i>	12	12	0	0	0	15

El extracto alcohólico de limón provocó mayor sensibilidad en las cepas de “colección” que en las “silvestres” debido probablemente a la presencia de plásmidos en las últimas.

La capacidad antibacteriana del extracto alcohólico de *M. indica* tuvo respuesta en tres cepas “silvestres” y en cuatro cepas de “colección”.

La mayor actividad de este extracto fue en contra de las cepas de la familia Vibrionaceae, ya que de 6 cepas probadas tanto “silvestres” como de “colección” el extracto alcohólico del mango presentó actividad inhibitoria en 4 cepas.

Al respecto la cepa *V. vulnificus* “silvestre” el extracto alcohólico de mango obtuvo una mayor respuesta que los antibióticos cloramfenicol y tetraciclina, que incluso no presentaron capacidad antibiótica en contra de él. La cepa que presentó mayor sensibilidad por parte del extracto alcohólico de *M. indica* que del antibiótico cloramfenicol fue *Vibrio alginolyticus*.

El último extracto probado en este trabajo fue el extracto alcohólico de *O. capillare*, que produjo una sensibilidad del 20% en las cepas silvestres y de un 33% en las cepas de colección, en general la actividad de este extracto es reducida, sin embargo, hay que hacer hincapié en la actividad que tuvo este extracto en contra de las cepas de la familia Vibrionaceae, ya que presentó una actividad inhibitoria de la mitad de las cepas probadas.

La prueba de correlación aplicada a los extractos tanto hidrolíticos como alcohólicos de limón y mango y del alga, demuestran la reducida efectividad que tienen estos extractos para inhibir el crecimiento bacteriano en comparación con los antibióticos de uso común en la acuicultura (cuadros 7 y 8).

Cuadro 7: Análisis del coeficiente de correlación entre la actividad antibacteriana de los extractos: hidrolítico de *C. limon*, hidrolítico de *M. indica*, alcohólico de *C. limon*, alcohólico de *M. indica* y alcohólico de *O. capillare* con los antibióticos de uso común en la acuicultura kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina en cepas “silvestres”.

% CORRELACIÓN	Kanamicina	Cloramfenicol	Tetraciclina
Extracto hidrolítico de <i>C. limon</i>	0.0714	0.136	0.0375
Extracto hidrolítico de <i>M. indica</i>	0.0770	0.137	0.060
Extracto alcohólico de <i>C. limon</i>	0.120	0.329	0.252
Extracto alcohólico de <i>M. indica</i>	0.083	0.017	-0.044
Extracto alcohólico de <i>O. capillare</i>	0.000	-0.217	-0.148

Cuadro 8: Análisis del coeficiente de correlación entre la actividad antibacteriana de los extractos: hidrolítico de *C. limon*, hidrolítico de *M. indica*, alcohólico de *C. limon*, alcohólico de *M. indica* y alcohólico de *O. capillare* con los antibióticos de uso común en la acuicultura kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina en cepas de “colección”.

% CORRELACIÓN	Kanamicina	Cloramfenicol	Tetraciclina
Extracto hidrolítico de <i>C. limon</i>	-0.062	0.032	0.114
Extracto hidrolítico de <i>M. indica</i>	0.367	0.534	0.484
Extracto alcohólico de <i>C. limon</i>	0.480	0.148	0.312
Extracto alcohólico de <i>M. indica</i>	0.487	0.146	0.315
Extracto alcohólico de <i>O. capillare</i>	0.305	-0.025	0.134

Las pruebas testigo de discos impregnados con hexano y alcohol respectivamente, registraron que ni el hexano ni el alcohol por si solos provocaban inhibición de las bacterias evaluadas.

Es importante mencionar que de los seis extractos probados en este trabajo cuatro provocaron inhibición en la cepa *V. fluvialis*, la cual se mostró particularmente sensible al extracto hexánico de *O. capillare*.

Además *Vibrio fluvialis* mostró inhibición por parte de todos los extractos alcohólicos probados, sin embargo, es importante mencionar que en la prueba testigo *V. fluvialis* no presenta sensibilidad al alcohol.

Con base en lo anterior y en que *V. fluvialis* es un cepa que presenta alta virulencia $10^{4.5}$ (Negrete *et al.*, 2004) como patógeno tanto de peces como de humanos, se decidió hacer las pruebas *in vivo* con esta cepa silvestre colectada de *C. auratus* enfermos, cultivados en la granja del estado de Morelos.

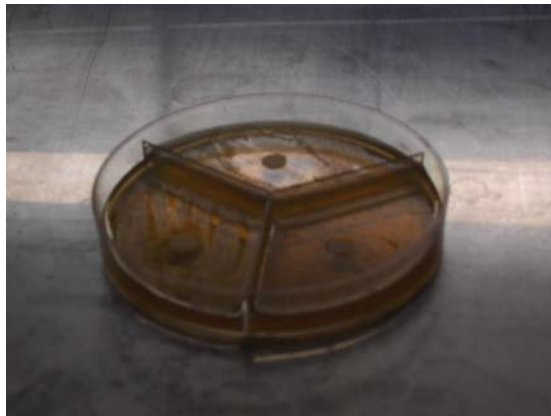


Figura 2: Halo de inhibición producido por el extracto alcohólico de *O. capillare* en *V. fluvialis*.

Pruebas *in vivo*

Los peces del grupo control presentaron signos provocados por el estrés de la inyección: edema en la piel, aletas erizadas, anorexia, comportamiento nervioso. A

las 24 h de haberse inoculado los peces *C. auratus* recuperaron el estado de salud inicial (cuadro 9).

Las pruebas *in vivo* se efectuaron con el extracto hexánico de *O. capillare* debido a que fue el que presentó actividad inhibitoria similar a la de los antibióticos comerciales en las pruebas *in vitro*.

La concentración de 10^4 ufc/mL de *Vibrio fluvialis*, permitió inducir la infección bacteriana a nivel general con los siguientes signos y lesiones: boqueo anormal, oscurecimiento de la piel, excesiva mucosidad, nado irregular, vientre abultado, anorexia, pérdida del apetito, descamación y hemorragias en las aletas, de los peces *Carassius auratus* (Austin y Austin, 1999).



Figura 3: Crecimiento de *Vibrio fluvialis* en TCBS.

En el acuario 2, grupo testigo (peces inoculados sin tratamiento) a las 24 h de ser inoculados todos los peces, *C. auratus*, presentaron signos generales de infección bacteriana. Al no aplicarse tratamiento, la infección progreso en un lapso de 72 h hasta acabar con el 80% de los peces del acuario, con manifestación de los siguientes signos (piel opaca, descamación, hemorragia en aletas y cola, exoftalmia, branquias oscuras, vientre abultado, anorexia, comportamiento anormal, nado errático, boqueo y mucosidad) el 20 % restante recuperó el estado de salud “normal” (cuadro 10).

Cuadro 9: Cuadro clínico presentado por los peces *Carassius auratus* d el lote control a 3 h de ser inoculados con 1 mL de solución salina estéril al 0.8%.

Características	Signo o lesión	Presencia
Coloración	Opaco	0%
Piel	Edema	100%
Piel	Protuberancia	0%
Escamas	Erizadas	100%
Escamas	Descamación	0%
Aletas y cola	Erosionadas	0%
Aletas y cola	Hemorragia	0%
Boca	Boqueo	0%
Branquias	Obscuras	0%
Branquias	Hemorragia	0%
Ojos	Exoftalmia	0%
Cuerpo	Vientre abultado	0%
Apetito	Anorexia	100%
Comportamiento	Nervioso	100%
Comportamiento	Anormal	0%
Nado	Lento	0%
Nado	Errático	0%
Secreciones	Mucosidad	0%

En la fase 1, los peces del tercer acuario iniciaron signos generales de infección bacteriana a 24 h de ser inoculados con descamación, hemorragia en aletas y cola, exoftalmia, vientre abultado, anorexia, comportamiento anormal, nado errático y mucosidad. En ese momento se aplicó el tratamiento. Los peces de este acuario rechazaron el alimento escupiéndolo, por lo que no comieron, provocando que la infección se agudizara, como consecuencia estos peces registraron y presentaron el mismo porcentaje de signos de infección y de organismos muertos del grupo testigo (cuadro 11).

Cuadro 10: Signos y lesiones de peces, *C. auratus*, del grupo testigo a las 72 h de ser inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*, sin tratamiento.

Características	Signo o lesión	Presencia
Coloración	Opaco	100%
Piel	Edema	0%
Piel	Protuberancia	0%
Escamas	Erizadas	20%
Escamas	Descamación	80%
Aletas y cola	Erosionadas	40%
Aletas y cola	Hemorragia	60%
Boca	Boqueo	100%
Branquias	Obscuras	40%
Branquias	Hemorragia	60%
Ojos	Exoftalmia	100%
Cuerpo	Vientre abultado	100%
Apetito	Anorexia	100%
Comportamiento	Nervioso	10%
Comportamiento	Anormal	90%
Nado	Lento	0%
Nado	Errático	100%
Secreciones	Mucosidad	90%
Sobrevivencia	Muertos	80%

Los peces del 4 acuario presentaron inicio signos de infección a las 24 h de haber sido inoculados. Se suministro el tratamiento inmediatamente después de la aparición de los signos. Estos peces sufrieron reacciones muy violentas como protuberancias en el área de la inyección, descontrol temporal en las funciones motrices, por lo tanto la infección bacteriana no fue superada, presentándose condiciones similares al grupo testigo (cuadro 11).

Cuadro 11: Signos y lesiones de peces, *C. auratus*, del acuario 3, 4 y 5, a 72 h de ser inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*, tratados con extracto hexánico *O. capillare*.

Características	Signo o lesión	Presencia		
		Acuario 3	Acuario 4	Acuario 5
Coloración	Opaco	60%	100%	0%
Piel	Edema	0%	0%	0%
Piel	Protuberancia	0%	100%	0%
Escamas	Erizadas	30%	100%	20%
Escamas	Descamación	70%	0%	80%
Aletas y cola	Erosionadas	40%	10%	70%
Aletas y cola	Hemorragia	60%	90%	30%
Boca	Boqueo	0%	100%	20%
Branquias	Obscuras	0%	0%	0%
Branquias	Hemorragia	60%	40%	20%
Ojos	Exoftalmia	100%	100%	100%
Cuerpo	Vientre abultado	100%	100%	40%
Apetito	Anorexia	70%	80%	30%
Comportamiento	Nervioso	70%	0%	100%
Comportamiento	Anormal	30%	100%	0%
Nado	Lento	20%	0%	0%
Nado	Errático	80%	50%	60%
Secreciones	Mucosidad	100%	100%	70%
Sobrevivencia	Muertos	80%	80%	20%

En el acuario 5, los peces inoculados presentaron signos generales de infección a las 24 h. Dentro de las siguientes 36 h el cuadro clínico de este grupo se agravó manifestándose hemorragia en las branquias, aletas y cola, además de que en algunos casos los peces perdieron el apetito, presentaron exoftalmia y vientre abultado. Después de recibir los baños con el extracto hexánico durante cuatro

días, los signos de infección desaparecieron en el 80% de los peces, recuperando su estado de salud inicial (cuadro 11).

Debido a la agresividad del extracto hexánico de *O. capillare* se diseñó una segunda fase con tratamientos suaves en donde el alga se administró de forma natural.

Cuadro 12: Signos y lesiones de peces, *C. auratus*, del acuario 6 y 7 registrados a las 72 h de ser inoculados, tratados con *O. capillare* seco adicionado en el alimento y con *O. capillare* vivo adicionado en el acuario respectivamente, administrados durante siete días antes de que los peces fueran inoculados.

Características	Signo o lesión	Presencia	
		Acuario 6	Acuario 7
Coloración	Opaco	0%	70%
Piel	Edema	0%	0%
Piel	Protuberancia	0%	0%
Escamas	Erizadas	80%	30%
Escamas	Descamación	20%	70%
Aletas y cola	Erosionadas	0%	80%
Aletas y cola	Hemorragia	10%	20%
Boca	Boqueo	20%	20%
Branquias	Obscuras	0%	40%
Branquias	Hemorragia	20%	20%
Ojos	Exoftalmia	20%	70%
Cuerpo	Vientre abultado	0%	100%
Apetito	Anorexia	20%	20%
Comportamiento	Nervioso	80%	100%
Comportamiento	Anormal	20%	0%
Nado	Lento	10%	0%
Nado	Errático	20%	100%
Secreciones	Mucosidad	40%	100%
Sobrevivencia	Muertos	20%	70%

En la parte 1 de la segunda fase, los peces del acuario 6 fueron tratados con alga seca adicionada en el alimento durante siete días antes del inóculo. Los signos y lesiones que presentaron, después de ser inoculados, desaparecieron a las 72 h. El 20 por ciento de los peces no superaron la infección (cuadro 12).

En el acuario 7 en el cual se introdujo el alga *O. capillare* viva siete días antes de inocular a los peces, inicialmente la reacción de los individuos fue de estrés, sin embargo, a las 24 h comenzaron a alimentarse de ella. Al ser inoculados con la dosis establecida, estos presentaron los signos de enfermedad infecciosa sobreviviendo solo tres de los diez peces en un periodo de 72 h (cuadro 12).

En la parte 2 de la segunda fase, todos los peces fueron tratados después de ser infectados experimentalmente con la dosis de *V. fluvialis* establecida previamente.

En el acuario 8, los signos generales de infección aparecieron después de 24 h de haber sido inoculados los peces. El tratamiento aplicado tuvo efectividad en el 70 por ciento de los peces, a las 72 h de iniciado el tratamiento (cuadro 13).

Cuando los peces del acuario 9 presentaron signos generales de infección, se agregó el alga viva. En este caso aunque los peces consumieron el alga, el 50 % de estos no reaccionaron al tratamiento y murieron (cuadro 13).

Por último los peces del acuario 10 tratados con el extracto alcohólico y suministrado en el alimento, después de manifestar signos de infección a las 24 h, superaron la infección a los cuatro días de tratamiento sobreviviendo el 90 por ciento (cuadro 13).

Cuadro 13: Signos y lesiones de peces *C. auratus* del acuario 8, 9 y 10, tratados con *O. capillare* seco adicionado en el alimento, con *O. capillare* vivo adicionado en el acuario y con extracto alcohólico *O. capillare* administrado con el alimento respectivamente, administrados después de que los peces fueron inoculados.

Características	Signo o lesión	Presencia		
		Acuario 8	Acuario 9	Acuario 10
Coloración	Opaco	30%	30%	0%
Piel	Edema	0%	0%	0%
Piel	Protuberancia	0%	0%	0%
Escamas	Erizadas	70%	50%	80%
Escamas	Descamación	30%	50%	20%
Aletas y cola	Erosionadas	20%	70%	40%
Aletas y cola	Hemorragia	20%	30%	10%
Boca	Boqueo	20%	0%	0%
Branquias	Obscuras	0%	20%	10%
Branquias	Hemorragia	20%	20%	10%
Ojos	Exoftalmia	40%	100%	20%
Cuerpo	Vientre abultado	20%	100%	20%
Apetito	Anorexia	0%	20%	20%
Comportamiento	Nervioso	70%	100%	90%
Comportamiento	Anormal	30%	0%	10%
Nado	Lento	20%	0%	10%
Nado	Errático	30%	100%	20%
Secreciones	Mucosidad	20%	50%	10%
Sobrevivencia	Muertos	30%	50%	10%

Para realizar el análisis estadístico correspondiente a las pruebas *in vivo* se adjudicaron valores arbitrarios por cada uno de los signos y lesiones presentadas. Así con los valores arbitrarios propuestos, se efectuó la conversión numérica de los signos y lesiones registrados por tratamiento a las 72 h de que los peces *C. auratus* fuesen inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvalis*.



Figura 4: Pruebas *in vivo* utilizando *O. capillare*. para inhibir la infección causada por *V. fluvialis* en peces *C. auratus*.

Al hacer la transformación cuantitativa se puede observar que existen diferencias entre los tratamientos, sin embargo, se requirió hacer una prueba estadística llamada Kruskal Wallis, para comprobar si realmente existen diferencias significativas entre los nueve tratamientos.

Cuadro 14: Suma de rangos de Wilcoxon para los tratamientos.

Tratamiento	N	Suma de rangos	Valor esperado según Ho	Desviación estándar según Ho	Media
Testigo	10	773.50	455.0	77.609413	77.350
Hexánico Alimento	10	597.50	455.0	77.609413	59.750
Hexánico Intramuscular	10	752.50	455.0	77.609413	75.250
Hexánico Baños	10	386.50	455.0	77.609413	38.650
Alga seca antes	10	205.00	455.0	77.609413	20.500
Alga viva antes	10	483.00	455.0	77.609413	48.300
Alga seca después	10	273.00	455.0	77.609413	27.300
Alga viva después	10	426.00	455.0	77.609413	42.600
Alcohólico alimento	10	198.00	455.0	77.609413	19.800

Ho: Hipótesis nula.

Debido a que los valores obtenidos en las pruebas *in vivo* no tienen distribución normal se instrumentó un análisis estadístico no paramétrico, basado en el análisis de una vía de la varianza por rangos de Kruskal Wallis y aplicar a los datos obtenidos la prueba de Wilcoxon de suma de rangos (cuadro 14).

Cuadro 14: Análisis de una vía de la varianza por rangos de Kruskal Wallis.

Prueba Kruskal-Wallis	
Chi-cuadrada	55.8203
Grados de libertad	8
Pr > Chi-cuadrada	<.0001

El análisis de Kruskal Wallis muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos al obtener una Pr > Chi-cuadrada <.0001. Aceptando la H0 que menciona que al menos uno de los tratamientos es diferente. Sin embargo, aún no se sabe entre que tratamientos existe diferencia, por lo que se realizó una comparación múltiple entre tratamientos (cuadro 17).

Para la comparación múltiple es necesario obtener la resta de cada una de las posibles comparaciones y a su vez compararla con el valor crítico para cada comparación (cuadro 17).

El análisis de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis muestra que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el testigo y el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía baños; el testigo y el *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo; el testigo y el *O. capillare* seco administrado vía alimento después del inóculo y el testigo y el extracto alcohólico de *O. capillare* administrado vía alimento (cuadros 16 y 17).

Cuadro 16: Claves de los tratamientos para el análisis de Kruskal Wallis.

Clave	# de Acuario	Tratamiento
A2	Acuario 2	Testigo
A3	Acuario 3	Extracto hexánico de <i>O. capillare</i> administrado vía alimento
A4	Acuario 4	Extracto hexánico de <i>O. capillare</i> administrado vía intramuscular
A5	Acuario 5	Extracto hexánico de <i>O. capillare</i> administrado vía baños
A6	Acuario 6	<i>O. capillare</i> seco administrado vía alimento antes del inóculo
A7	Acuario 7	<i>O. capillare</i> vivo adicionado en el acuario antes del inóculo
A8	Acuario 8	<i>O. capillare</i> seco administrado vía alimento después del inóculo
A9	Acuario 9	<i>O. capillare</i> vivo adicionado en el acuario después del inóculo
A10	Acuario 10	Extracto alcohólico de <i>O. capillare</i> administrado vía alimento

Este mismo análisis demuestra que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía alimento y *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo, y del primero con el extracto alcohólico de *O. capillare* administrado vía alimento (cuadros 16 y 17).

Por último el análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía baños; el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo; el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el *O. capillare* seco administrado vía alimento después del inóculo; el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el extracto alcohólico de *O. capillare* administrado vía alimento (cuadros 16 y 17).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ninguna de las otras comparaciones entre tratamientos.

Cuadro 17: Análisis de Kruskal Wallis entre tratamientos.

TRATAMIENTO	KRUSKAL WALLIS	SIGNIFICANCIA
A2-A3	17.60 \geq 36.1069	No significativa
A2-A4	02.10 \geq 36.1069	No significativa
A2-A5	38.70 \geq 36.1069	Significativa
A2-A6	56.85 \geq 36.1069	Significativa
A2-A7	29.05 \geq 36.1069	No significativa
A2-A8	50.05 \geq 36.1069	Significativa
A2-A9	34.75 \geq 36.1069	No significativa
A2-A10	57.55 \geq 36.1069	Significativa
A3-A4	-15.50 \geq 36.1069	No significativa
A3-A5	21.10 \geq 36.1069	No significativa
A3-A6	39.25 \geq 36.1069	Significativa
A3-A7	11.45 \geq 36.1069	No significativa
A3-A8	32.45 \geq 36.1069	No significativa
A3-A9	17.15 \geq 36.1069	No significativa
A3-A10	39.95 \geq 36.1069	Significativa
A4-A5	36.60 \geq 36.1069	Significativa
A4-A6	54.75 \geq 36.1069	Significativa
A4-A7	26.95 \geq 36.1069	No significativa
A4-A8	47.95 \geq 36.1069	Significativa
A4-A9	32.65 \geq 36.1069	No significativa
A4-A10	55.45 \geq 36.1069	Significativa
A5-A6	18.15 \geq 36.1069	No significativa
A5-A7	-9.65 \geq 36.1069	No significativa
A5-A8	11.35 \geq 36.1069	No significativa
A5-A9	-3.95 \geq 36.1069	No significativa
A5-A10	18.85 \geq 36.1069	No significativa
A6-A7	-27.80 \geq 36.1069	No significativa
A6-A8	-6.80 \geq 36.1069	No significativa
A6-A9	-22.10 \geq 36.1069	No significativa
A6-A10	00.70 \geq 36.1069	No significativa
A7-A8	21.00 \geq 36.1069	No significativa
A7-A9	05.70 \geq 36.1069	No significativa
A7-A10	28.50 \geq 36.1069	No significativa
A8-A9	-15.30 \geq 36.1069	No significativa
A8-A10	07.50 \geq 36.1069	No significativa
A9-A10	22.80 \geq 36.1069	No significativa

DISCUSIÓN

Cualquiera que sea el destino de los productos de la acuicultura, los centros de producción acuícola no siempre se encuentran operando en óptimas condiciones desde el punto de vista de la sanidad acuícola. La mayoría de las veces no cumplen con las normas oficiales sanitarias, en cuanto a los requisitos para la importación y exportación de individuos para cultivo, así como de puntos críticos (SEMARNAP, 1994^a; SEMARNAP, 1994b; SEMARNAP, 1995; Negrete y Romero, 1998a).

En estas condiciones sanitarias de manejo y producción se encontró la granja en donde fueron tomadas las muestras de los peces con signos de infección a partir de los cuales se aislaron las especies bacterianas estudiadas en el presente trabajo, registradas como “grupo silvestre,” pertenecientes a las cuatro principales familias bacterianas: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae* y *Vibrionaceae* que incluyen las especies de mayor importancia ictiopatógena (cuadros 1 y 2). La relación etiológica de algunas de ellas, con sus hospederos ha sido ya establecida experimentalmente como patógenos oportunistas (Kinkelin *et al.*, 1985; Negrete y Romero, 1998b), sin embargo, otras como: *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aerofasciens*, *Ps. malthophilia*, *Ps. vesicularis*, *Ps. aeuroginosa*, *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*, se consideran hasta el momento como patógenas para el humano, se desconoce el efecto que puedan tener para los cultivos acuáticos. Lo que viene a darle mayor importancia a la actividad de los extractos estudiados.

Para evitar las pérdidas económicas, ante el constante riesgo de epizootias, los acuicultores en la granja visitada, están haciendo uso de antibióticos como la kanamicina, el cloramfenicol, la oxitetracilina y la tetraciclina, como estrategia de prevención y control de infecciones en sus instalaciones, incorporándolos a las dietas (Lamothe, 1991) y administrándolos sistemáticamente. Estos antibióticos son administrados sin establecer previamente: la especie de bacteria que ha

infectado a la producción, el antibiótico específico que debe de ser usado contra la bacteria problema ni la dosificación requerida, por lo que las bacterias silvestres incluidas en el presente estudio, a diferencia de las cepas de colección, portaron plásmidos resistentes a los antibióticos antes mencionados, situación que podría estar agregando resistencia a la actividad antibacteriana del extracto del alga.

La presencia de plásmidos – R aislados de carne de pescado para consumo humano o con fines de acuicultura representan un problema de salud pública, debido a que los plásmidos pueden ser transmitidos a través de las bacterias que los portan, y provocan en los patógenos humanos la resistencia a los antibióticos.

En el presente estudio la diferencia entre los diámetros de los halos de inhibición entre las especies del grupo silvestre y de colección fue debido a la presencia de plásmidos-R, que le confirieron resistencia también contra los antibióticos usados en el experimento incluyendo los extractos.

La mayor actividad antibacterial, fue del extracto hexánico obtenido a partir del alga *O. capillare*, se manifestó en contra de las bacterias pertenecientes a las diferentes especies de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*, cepas que son de origen dulceacuícola y marinas por lo que presenta una buena alternativa para la acuicultura. El extracto hexánico presentó también efecto contra las bacterias patógenas para el humano, aun contra las Gram (+) estudiadas en el presente trabajo.

Futuros estudios deberán probar si el extracto hexánico de *O. capillare* tiene la capacidad de generar plásmidos resistentes.

El extracto hexánico de *O. capillare*, al ser de origen natural, cuenta con la bondad de ser biodegradable, por lo que no se puede considerar agente contaminante del ambiente.

El extracto de *Citrus limon*, obtenido con base en una hidrólisis ácida, tuvo poca eficiencia antibacteriana en contra de las cepas ictiopatógenas probadas en este trabajo, sin embargo, provocó sensibilidad en *V. cholerae* El Tor, que es un patógeno importante que se transmite por el agua o por el alimento (Madigan, *et al.*, 2000), por lo que es importante erradicar cualquier posibilidad de transmisión. De ahí la relevancia de la inhibición de esta cepa por el extracto del limón, sin embargo, al comparar la actividad inhibitoria en contra de *V. cholerae* El Tor de este extracto con los antibióticos de uso común en la acuicultura, este extracto no es la mejor opción para la inhibición de este patógeno.

La respuesta que tuvo el extracto hidrolítico de *M. indica*, fue mínima, aunque es importante mencionar la actividad que presentó en contra de las cepas de colección pertenecientes a la familia *Aeromonadaceae*, ya que estos patógenos son de los más importantes en la acuicultura provocando, septicemia hemorrágica y furunculosis en peces susceptibles a infección, por lo que es importante erradicar la posibilidad de una infección causada por *Aeromonas* (Brown, 2000). De esta forma al comparar la actividad antibacteriana del extracto hidrolítico de mango con la actividad de la kanamicina, el cloramfenicol y la oxitetraciclina, el primero no presentó alto nivel de inhibición en el grupo de colección de *Aeromonas*, incluso en el grupo silvestre este extracto no inhibió el crecimiento bacteriano; tal vez debido a la presencia de plásmidos en las cepas silvestres, si se toma en cuenta que en las granjas acuícolas la mayoría de las cepas contienen plásmidos (Miranda y Zemelman, 2002; Meirelles-Pereira *et al.*, 2002; Tendencia y de la Peña, 2001), el extracto hidrolítico de *M. indica* no tiene funcionalidad en la acuicultura.

El extracto alcohólico de *C. limon*, provocó sensibilidad en algunas de las cepas probadas en este trabajo, principalmente de las familias *Aeromonadaceae* y *Vibrionaceae*, ambas familias contienen un grupo importante de patógenos tanto de humanos como de organismos acuáticos, además suelen ser muy agresivas en el momento de la infección (Tortora, 1997), por lo que es de suma importancia

prevenir estas infecciones. Con base en los resultados obtenidos con el extracto alcohólico del limón en comparación con los antibióticos comerciales, se puede decir que a pesar de que el extracto inhibe algunas de éstas bacterias ictiopatógenas su actividad es limitada en comparación con la de los antibióticos más comúnmente usados en la acuicultura.

Los resultados obtenidos por el extracto alcohólico de *M. indica*, indican actividad de este en contra de bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, ya que su actividad estuvo concentrada en estas cepas. Los vibrios son bacterias responsables de causar septicemia hemorrágica en los peces, están considerados como patógenos primarios y son responsables de grandes epidemias en muchas especies cultivadas, aunque algunas del género de *Vibrio* actúan como patógenos oportunistas (Austin y Austin, 1999), por lo que es importante evitar las infecciones causadas por estas bacterias por ello es necesario inhibir el crecimiento de estos de manera puntual y oportuna por lo que en este caso al hacer una comparación de la actividad del extracto alcohólico de mango con la actividad de los tres antibióticos probados, estos últimos inhiben en mayor proporción el crecimiento de los vibrios ictiopatógenos, por lo tanto, el uso de este extracto tampoco sería redituable para la acuicultura.

En general la actividad antibacteriana del extracto alcohólico del *O. capillare* no fue eficaz para la mayoría de las bacterias, con excepción de los *Vibrios*, que presentaron halos de inhibición incluso mayores que los producidos por los antibióticos comerciales.

Por todo lo anterior se puede decir que aunque el *C. limon* ha tenido resultados sobre enfermedades víricas (Mtambo *et al.*, 2002), la respuesta pobre que tuvo sobre las bacterias patógenas, indica mínima actividad contra estos patógenos y por lo tanto poca viabilidad como alternativa de tratamiento en las granjas acuícolas.

En cuanto a los extractos hechos con *Mangifera indica*, los resultados muestran que a pesar que este no es dañino para los peces y que incluso se les puede dar como parte de su dieta diaria (Omoregie, 2001), este no tiene la actividad antibacteriana suficiente como para controlar infecciones ictiopatógenas.

El alga *O. capillare* fue la mejor opción para efectuar los experimentos *in vivo* ya que los dos extractos hechos con esta alga presentaron mayor eficiencia, principalmente el extracto hexánico de *O. capillare*, que incluso tuvo reacción inhibitoria igual y en algunos casos mayor que la obtenida por los antibióticos comerciales de uso común en la acuicultura.

El las pruebas realizadas *in vivo* el lote control presentó signos generales de infección a las tres horas de haber sido inyectados con solución salina estéril al 0.8%, esto se debió a que al ser inyectados los peces el sistema inmunológico se deprime y la carga bacteriana que se encuentra presente reacciona provocando los signos de infección, sin embargo, a las 72 h ya no presentaban signos de infección bacteriana.

En las pruebas realizadas con peces *C. auratus* utilizando el extracto hexánico de *O. capillare*, los resultados obtenidos en las pruebas vía alimento y vía intramuscular fueron negativas, ya que en el primer caso los peces rechazaron el alimento y en el segundo tuvieron reacciones muy violentas a la aplicación del tratamiento. La vía de administración del extracto hexánico, en baños, fue la más efectiva con una diferencia significativa entre la actividad antibacteriana de esta vía de administración en comparación con la vía de administración intramuscular ($36.60 \geq 36.1069$) y con el testigo ($38.70 \geq 36.1069$). Los costos requeridos en un tratamiento de este tipo, en estques de gran proporción, serían muy elevados dada la gran cantidad de extracto necesario. Tomando en cuenta que el costo de la producción del extracto hexánico de *O. capillare* es mayor que el de los antibióticos comerciales, el primero no sería adquirido ni utilizado por los acuicultores.

El extracto hexánico de *O. capillare* a pesar de ser el bactericida más efectivo de todos los probados *in vitro*, no fue eficaz en las pruebas *in vivo*, por lo que se diseñaron nuevas alternativas de la aplicación de esta alga generando dos tratamientos administrados en el alimento: a) seco adicionado a los pelets y b) extracto alcohólico impregnado en el alimento; y un tercer tratamiento sumergiendo el alga viva en el acuario.

El *O. capillare* seco adicionado en el alimento tuvo mayor efectividad que el extracto hexánico, lo que ratifica la capacidad antibacteriana de esta alga; coincidiendo con Abutubul *et. al.*, (2004), al utilizar el extracto de etil-acetato de *Rossmarinus officinalis* y las hojas de *Rossmarinus officinalis* secas, molidas y adicionadas en el alimento, siendo más efectivas las hojas que el extracto.

Tanto el tratamiento antes del inóculo como después del inóculo de *O. capillare* seco adicionado al alimento, mostraron diferencias significativas al aplicar el análisis de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis, con el grupo testigo; también, ambos tratamientos mostraron significancia al compararlos con el tratamiento del extracto hexánico administrado vía intramuscular; sin embargo, solo el tratamiento antes del inóculo mostró diferencias significativas al ser comparado con el tratamiento con extracto hexánico administrado vía alimento ($39.25 \geq 36.1069$), lo que nos indica que el *O. capillare* seco adicionado al alimento funcionó mejor antes de generar experimentalmente la infección causada por *V. fluvialis* que después de ella.

Los tratamientos en los que se sumergió alga *O. capillare* viva en los acuarios antes y después del inóculo, se consideraron no viables ya que los peces no superaron la infección. Prácticamente el comportamiento de ambos grupos durante todo el experimento, fue similar al testigo, ya que no se demostró estadísticamente la existencia de diferencias significativas entre estos tratamientos.

Uno de los tratamientos que tuvo mayor efectividad en contra de *V. fluvialis*, fue el extracto alcohólico del alga administrado junto con el alimento, con un 90% de sobrevivencia, confirmando los resultados de las pruebas *in vitro*, ya que este fue el extracto que registró halos de inhibición de mayor diámetro después del extracto hexánico de *O. capillare*. Cabe mencionar que este extracto tuvo actividad principalmente con las cepas de la familia *Vibrionaceae*.

Las comparaciones múltiples de Kruskal Wallis muestran que existe una mayor diferencia del testigo con el extracto alcohólico ($57.55 \geq 36.1069$) que con cualquier otro tratamiento, lo que indica la mayor eficiencia de este tratamiento.

El extracto alcohólico también mostró mayor diferencia al ser comparado con el extracto hexánico administrado vía alimento ($39.95 \geq 36.1069$), que la diferencia producida por el *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo comparada con el extracto hexánico administrado vía alimento ($39.25 \geq 36.1069$).

Se debe mencionar que los peces tratados con el extracto alcohólico ($55.45 \geq 36.1069$) fue el que tuvo mayor diferencia en la comparación hecha con los peces tratados con extracto hexánico administrado vía intramuscular.

Otro punto importante es que los peces en ningún momento rechazaron el alimento por su sabor, ni tuvieron reacciones negativas en cuanto a comportamiento o efectos posteriores causados por el extracto alcohólico, como sucedió con el extracto hexánico.

Por lo anterior se puede decir que los tratamientos más efectivos en contra de *V. fluvialis* fueron los utilizados en los acuarios 6 y 10, estos tratamientos (alga seca incorporada en el alimento antes del inóculo y extracto alcohólico adicionado al alimento) son los más viables para los acuicultores ya que la preparación tanto del extracto alcohólico como de los alimentos es sencilla, práctica y económica. Se

puede comprobar su efectividad con base en el análisis estadístico donde ambos tratamientos muestran diferencias significativas al ser comparados con el testigo y con el extracto hexánico aplicado vía alimento e intramuscular.

Entre los dos tratamientos anteriormente mencionados no existe diferencia significativa, incluso las medias son similares, por lo que no podemos afirmar que un tratamiento sea mejor que el otro, sin embargo, ambos son eficaces en el control de infecciones bacterianas provocadas por *V. fluvialis*.

Es importante mencionar que al probar la capacidad de *O. capillare* como bactericida surgen dos funciones principales de esta alga como tratamiento: una profiláctica, basada en el alga seca molida y adicionada al alimento y la otra de orden terapéutica con base en el tratamiento del extracto alcohólico adicionado al alimento.

CONCLUSIONES

Se comprobó, *in vitro*, la capacidad del extracto hexánico que se obtuvo a partir del alga verde dulceacuicola, *Oedogonium capillare*, para inhibir el crecimiento de 23 diferentes bacterias, tanto patógenas de humanos como de importancia ictiopatógena, pertenecientes a las familias: *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae* y *Vibrionaceae*.

Al estimar el coeficiente de correlación de la actividad del extracto hexánico de *O. capillare* con cada uno de los antibióticos comerciales (la kanamicina, la tetraciclina y el cloramfenicol), se observó que la actividad del extracto está más relacionado con la actividad de la kanamicina que con la de los otros dos antibióticos.

El extracto alcohólico del *O. capillare*, mostró capacidad antibacteriana contra especies de la familia *Vibrionaceae*, los cuales presentaron halos de inhibición incluso mayores que los registrados por los antibióticos comerciales.

Los extractos de *Citrus limon* y *Mangifera indica* no presentaron actividad significativa para los propósitos de este trabajo, a pesar de tener una capacidad antibacteriana mínima.

Se comprobó *in vivo* la capacidad del extracto hexánico *Oedogonium capillare* en peces inoculados con *Vibrio fluvialis* aislada de peces con signos de infección

Las vías de administración a través del alimento, intramuscular y baños del extracto hexánico de *O. capillare*, no resultaron eficientes para el uso acuícola, debido a la agresividad del producto y de los altos costos de su obtención.

Las administraciones de los tratamientos suaves del alga *O. capillare* sin extracción resultaron más eficientes.

El uso del tratamiento del alga seca adicionada al alimento se pudo aplicar de forma eficaz tanto como profilaxis, como de forma terapéutica en las infecciones provocadas experimentalmente por *V. fluvialis*.

El tratamiento basado en el extracto alcohólico de *O. capillare* adicionado en el alimento, fue el mas efectivo, presentando mayor porcentaje de sobrevivencia.

Hasta no comprobar la capacidad bacteriana de producir plásmidos resistentes al *O. capillare* no se recomienda su uso como profilaxis, pero sí de forma terapeutica. Se recomienda específicamente el tratamiento de la extracción alcohólica adicionada en el alimento como control de infecciones provocadas por bacterias del género *Vibrio*.

Es necesario implementar el estudio a nivel piloto para prevenir y controlar infecciones bacterianas en granjas acuícolas, debido a sus bajos costos de producción, ya que cualquiera de estos centros puede disponer de un estanque para la producción de el alga *O. capillare*.

LITERATURA CITADA

- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Zilberg, D. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*: 2004; 238: 97-105.
- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Ofir, R., Zilberg, D. Screening of desert plants for use against bacterial pathogen fish. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*: 2005; 57(2): 71-80.
- Altewegg, M., Steigerwalt, A. G., Altwegg-Bissig, R., Luthy-Hottenstein, J., Brenner, D. J. Biochemical Identification of *Aeromonas* Genospecies Isolated from Humans *Am Soc Microbiol*: 1990; 28:258-264.
- Álvarez, T. P., Ramírez, C., Orbe, A. *Desarrollo de la Acuicultura en México y perspectiva de la acuicultura rural*. Taller ARPE, FAO – UTC. 1999.
- Analytical Profile Index,. *Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria*. 9th ed. Edition BioMerieux, France. 1989.
- Analytical Profile Index,. *Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria*. 4th ed. Edition BioMerieux, France. 1997.
- Angulo, F. Agentes microbianos en acuicultura: impacto potencial en la salud pública. *Enfermedades infecciosas y Microbiología*: 2000; 20 (6): 217 - 219.
- APHA,. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 14th. Ed. American Public Health. Washington, D.C. 1992.
- Arista, V. A., *Uso y abuso de antibióticos*. Hosp Gral Mex. Perinat.: 2005; 1-22 p.
- Austin, B., Billaud, A. C. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of *Planococcus recovered* from sea water. *J. Fish Diseases*:1992;13 :553-556.
- Austin, B., Austin, D. A. *Bacterial fish pathogens*. Ellis Horwood Limited. Chichester, England. 1999.
- Bardach, J., *Acuicultura*, Ed. AGT. México, DF.1986.

- Barry, A. I., Thornsberry, C. Susceptibility test by difusión test procedures. In Lennette, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology. 1985.
- Bernabé, G. *Aquaculture*. Ed. Omega. Barcelona, España. 1989.
- Birnboim, H. C., Dolly, J. A rapid alkaline extraction procedure for cloning recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*: 1979; 7: 1513-1523.
- Brenner, D. J., Hichman-Brenner, F. W., Lee, J. V., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Hollis, G. G., et al. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J Clin Microbiol.*: 1983; 18: 816-821.
- Bromage, N.R., Roberts R.J., Ingils V., 1994. *Bacterial Diseases of fish*. Blakwell Science, Austria. 1994.
- Brown, L. *Acuicultura para veterinarios: Producción y clínica de peces*. Ed. Acribia S. A. Zaragoza España. 2000.
- Colwell, R. R., Mc Donell, M. T., De Ley, J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae. *Fam. nov. Int. J Syst Bacteriol*: 1986; 36: 473-477.
- Cowan, S. T. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacterias*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1974.
- Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B. K., Helgason, S., Hoies, S., Thoresen, O.F., Wichardt, T. et al. Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: Interlaboratory Evaluation and harmonization of methods. *J. Appl Microbiol*: 1998; 84:999-1006.
- Dalsgaard, I., Madsen, L., Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of fish Diseases*: 2000; (23) 199-209.
- Davis, J. Interspecific gene transfer in nature and in the laboratory . Fate of engineered microorganisms in the environment. *Recent advances in microbial ecology. Proceeding of the 5th. International Symposium on Microbial Ecology*. 1990.
- Díaz, R., Gamanzo, C., López- Goñi, I. *Manual práctico de microbiología*. Ed. MASSON, España. 1998.

- Furnniss, A. L., Lee, J. V., Donovan, T. S. Group F, a new *Vibrio*?. *Lancet II*;l.: 1977; 565-566.
- Garrod, L. P., Lambert H. P., O'Grady, F. *Antibiotic and Chemotherapy*. 4ta edición. Ed. Churchill Livingstone. Edimburgo y Londres. 1973.
- Gauthier-Lievre, L. *Oedogoniacees Africaines*. 2nd ed. Germany: J. Cramer. 1963.
- Giono, C. S. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectología, III*: 1983; 7:325.
- Heinz, H., Reichenbach, K. *Enfermedades de los peces*. Editorial Acribia. Zaragoza España. 1982.
- Hirn, K. T. *Monographie der Oedogoniaceen* .H.R. Engelman editor J. Cramer, Wihildon & Wesley, New York. 1960.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Dtaley, J. T., Williams, T. S. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Baltimore. Md: Williams & Wilkins. 1994.
- Immanuel, G., Vincybai, V. C., Sivaram, V., Palavesam, A., Marian, M. P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*: 2004; 236(1/4) 553-556.
- Kinkelin, P., Michelin, C. H., Ghittino, P. *Tratado de las enfermedades de los peces*. 3^{ra} ed. Zaragoza Ed. Acribia. 1985.
- Lamothe, R. *Importancia de la parasitología en el desarrollo de la acuicultura*. México: Instituto de Biología UNAM. Hidalgo. 1991.
- Landaw, M. *Introduction to aquaculture*. John Wiley & Sons. USA 1991.
- Lee, J. V., Shread, P., Furniss, A. L., Bryant, T. N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F Vibrios Ef6). *J Appl Bacteriol*: 1981: 50: 73-94.
- Lima, F. .J., Carvalho, A. F., Freitas, S. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002; 33 (4): 311-314.
- Madigan, T. M., Martinko, M. J., Parker, J. *Biología de los microorganismos*, Prentice Hall Iberia, Madrid. 2000.

- Marañón, H. S., Maya-Peña, P. E. Efectos de pH sobre la proporción de sexos, el crecimiento y la sobrevivencia del guppy *Poecilia reticulata* Peters 1859. *Revs. Hidrobiológica*: 1999; 8 (2).
- Martínez, E. B. *Nuevos medicamentos y su aplicación en microdosis*. Ed. Herbal. 1998.
- Mesmar, M. N., Abussaud, M. The antibiotic activity of some aquatic plants and algal extracts. *Jordan Qatar University, Sci J.*: 1991; 11:155-160.
- Michael, C. Development of bacteria in fish water during a standardized experimental infection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida*. *Microbial diseases of fish*. Ed. Roberts R. J. London, England: 1982; 45-55.
- Michel, C. Development of bacteria in fish and in water during a standardized experimental infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas Salmonicida*. In Roberts R.J., *Microbiological diseases of fish*. Academic Press London. 1980.
- Milis, D., Beber, G. *Guía práctica de los peces de acuario*. Ed. Blume Montante. 1995.
- Miranda, C. D., Zemelman, R. Bacterial Resistance to Oxytetracycline in Chilean Salmon Farming. *Aquaculture*: 2002; (212): 31-47.
- Meirelles, P. F., Mirelles, A., Gomes, M. C., Días, V., Brum, P. R., Almeida, E., Adler, A., Assis, F., Adler, J. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Brazilian Journal of Microbiology*: 2002;(33): 287-293.
- Mtambo, M. M., Mushi, E. J., Kinabo, L. D. B., Maeda- Machangú, A., Mwamengle, G. L. M., Yongolo, M. G. S., Temu, R. P. C. Evaluation of the efficacy of the crude extracts of *Capsicum frutescens*, *Citrus limon* and *Opuntia vulgaris* against Newcastle disease in domestic fowl in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; (68): 55-61.
- Munro, A. L. S. The pathogenesis of bacterial diseases of fishes. In: Roberts R J editor. *Microbiol diseases of fish* . London: Academic Press. 1982.

- Nascimento, G. F., J. Locatelli, C. P. Freitas, Silva L. G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals. *Brazilian Journal of Microbiology* :2002; 33 (4) :311-314.
- Nakasone, H. Y., Paull, R. E. *Tropical Fruits*. CAB International. Hawaii. 1999.
- Negrete, R. P., Romero, J. J. Métodos en microbiología acuática. *Manual de CBS*. Universidad Autónoma Metropolitana. 1995.
- Negrete, R. P., Romero, J. J. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. *Rev Hidrobiol*: 1998^a; 8: 43-54.
- Negrete, R. P., Romero, J. J. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio* con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. *Rev Hidrobiol*; 1998^b; 8: 1-10.
- Negrete, R. P., Perez, G. R., Vargas, S. R., Figueroa, T. G., Gamboa, S. Antimicrobial activity of *Oedogonium capillare*. *Rev Lat Quim*: 2001; 29: AP-10.
- Negrete, R. P., Valencia, D., Villegas, G., Romero, J. J. Bacteriosis por estrés ambiental en granjas acuícolas rurales de estado de México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*: 2002; 3(1): 49-58.
- Negrete, R. P., Romero, J. J., Villegas, G., Vázquez, V. C. Presence of plasmids in *Pseudomonas* isolated from ornamental fish. *Vet Mex*: 2003; 34(3).
- Negrete, R. P., Romero, J. J., Arredondo, F. J. Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) para producir infección en pez dorado (*Carassius auratus*). *Vet Mex*: 2004^a; 35(1): 31-43.
- Negrete, R. P., Romero, J. J., Arredondo, F. J. Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* aislados de *Carassius auratus auratus*. *Vet. Mex*: 2004^b; 35(1): 21-30.
- Ocampo, L., Auró, A. *Terapéutica de las enfermedades de los peces*. Facultad de M.V.Z. de la UNAM. México D.F. 1996.

- Olano- Martín, E., Gibson, G. R., Rastall, R. A. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic – oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*: 2002; (93): 505-511.
- Omoregie, E. Utilization and nutrient digestibility of mango seeds and palm kernel meal by juvenile *Labeo senegalensis* (Antheriformes: Cyprinidae). *Aquaculture research*: 2001; (32): 681-687.
- Perez, S. L. A, *Piscicultura, ecología, explotación e higiene*. Ed. El manual moderno S.A. de C.V.. México, 1982.
- Ponce, P., 1991, *Modelos en el manejo ambiental de sistemas acuícolas*. Ed. UNAM.
- Potiyevski, E. G., Ashubayeva, P. G, Rakhimov, D. A. Bactericide effect of pectin on microorganisms causing avute intestinal infections. *Medicine Journal.of Uzbek*: 1991; 7: 20-22.
- PUA, *Programa Universitario de Alimentos. Problemática y requerimientos del I&D en el mango*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2003.
- Roberts, R. J. *Patología de los peces*. Ed. Mundi-prensa. Madrid, 1981.
- Roberts, R. J. Introduction fish. En. Inglis, W., Roberts, R. J., Bromage, R. N., *Bacterial diseases of fish*. Academic Press. London. 1993: 1 – 20.
- Romero, J. J., Salas, T. A. *Estudio de frecuencia de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aislados en ambientes marinos*. V. Congreso Nacional de Biotecnología: 1993; (3): 3-4.
- Samira Etahiri, Bultel-Ponce, V., Caux, C., Guyot, M. New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *J. Natural Prod*: 2001; 64:1024-1027.
- Secretaría de agricultura, ganadería, recursos pesqueros y acuícolas. *Cifras del anuario estadístico CEA/SAGARPA*; Bancomext. 2004.
- Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México NOM-10 PESCA –1994.México: SEMARNAP. Diario Oficial de la Nación. 1994^a.
- Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México, NOM-11-PESCA-1994. México: SEMARNAP. Diario Oficial de la Nación. 1994b.

- Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México, NOM-121. PESCA-1994. México: SEMARNAP. Diario Oficial de la Nación. 1995.
- Siegel S., Castellan N. J. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2nd ed. McGraw Hill Book Company. 1988
- Smith, M. G. *Manual of phycology an introduction to the algae an their biology*. The Ronald Press company. New York. 1992.
- Stanley, R. S. *Lynch's Medical Laboratory Technology*. Washington Ed. WB. Saunders. USA.: 1986; 434-240.
- Tendencia, E. A., De la Peña, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*: 2001; 195: 193-204.
- Tiffany LH, Britton M E. *The algae of Illinois*. 2nd ed. Chicago The University of Chicago. 1952.
- Torreola, J. J. *Aspectos generales de la patología infecciosa*. En *Patología en acuicultura*. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura (CATCYT). Madrid. 1988.
- Tortora, G. F, Funke, B. R., Case, C. L. *Introducción a la microbiología*. 3^a Ed. Acribia, España. 1997.
- Wheaton, E. *Acuicultura y construcción de sistemas*. AGT Editor México DF. 1982.
- Whiteside, J. O, Gransey, S. M., Timmer, L. W. *Plagas y enfermedades de los cítricos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 1996.
- Wijffels, R. H., Barbosa, M., Janssen, M., Wessels, H. S., *et al*. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomol Eng*: 2003; 20: 255-259.