

Artículo Original

Eficiencia del propóleo en el tratamiento de enfermedades bacterianas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) evaluada en laguna altoandina

EFFICIENCY OF PROPOLIS IN THE TREATMENT OF BACTERIAL DISEASES OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) EVALUATED IN THE HIGH ANDEAN LAGOON

YENY RUTH ALIAGA HUAHUALA§

Recibido: 04 diciembre de 2020 / Aceptado: 30 diciembre de 2020

§*Escuela Profesional Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano, Perú*

Resumen

La investigación se realizó en el Centro de Producción de Piscifactorías de los Andes S.A. distrito de Quichuay, provincia Huancayo, departamento de Junín, de marzo a agosto del 2013. El objetivo fue evaluar la eficiencia del propóleo en el tratamiento de enfermedades bacterianas en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*; así mismo, identificar bacterias patógenas gram negativas. La población muestral total fue de 750 peces, usados en tres repeticiones (250 peces por repetición), cada repetición constó de cinco pruebas con dosis distintas (50 peces por prueba), todos ellos con heridas notablemente profundas, se observó la evolución con cada una de las dosis durante 23 días. El tratamiento de las dosis fue mediante vía oral, se realizó una mezcla entre el alimento balanceado y el extracto de propóleos (EP), para la fijación del EP a los pellets de alimento se trabajó con 2,5 ml de aceite vegetal; se utilizó las siguientes cantidades de EP por tratamiento: T.Testigo (0 ml), T1 (1,5 ml), T2 (2,5 ml), T3 (3,5 ml) y T4 (4,5 ml) respectivamente. Se trabajó con la prueba estadística Anva para determinar el nivel de significancia, obteniéndose un nivel de significancia igual a 0,00 siendo menor al nivel de significancia de alpha al 5% = 0,05, habiendo efecto significativo en los tratamientos; y para comparar el efecto entre tratamientos se utilizó la prueba de Duncan todas ellas en el programa estadístico SPSS versión 21.0; resultando que las pruebas T.Testigo, T1, T2 y T3 son estadísticamente diferentes, pero el T3 y T4 son estadísticamente iguales y tuvieron mayor efecto en el tratamiento de heridas versus el T.Testigo, T1 y T2.

Palabras clave: sanidad pesquera, bacteriología, enfermedades, trucha arcoiris

Abstract

The research was carried out at the Centro de Producción de Piscifactorías de los Andes S.A. Quichuay district, Huancayo province, Junín department, from March to August 2013. The objective was to evaluate the efficiency of propolis in the treatment of bacterial diseases in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*; likewise, identify gram negative pathogenic bacteria. The total sample population was 750 fish, used in three repetitions (250 fish per repetition), each repetition consisted of five tests with different doses (50 fish per test), all of them with remarkably deep wounds, the evolution was observed with each one of doses for 23 days. The treatment of the doses was by oral route, a mixture was made between the balanced food and the propolis extract (EP), for the fixation of the EP to the food pellets, 2.5 ml of vegetable oil was used; The following amounts of EP were used per treatment: T. Testigo (0 ml), T1 (1.5 ml), T2 (2.5 ml), T3 (3.5 ml) and T4 (4.5 ml) respectively. The Anva statistical test was used to determine the level of significance, obtaining a level of significance equal to 0.00 being less than the level of significance of alpha at 5% = 0.05, having a significant effect in the treatments; and to compare the effect between treatments, Duncan's test was used, all of them in the statistical program SPSS version 21.0; Resulting in that the T. Witness, T1, T2 and T3 tests are statistically different, but the T3 and T4 are statistically the same and had a greater effect on the treatment of wounds versus the T. Witness, T1 and T2.

Keywords: fish health, bacteriology, diseases, rainbow trout

INTRODUCCIÓN

La acuicultura como actividad productiva en los últimos años ha ido incrementando en forma rentable, por ende, la crianza intensiva propiamente dicha presenta problemas de mortalidad a causa de enfermedades bacterianas o fúngicas que no son controladas por falta de prevención, representando un serio problema y un riesgo de gran importancia en el desarrollo de la acuicultura. Muchos centros acuícolas se ven afectados por este problema, optando de manera errada por la medicación según criterio y sin haber realizado previas consultas con un especialista en la materia quien ha de poder identificar con exactitud el agente causante de las enfermedades y recomendar el uso de algún fármaco que no esté prohibido por alguna legislación.

El manejo de densidades bajas juega un papel importante para la aparición o la presencia de algún patógeno en los cultivos intensivos; puesto que el estrés en los peces causado por densidades altas provoca una disminución de defensas en el sistema inmunológico.

Las enfermedades en cultivos de trucha arco iris es una amenaza económica permanente para el sector pesquero; el impacto de enfermedades puede afectar seriamente la sanidad y bienestar de los ejemplares en cultivo, como el comercio llegando a tener serias pérdidas al no lograr erradicar los agentes patógenos causantes del problema. Para el tratamiento de enfermedades existen diversas sustancias químicas que pueden ser capaces de combatir la enfermedad en varios casos, pero a su vez se corre el riesgo de aumentar la resistencia de las bacterias logrando que éstas puedan ser casi inmunes a algunos tratamientos, así mismo se corre con el riesgo de que algunos productos empleados puedan dejar trazas en el músculo de la trucha y por ende el producto pueda ser rechazado al pasar por el control de calidad para la salida a los diferentes mercados.

Es así que se opta por la utilización del propóleo, producto apícola recogido y elaborado en forma natural por abejas melíferas (*Apis mellífera*), el mismo que cuenta con innumerables bondades, entre ellas están el tener propiedades inmunoestimulantes, antibacteriales, antimicóticas, antivirales, antiinflamatorias, entre otras; que se deben fundamentalmente a sus componentes bioactivos. Un producto natural con alto potencial bactericida el cual puede ser empleado en el tratamiento de diversas enfermedades sin causar daños al medio ambiente acuático, salud de los peces y salud humana, obteniendo así grandes beneficios en el cultivo de trucha arco iris.

Gulhan, *et al.* (2012), realizaron un estudio en Turquía, del efecto de propóleo sobre los parámetros microbiológicos y bioquímicos de filete de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) después de la exposición al propóleo y cipermetrina. Los resultados revelaron que los niveles de malondialdehído (MDA), ácido láctico, nitrógeno volátil de bases totales, recuento total de psicrófilos y bacterias mesófilas aumentó en los grupos de cipermetrina ($p < 0,05$), comparado con el grupo control. Además, los niveles de MDA, ácido láctico, nitrógeno volátil de bases totales, recuento de psicrófilos y bacterias mesófilas en cipermetrina + grupos propóleos tratados se reducen significativamente en comparación con los grupos expuestos con cipermetrina. Es así que concluyeron que la calidad de filete de peces podría cambiar en algunas funciones bioquímicas y microbiológicas en los grupos expuestos a cipermetrina con relación a propóleo.

Carrillo *et al.* (2011), evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y

acuosos de propóleo en México, para ello usaron cepas de microorganismos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*; y microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*. Determinaron la concentración mínima bactericida (CMB) de cada extracto con el método de dilución en tubo. La CMB del extracto etanólico fue 0.93 mg mL⁻¹ para las Gram positivas y 7.5 mg mL⁻¹ para las Gram negativas. Por otro lado, Muñoz *et al.* (2011), estudiaron las propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal, comprobaron que este producto posee propiedades inmunoestimulantes, antioxidantes, antibacteriales, antitumorales y antivirales. Mientras que Beyraghdar *et al.* (2010), hicieron un estudio en Irán para conocer los efectos a largo plazo del propóleo sobre los parámetros bioquímicos en suero de *Oncorhynchus mykiss*, determinaron entonces que la administración a largo plazo del extracto etanólico del propóleo en la dieta de alevines, no indujo efectos adversos y fisiológicos secundarios en los peces, por tanto es un alimento seguro que puede ofrecer beneficios como antioxidante, estudios relacionados fueron efectuados por Mayta y Sacsquispe (2010), Abd-el-Rhman (2009), León *et al.* (2009), Martínez (2009), Selamoglu y Fuat (2009), Meixner (2007) y Tolosa y Cañizares (2002).

Dado a la importancia de contar con métodos que permitan combatir las enfermedades de la trucha en el País se planteó evaluar la eficiencia del principio activo del propóleo, en el tratamiento de enfermedades bacterianas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Centro de Producción Quichuay – Huancayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁMBITO DE ESTUDIO

El Centro de Producción Piscifactorías de los Andes S.A. está ubicado en el Paraje Ataquichque, distrito de Quichuay, Provincia de Huancayo, Departamento de Junín, se encuentra a una altitud de 3440 msnm, y sus coordenadas son 75°16'46.4" Longitud Oeste, 11°53'37" Latitud Sur. Las aguas utilizadas en este Centro de Producción pertenecen al río Achamayo, que presenta un caudal promedio en el canal principal de 1,6 m³/s en época de estiaje, y 2,8 m³/s en época de lluvia.



Figura 1. Vista panorámica de las instalaciones del centro de producción de trucha, Junín, Perú

El trabajo de investigación se ejecutó de marzo a agosto del 2013, iniciándose con la obtención del extracto de propóleo en un lapso de 21 días calendarios sumándole 7 días para su respectiva filtración; la limpieza ya preparación de accesorios para el acondicionamiento de los estanques tuvo una duración de 4 días calendarios; la selección e inventario de los ejemplares de trucha arco iris tuvo la duración de 1 día al igual que los trabajos de biometrías, mientras que la duración del tratamiento en los ejemplares por repetición tuvo una duración de 23 días calendarios.

MÉTODOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS

Muestreo

Son las que afectan a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en proceso de crianza en estanques. Para su identificación *in vitro*, con el empleo de un carcal, se tomó una muestra al azar de 6 unidades de una población de 500 unidades, todas ellas con heridas, las cuales pertenecían a la primera y segunda repetición; estas unidades muestreadas fueron equivalentes a un porcentaje total de la población de 1.18 %.

A los peces capturados se les realizó un frotis con un hisopo por el borde de las heridas, una vez realizado el frotis, el hisopo fue introducido dentro de un tubo de ensayo tapa rosca el cual contenía la solución del caldo peptonado previamente preparado, este procedimiento se realizó con los demás peces seleccionados al azar. Teniendo los seis tubos de ensayos con las muestras de patógenos, fueron colocados dentro de una caja pequeña de tecnopor que contenía hielo en pack gel, para ser llevados a laboratorio.

La frecuencia del horario de muestreo se realizó en una sola ocasión, siendo el muestreo a las 10:00 horas. En laboratorio se efectuaron observación de las colonias a las 24 horas posterior a la siembra y las pruebas de tinción gram se realizaron en una sola ocasión por cada una de las diferentes colonias obtenidas.

Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo selectivos empleados para la obtención de bacterias patógenas gram negativas fueron: Agar BHI (Agar Infusión Cerebro Corazón), Agar TSA (Agar Tripticasa Soya) y Agar MacConkey. Estos medios de cultivo fueron de la marca BD – Becton, Dickinson and Company. Para tal fin se procedió a la preparación de cada uno de los medios de cultivo de acuerdo a las indicaciones de los rótulos empleando agua destilada para su disolución, empleando 15 ml de agua destilada por cada placa Petri.

El Caldo Peptonado fue preparado con la finalidad de transportar las muestras *in situ* a *in vitro*. De acuerdo al rótulo del medio de cultivo la suspensión, se hizo con 10 g del medio en polvo en 1 L de agua destilada; es así que para los 6 tubos de ensayo (7 ml. por cada tubo) se utilizó 42 ml de agua destilada para ser mezclada con 0,42 g del medio en polvo. La medición de la cantidad del agua destilada se hizo con ayuda de una probeta de vidrio pirex marca Giardino de 50 ml de volumen de capacidad, para el pesado del medio de cultivo se empleó una balanza analítica de marca Sumin-Precix Weight de 600 g de capacidad máxima; para el pesado del medio en polvo se preparó una caja pequeña de papel el cual fue previamente tarado. Teniendo la cantidad de agua destilada, ésta fue traspasada a un matraz Erlenmeyer de pirex, siendo suspendido junto al medio en polvo que también fue agregado al matraz y se utilizó una mezcla de ambas materias. A este matraz se llevó al fuego de un

mechero agitándolo hasta que se produjo su hervor, la total disolución de dio en 1 minuto aproximadamente. Posteriormente, la mezcla se distribuyó a los seis tubos de ensayo, en similar proporción, dejándolas enfriar y gelatinizar para luego realizar las siembras.

La preparación del agar BHI (Agar infusión cerebro corazón), de acuerdo al rótulo del medio de cultivo la suspensión, se hizo con 52 g del polvo en 1 L de agua destilada; es así que para las 6 placas petri (15 ml. por cada placa) se utilizó 90 ml de agua destilada para ser mezclada con 4,7 g del medio en polvo. La medición de la cantidad del agua destilada se hizo con ayuda de una probeta de vidrio pirex marca Giardino de 50 ml de volumen de capacidad, el pesado del medio de cultivo se efectuó en la balanza con los procedimientos indicados en el anterior párrafo.

La preparación del agar TSA (Agar soya triptica), de acuerdo al rótulo del medio de cultivo, la suspensión se hizo con 40 g del polvo en 1 L de agua destilada; es así que, para las 6 placas petri (15 ml. por cada placa) se utilizaron 90 ml de agua destilada para ser mezclada con 3,6 g del medio en polvo. La preparación (pesaje y dilución) se efectuó siguiendo los procedimientos del quinto párrafo de esta sección.

El agar MacConkey, de acuerdo al rótulo del medio de cultivo, se preparó considerando 50 g del polvo en 1 L de agua destilada; es así que, para las 6 placas petri (15 ml por cada placa) se utilizó 90 ml de agua destilada para ser mezclada con 4,5 g del medio en polvo. La preparación (pesaje y dilución) se efectuó siguiendo los procedimientos del quinto párrafo de esta sección.

Cultivo de microorganismo

Para la siembra en los medios de cultivo, se tomó cada uno de los tubos de ensayo con tapa rosca, conteniendo en su interior el caldo peptonado, con los hisopos provenientes del frotis de las heridas de los ejemplares de trucha arco iris.

Posteriormente con el hisopo ya llevando los agentes patógenos se procedió a sembrar en las placas petri en los tres tipos de medios de cultivos (BHI, TSA y MacConkey) ya preparados; la siembra se realizó sobre la superficie de los medios de cultivo gelatinizados con el hisopo por medio de agotamiento o estrías, este procedimiento se hizo en 18 placas petri, tres placas para cada medio de cultivo diferente y por cada hisopo en tubo, las placas fueron rotuladas con plumón negro indeleble una por una. Una vez terminada la operación se procedió a dejarlas en la estufa para su incubación a una temperatura de 20 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se retiró las placas petri de la estufa y se volvió a repetir el procedimiento de la preparación de medios de cultivo para continuar con las siembras de las demás muestras. En la nueva siembra se pudo obtener las cepas puras de las colonias resultantes del frotis anterior. Para aislar las cepas puras, el procedimiento que se empleó fue el mismo que el anterior pero se reemplazó el hisopo por un asa de siembra al cual esterilicé en fuego al rojo vivo, con el asa de siembra tomé una pequeña porción de las colonias obtenidas y procedí a sembrar en los agares o medios de cultivo correspondientes también por el método de agotamiento o estrías. Las placas con las colonias ya sembradas las llevé a una estufa dejándolas allí por 24 horas a una temperatura de 20 °C.

Método de tinción gram

Pasadas las 24 horas de incubación se procedió a realizar la coloración gram de las colonias obtenidas en los diferentes medios de cultivo. La tinción gram se realizaron en láminas portaobjetos, con un asa de siembra se tomó una colonia de las cepas puras obtenidas y se esparcieron sobre la lámina portaobjetos a donde se agregó dos gotas del reactivo de cristal violeta y dejé actuar durante un minuto, transcurrido el tiempo se realizó un lavado con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante, seguidamente se agregó dos gotas del reactivo lugol para cubrir el frote, el cual se dejó también actuar durante 1 minuto, transcurrido ese tiempo se lavó con un pequeño chorro de agua eliminando así el exceso de mordiente, posteriormente se decoloró con alcohol acetona hasta que el efluente hubo salido incoloro y se lavó con agua para eliminar el exceso de disolvente, finalmente se agregó dos gotas del reactivo safranina cubriendo el frotis y dejé actuar por 1 minuto posteriormente lavé con agua para eliminar el exceso de contraste y dejé secar la preparación a temperatura ambiente. La lámina la observé en microscopio con los objetivos de 40x y 100x, de acuerdo a la observación pude identificar el tipo de agente patógeno de acuerdo a las características morfológicas de cada una de ellas. Todas las láminas fueron previamente etiquetadas y enumeradas con códigos y marcadas.

Método de identificación morfológica de bacterias

Por las heridas que presentaron los ejemplares, antes de los muestreos se pudo hacer una comparación con las referencias bibliográficas y saber que estas heridas eran ocasionadas por bacterias típicas de salmónidos. Para la identificación de bacterias se realizó la comparación de las características morfológicas al observarlas al microscopio después de la coloración gram y comparar con las características morfológicas obtenidas por otros autores que identificaron bacterias patógenas en trucha arco iris que se lograron desarrollar con los medios de cultivo anteriormente empleados. Para la toma de imágenes fotográficas se utilizó una cámara fotográfica digital Panasonic-Lumix de 12 Mega pixeles.

Método de extracción del extracto de propóleo como materia prima

Se procedió a realizar la extracción del extracto de propóleo utilizado para esto etanol o también conocido comercialmente como alcohol etanólico al 70%. Para esto se utilizó 500 g de propóleo en su forma original o bruta, la misma se refrigeró hasta obtener un estado más sólido, pudiéndose trabajar de una mejor manera. Posteriormente se trozaron los grumos de propóleo para colocar en un recipiente con boca ancha ámbar oscuro de vidrio de una capacidad de 5 litros, se utilizó 250 g de propóleo para 1 litro de alcohol etanólico; el propóleo una vez dentro del recipiente fue mezclado con el alcohol etanólico al 70%, dejando actuar por 21 días en un lugar oscuro y con poca humedad. Transcurrido el tiempo de dilución del propóleo en el solvente se dejó sedimentar la mezcla por 7 días para así filtrar el extracto obtenido mediante la utilización de un papel filtro que cual empleé en forma de embudo.

Método de acondicionamiento de estanques

Primero se procedió con la limpieza de estanques, para ello, se escogió cinco estanques de 20 x 2 m para la limpieza respectiva se bajó el nivel del agua de los estanques quitando primero una ataguilla con la ayuda de un gancho de fierro, una vez que el nivel del agua hubo disminuyendo, se retiró la segunda ataguilla de tal manera que el agua quedó a la altura del tobillo de una persona. La limpieza se inició con el lavado de las paredes de los estanques

con las escobillas de nylon, una vez terminado el lavado de las paredes, se continuó con la limpieza del piso desde la salida del agua hasta el ingreso.



Figura 2. Acondicionamiento de estanques para manejo de ejemplares seleccionados

Se continuó con el acondicionamiento de estanques, que consistió en la construcción de paredes rectangulares utilizando redes, varillas de hierro y cintas de madera. Cada estanque tuvo tres divisiones. Con la ayuda de cabos e hilos se unieron las redes a las cintas de madera ubicando cada cinta en ambos extremos para cumplir la función de parantes, para evitar la flexibilidad de la zona superior e inferior de la red se utilizó la varilla de hierro uniéndolas con hilo y cabo dándole así la firmeza a la red. Teniendo las diez paredes rectangulares se comenzó a realizar las separaciones por cada estanque, utilizando dos paredes por estanque para obtener tres espacios iguales de 6,6 m de largo por 2,0 m de ancho cada uno, teniendo una densidad de carga de 13,2 kg/m³.

Método de selección y traslado de peces

Se trabajó con peces en la etapa del estadio de engorde, para ello se identificó el tamaño de muestra de los peces con los que se trabajó:

Seguridad = 95%; Precisión = 3%; Proporción esperada = 5% = 0.05

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{d^2}$$

Donde:

$Z^2 = 1.96^2$ (ya que la seguridad es del 95%).

$p =$ proporción esperada (5% = 0.05).

$q = 1 - p$ ($1 - 0.05 = 0.95$).

$d =$ precisión (3%).

$$n = \frac{1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.03^2}$$

$$n = 203 \text{ peces.}$$

Obteniendo un resultado de 203 para ser trabajado como número de individuos, este número se elevó a 250 individuos para poder dividir en cantidad igual de peces y así trabajar con un número de 50 peces por estanque.

Para la selección de estos peces se cerró el estanque con la ayuda del seine de cerrar a 1/3 de la entrada del estanque, dejando a toda la biomasa entre el ingreso del agua y el seine; en los 2/3 vacíos se ingresó el trípode con el corral al estanque. La selección de los peces se realizó en forma manual utilizando un cajón seleccionador.

Con la ayuda del seine de pescar se capturó la biomasa, evitando se vea afectada por estrés o por demasiada agrupación; de este seine de pescar y con la ayuda de las canastillas se cogieron a los peces vaciándolos dentro del cajón seleccionador el cual se movió lentamente por espacio de 15 a 30 segundos para dejar caer a los peces pequeños menores a 300 g; luego con la ayuda de la mano se separó a los peces que quedaron en el cajón escogiendo sólo a aquellos que presentaron heridas los cuales se quedaron en el cajón y aquellos peces sanos se retiraron a un corral diferente. La biomasa separada con heridas que quedó dentro del cajón se trasladó al corral con un previo inventario.

Una vez seleccionados e inventariados los peces se procedió a realizar su traslado, para esto se utilizó un tanque con agua el mismo que es transportado en un tractor. Utilizando un trípode de madera junto con una balanza colgante que pende del mismo trípode se procedió a pesar a los peces antes de ingresarlos al tanque con la ayuda de una canastilla previamente tarada (Anexo 9). Una vez estando todos los peces dentro del tanque con agua, fueron trasladados con el tractor para su distribución en los estanques ya preparados y acondicionados. La distribución se realizó enviando 50 unidades de peces por cada espacio de 6.6 metros que fue separado en los estanques.

Evaluación de la aplicación del propóleo, manejo y control de peces

Parte crucial del tratamiento de los peces fue el suministro de propóleo (extracto) a los peces que fue mediante vía oral, realizando una mezcla o recubierta del extracto de propóleo con diferentes dosis por cada prueba junto con aceite vegetal en el alimento, el aceite vegetal hizo que el extracto de propóleo quede fijado a los pellets de alimento y de esta manera pudo ser suministrado a los ejemplares. La mezcla del extracto de propóleo con el aceite vegetal se realizó en un recipiente blanco de fondo circular, la medición de mililitros del extracto de propóleo y del aceite vegetal se realizó con pipetas milimetradas de 5 ml cada una. Una vez obtenida la mezcla se comenzó a recubrir los pellets de alimento con el propóleo y aceite vegetal, el cual se colocó en un recipiente de plástico con tapa teniendo diferentes dosis por prueba. La alimentación de los peces como principal procedimiento dentro de la cadena productiva se realizó a cada una de las pruebas de cada repetición; se trabajó con alimento balanceado extruido pigmentante de la línea EWOS, pero la cantidad de alimento se calculó adecuándose a la tabla de alimentación de Nicovita Truchas, en donde se tomó en cuenta el peso promedio obtenido después de realizar las biometrías por cada tratamiento, con lo que se determinó la biomasa, se tomó también datos del registro de temperatura del agua de

cultivo (10 °C); con esto se obtuvo la tasa de alimentación, con la que se calculó el alimento cada siete días. La alimentación de los peces se realizó al saceo o *ad libitum*, el consumo de alimento diario dependió del apetito de los peces en cada prueba.

Para determinar el efecto curativo del propóleo en trucha arco iris con respecto a las heridas causadas por enfermedades bacterianas se trabajó con el 100% de la población de ejemplares en cada una de las repeticiones (250 unidades por repetición), observando el porcentaje de mejoría en relación al tiempo transcurrido.

La frecuencia de alimentación fue diaria, entre una a dos veces por día dependiendo del apetito de los ejemplares de cada una de las diferentes pruebas. El horario de la primera alimentación empezó en promedio a las 10:00 horas, culminando en promedio a las 11:30 horas. El segundo horario de alimentación se realizó a partir de las 14:00 horas, culminando en promedio a las 15:00 horas. En el caso de las pruebas, presentaron menor apetito durante el primer horario de alimentación.

Para hacer efectuar el seguimiento de la recuperación se los peces se efectuó un inventario. Para capturar a los peces y realizar el inventario de éstos se cerró el estanque con la ayuda del seine de cerrar a 1/3 de la entrada del estanque, dejando a toda la biomasa entre el ingreso del agua y el seine. Con la ayuda del seine de pescar se capturó la biomasa, evitando se vea afectada por estrés o por demasiada agrupación; de este seine de pescar y con la ayuda de las canastillas se cogieron a los peces vaciándolos a los otros 2/3 del estanque con un previo inventario el cual fue registrado.

También se realizaron muestreos biométricos de los peces, para ello, primero se los adormeció utilizando 2 ml de esencia de clavo de olor por cada 20 litros de agua para su correcta manipulación. Las biometrías se realizaron con una frecuencia de catorce días en cada estanque de prueba. Se realizó utilizando un chinguillo o carcal, donde se capturó una muestra de trucha de la biomasa. Luego se las colocó en la tina 20 litros de agua aproximadamente, con la mezcla de agua y esencia de clavo de olor las truchas fueron anestesiadas, de esta manera se realizó la medición de talla con un ictiómetro y peso con la balanza gramera. La población de la muestra a la que se le realizó la biometría fue del 20% (10 peces) por cada tratamiento siendo este número de peces una cantidad representativa.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba de ANVA para determinar el nivel de significancia de alpha y la prueba de Duncan para la determinación y la comparación de la efectividad del extracto de propóleo en las diferentes dosis suministradas a los peces. La comparación del efecto de propóleo, en el tratamiento de enfermedades bacterianas en distintas dosis (1,5 ml, 2,5 ml, 3,5 ml y 4,5 ml), aplicada a trucha arco iris en la etapa de engorde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM NEGATIVAS

De acuerdo la Tabla 1, se pudo evidenciar el crecimiento de colonias en el medio agar TSA, estas colonias presentaron morfología lisa de color amarillo pálido (Figura 3) y mediante la observación al microscopio se observó la presencia de bacilos gram negativos.

Tabla 1. Crecimiento de colonias de bacterias en tres diferentes tipos de agar selectivos

Número de Muestras	Agar MacConkey	Agar BHI	Agar TSA
1° Muestra	Positivo	Negativo	Positivo
2° Muestra	Negativo	Negativo	Positivo
3° Muestra	Negativo	Negativo	Positivo
4° Muestra	Positivo	Negativo	Positivo
5° Muestra	Negativo	Negativo	Positivo
6° Muestra	Negativo	Negativo	Positivo



Figura 3. Crecimiento de una colonia en agar MacConkey (izquierda) y crecimiento de colonias en agar TSA (derecha)

Los ejemplares con signos de enfermedad que se muestrearon, presentaban cuadros macroscópicamente notorios de ulceraciones avanzadas y profundas, comprometiendo severamente a la dermis, músculo, aleta caudal, exoftalmia y oscurecimiento de la piel debido al estrés causado por la enfermedad; provocando un nado errático en la mayoría de los ejemplares. Similares características para peces enfermos son mencionadas por León *et al.* (2009) quienes estudiaron alevinos de trucha arco iris y observaron (macroscópicamente) cuadros patológicos muy evidentes de erosiones o ulceraciones severas y muy profundas que afectaban la piel, músculo, aleta dorsal y región del pedúnculo caudal del huésped (Figura 4)



Figura 4. Recuperación de heridas en peces: Peces antes de iniciar el tratamiento (izquierda) y peces al finalizar el tratamiento (derecha)

Los peces muestreados, presentaron heridas notables que comprometían el músculo, características típicas de la bacteria patógena *Flavobacterium psychrophilum*, tal como lo indica Chiok (2011) en su estudio señalando que la enfermedad se caracteriza por oscurecimiento, erosiones y ulceraciones en la piel, necrosis de aletas y branquias. Los casos severos exhibían descamación completa de la aleta caudal.

La identificación de *Flavobacterium psychrophilum* se realizó con Agar Soya Tripticasa (TSA), donde se pudo evidenciar el crecimiento de las colonias transcurridas las 48 horas después de su siembra en el medio de cultivo, tomando un total de 18 cepas para identificarlas morfológicamente mediante la prueba de Gram negativas. El mismo medio de cultivo fue empleado por León, Ávalos y Ponce (2009) a partir de muestras patológicas lograron aislar tanto del medio AOA como del TSA un total de 29 cepas Gram negativas. Microscópicamente, resultaron ser bacilos Gram negativos.

Se identificó también la presencia de bacterias Gram negativas como la *Escherichia coli*, la misma que se pudo evidencia con un crecimiento en el Agar MacConkey.

EFFECTO DE PROPÓLEO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LA TRUCHA ARCO IRIS EN LA ETAPA DE ENGORDE

Según los resultados mostrados en la Tabla 2, la mejoría de los individuos con los diferentes tratamientos de dosis de propóleo T1, T2, T3 y T4 se evidenció a partir de la segunda semana de tratamiento; es decir, a partir de los 15 días después de iniciado la suministración de las dosis de propóleo con el alimento balanceado.

Los individuos que pertenecieron a la tercera repetición no llegaron a ser tratados hasta el día 23 como en las anteriores repeticiones (1° y 2°) ya que debieron ser cosechados.

Las últimas observaciones (21-30 días) de las repeticiones 1°, 2° y 3°, de acuerdo a la Tabla 2, permitieron ver mejores resultados en los tratamientos T3 y T4, dado a que tuvieron una mayor cantidad de individuos recuperados en comparación del Testigo y las dosis de T1 y T2. Los resultados se comparan por repetición (Tabla 2) y cada tratamiento se compara versus el testigo.

Tabla 2. Tratamiento con propóleo y número de peces con recuperación según evolución/días

Tiempo	Repeticiones	Tratamiento con propóleo (N° peces con recuperación)				
		Testigo (0 ml)	T1 (1.5 ml)	T2 (2.5 ml)	T3 (3.5 ml)	T4 (4.5 ml)
1- 7 días	1° Repetición	0	0	0	0	0
	2° Repetición	0	0	0	0	0
	3° Repetición	0	0	0	0	0
8 – 14 días	1° Repetición	0	3	6	7	9
	2° Repetición	0	4	5	8	8
	3° Repetición	0	5	5	9	11
15 -21 días	1° Repetición	5	12	21	29	34
	2° Repetición	4	13	22	30	36
	3° Repetición	0	19	28	37	42
22 – 30 días	1° Repetición	6	17	33	38	40
	2° Repetición	8	19	32	39	44

Es así que, a una mayor concentración de la dosis podemos mencionar que tendríamos mejores resultados en menor tiempo de tratamiento. Siendo el alimento consumido por tratamiento en un promedio de 200 g por día, cantidad de alimento que fue calculado empleando la tabla de alimentación de la línea Nicovita Truchas.

En la Figura 5 se muestra la comparación de los tratamientos en relación a las unidades de individuos que se lograron recuperar con las diferentes dosis de propóleo suministradas; individuos que fueron alimentados acomodándose de acuerdo al cálculo de la tabla de alimentación de Nicovita Truchas, obteniendo una Tasa de Alimentación de 1.0. En la Primera repetición en la prueba Testigo se recuperará el 12% (6 ejemplares), en el tratamiento T1 34% (17 ejemplares), en el T2 66% (33 ejemplares), en el T3 76% (38 ejemplares) y en el T4 de 80% (40 ejemplares). En la Segunda repetición, en la prueba Testigo se recuperará el 16% (8 ejemplares), en el tratamiento T1 38% (19 ejemplares), en el T2 64% (32 ejemplares), en el T3 78% (39 ejemplares) y en el T4 de 88% (44 ejemplares).

En la Tercera repetición en la prueba Testigo se recuperará el 0%, en el tratamiento T1 34% (19 ejemplares), en el T2 56% (28 ejemplares), en el T3 74% (37 ejemplares) y en el T4 de 84% (42 ejemplares).

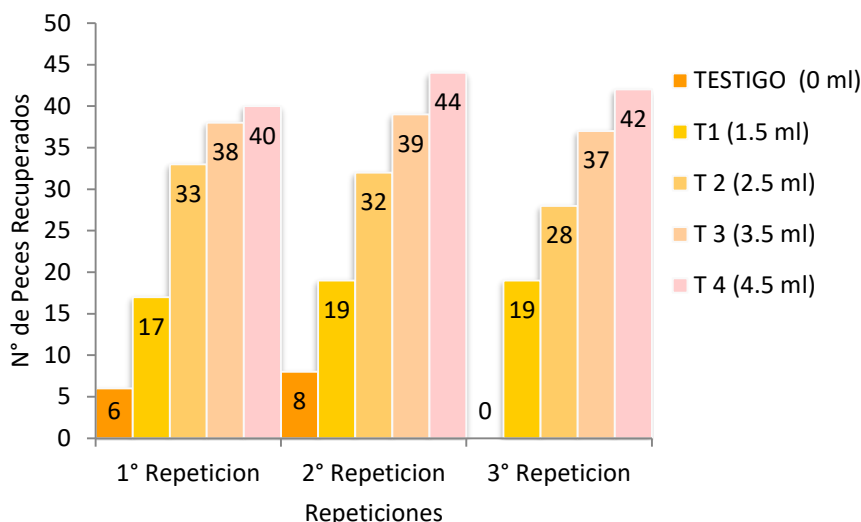


Figura 5. Comparación de tratamientos y peces recuperados en cada repetición.

En comparación con los resultados obtenidos por Beyraghdar, Ebrahimi, Mahboobi y Samie (2010), al final de su experimento sobre los efectos de administración de propóleo (0; 0,5; 1,5; 4,5 y 9,0 g de propóleos/kg dieta) en los parámetros bioquímicos en suero de trucha arco iris; para determinar la posible toxicidad y efectos, las tasas de supervivencia (%), peso ganancia (%), tasa de crecimiento específico (SGR) y en vivo index (LI), no se observaron muertes en cualquiera de los grupos durante todo el período del experimento. El aumento de peso, SGR y LI de los peces no fueron significativamente ($P: 0,05$) influenciado por la suplementación dietética de propóleos.

Además Selamoglu y Fuat (2009) también determinaron los efectos de los extractos de propóleos (0,01; 0,02 y 0,03 g/L) en los parámetros bioquímicos y hematológicos en trucha arco iris, es así que los peces expuestos a 0,01 g/L no cambió ($p: 0,05$) los niveles de glucosa, proteína total, creatinina, BUN, triglicéridos, colesterol total, amilasa, en comparación con el grupo control. Los peces expuestos a 0,02 y 0,03 g/L presentaron un aumento significativo ($p: 0,05$) en glucosa, BUN, triglicéridos, niveles de colesterol total y LDH, amilasa y actividades de GGT en comparación con el grupo control. Encontraron también un aumento estadísticamente significativo en el nivel de hierro de la misma en comparación con el control y 0,01 g/L ($p: 0,05$). En el presente estudio, las dosis efecto protector de propóleos se compararon con el grupo control en los parámetros hematológicos y bioquímicos, sus datos mostrados resultaron que el propóleo tiene un efecto importante sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos en 0,01 g/L, mientras que concentraciones de 0,02 y 0,03 g/L parecen ser desfavorable para el tejido de la sangre de truchas arco iris.

Abd-El-Rhman (2009) quien trabajó con la tilapia *Oreochromis niloticus* en laboratorio *in vitro* determinó la actividad antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila* sembrándolas en

placas petri e impregnando en papel filtro extracto etanólico de propóleo obteniendo que la concentración de inhibición mínima (MIC) de extracto etanólico de propóleo contra *Aeromonas hydrophila*, fue 80 µg propóleos. Por otro lado también evaluó el efecto en el rendimiento de la tilapia alimentándolas con propóleos mezclado en su dieta en pellets y así para observar su crecimiento; trabajó con un total de 225 peces con 25 unidades por repetición, alimentándolos por un lapso de 28 días, trabajando con tres dietas diferentes: T1(dieta control), T2 (1% extracto etanólico de propóleo) y T3 (propóleo crudo al 1%) obteniendo una mayor tasa de crecimiento con la prueba T2, seguido por T3 y el más bajo T1, siendo su FCR obtenido de 0.8=T2 y 2.0=T1 (la más alta).

Carrillo *et al* (2011) en su evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos y determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), del extracto etanólico fue 0,93 mg mL⁻¹ para las Gram positivas siendo *S. aureus* la bacteria más susceptible, ya que requirió de una menor CMB para ser inhibida, y 7,5 mg mL⁻¹ para las Gram negativas, mientras que la CMB del extracto acuoso fue de 20 mg mL⁻¹ para Gram positivas y 30 mg mL⁻¹ para Gram negativas; las cepas bacterianas mostraron menor susceptibilidad a los extractos acuosos que a los extractos etanólicos.. Los resultados obtenidos por Carrillo *et al.* (2011), son similares a los de Tolosa y Cañizares (2002) en el que indican que existe un efecto bactericida tanto del extracto etanólico como del acuoso frente a bacterias Gram positivas. Determinaron que el extracto etanólico de propóleo es efectivo contra las bacterias Gram positivas (*Streptococcus pyogenes* y *S. aureus*) y Gram negativas (*S. typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*), al obtener una CMB de 0.93 mg mL⁻¹ en ambos tipos de bacterias, en cambio el extracto acuoso frente a las bacterias Gram positivas requirió una CMB de 3.75 mg mL⁻¹, y contra las Gram negativas la CMB fue de 15 mg mL⁻¹ lo que hace al extracto acuoso menos inhibitorio que el etanólico. Ambos trabajos fueron realizados en laboratorio.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Tabla 3, se obtuvo que los tratamientos fueron altamente significativos por tener un resultado de 0.00 de significancia, dando a entender que los tratamientos empleados tuvieron resultados positivos en cuanto a la cicatrización de las heridas en los peces experimentados.

Tabla 3. Pruebas de los efectos inter-sujetos, variable dependiente el número de truchas recuperadas utilizando el ANVA

F.V.	S. C. tipo III	gl	C.M.	F	Sig.
Modelo	13580.667	5	2716.133	442.848	0.000
TRAT	13580.667	5	2716.133	442.848	0.000
Error	61.333	10	6.133		
Total	13642.000	15			

En la Tabla 4, según los resultados de la prueba Duncan se determine que los tratamientos testigo, T1, T2 y T3 fueron estadísticamente diferentes, pero el T3 y T4 fueron estadísticamente iguales.

Tabla 4. Prueba de comparación de medias, de acuerdo al número de truchas recuperadas, utilizando la prueba de Duncan

Dosis de Propóleo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Testigo (0 ml)	3	4.67			
T1 (1.5 ml)	3		18.33		
T 2 (2.5 ml)	3			31.00	
T 3 (3.5 ml)	3				38.00
T 4 (4.5 ml)	3				42.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	0.076

En comparación con los resultados obtenidos por Beyraghdar, Ebrahimi, Mahboobi y Samie (2010) también sometieron sus datos a la forma de análisis de varianza (ANVA) para ver la significancia entre cada una de sus dosis empleadas (0 ml control; 0.5 ml; 1.5 ml; 4.5 ml y 9.0 ml/g propóleo/kg de dieta) y para determinar las diferencias entre las medias encontradas utilizaron la prueba de rangos múltiples de Duncan (cuyo nivel de significancia se definió como por 0,05) utilizando el programa estadístico (SPSS versión 15.0).

De acuerdo a los resultados obtenidos de las medias con la prueba estadística de Duncan se aprueba la hipótesis de que las concentraciones de 3.5 ml y 4.5 ml tuvieron mayor efectividad en la cicatrización de las heridas en los peces que se estudiaron.

Referencias

- ABD El Rhman, A.M.M. (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Egipto. *Fish & Shell Fish Immunology*: Vol. 27: 454 – 459.
- Beyraghdar, K. O., Ebraimi, D. E., Mahboobi, S. N., & Samie, A. (2011). Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 315 – 318.
- Carrillo, M.L., Castillo, L.N., & Mauricio, R. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). México. *Información Tecnológica*, 22 (5): 21 - 28.
- Chiok, C. K.L. (2011). Patogenicidad y tipificación de *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arco iris. SIRIVS. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. *Salud Animal*, 12 pp.
- Gulhan, M. F., Duran, A., Talas, Z.S., Kakoolaki, S. & Mansouri, S.M. (2012). Effects of propolis on microbiologic and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the pesticide. Turquía. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11 (3): 490 - 503.
- León, J., Avalos, R., Ponce, M. (2009). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. Revista Peruana de Biología 15: 117- 124. doi: 10.15381/rpb.v15i2.1737
- Martínez, G.J.P. (2009). Caracterización físico – química y evaluación de la actividad antifúngica de

propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. Tesis de grado presentada para optar el Título de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentaria. Medellín – Colombia. 102 pp.

Mayta, T. F.R., & Sacsquispe, C.S. (2010). Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Perú. *Revista Estomatología Herediana*, 20 (1): 1 – 6.

Meixner, M.D.P. (2007). Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de una cepa nacional de *Flavobacterium pschrophilum* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis presentada para optar el título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia – Chile. 33 pp.

Muñoz, R. L.C., Linares, V.S.E., & Narváz, S.W. (2011). Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. Colombia. *Biosalud*, 10 (2): 101 – 111.

Selamoglu, T. Z., & Fuat, G. M. (2009). Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turquía. Elsevier – *Ecotoxicology and Environmental Safety*: Vol. 72, Serie 7, pp. 1994 – 1998.

Tolosa, L. & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. México. *Ars Pharmaceutica*, 43 (1-2): 187 – 204.