



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**USO DE EXTRACTOS VEGETALES EN LA ALIMENTACIÓN EN CRÍAS DE
TILAPIA *Oreochromis niloticus* EN AGROECOSISTEMAS ACUÍCOLAS**

ZULEMA GUADALUPE HUICAB PECH

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México.

2017

La presente tesis, titulada: **Uso de extractos vegetales en la alimentación en crías de tilapia *Oreochromis niloticus* en agroecosistemas acuícolas**, realizada por la alumna: **Zulema Guadalupe Huicab Pech**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
AGROECOSISTEMAS TROPICALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Cesáreo Landeros Sánchez

ASESOR:



Dra. María del Refugio Castañeda Chávez

ASESOR:



Dra. Fabiola Lango Reynoso

ASESOR:



Dr. Catalino Jorge López Collado

ASESOR:



Dr. Eugenio Carrillo Ávila

Tepetates, Veracruz, México, 10 de septiembre de 2017.

USO DE EXTRACTOS VEGETALES EN LA ALIMENTACIÓN EN CRÍAS DE TILAPIA *Oreochromis niloticus* EN AGROECOSISTEMAS ACUÍCOLAS

Zulema Guadalupe Huicab Pech, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2017.

En la acuicultura, el uso de extractos vegetales es una demanda internacional en respuesta al impacto excesivo por aplicación de compuestos químicos, a fin de evitar las enfermedades bacterianas, víricas y fúngicas en los sistemas de producción. Entre las enfermedades bacterianas, en cultivo de tilapia, *Aeromonas hydrophila* es una bacteria que causa el 80% de mortalidad y que está presente a lo largo de todo el periodo de producción. Una de las alternativas para controlar el brote bacteriano es la creación e innovación de productos con ingredientes vegetales y probióticos. Es por ello, que el objetivo del presente estudio fue disminuir la mortalidad de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* en agroecosistemas acuícolas, causada por la presencia de bacterias patógenas, mediante la aplicación de extractos vegetales, como aditivos alimenticios, para mejorar la calidad de la producción de organismos y de efluentes. Se realizaron análisis externos y pruebas bioquímicas para conocer la presencia de bacterias en la especie de Tilapia del Nilo. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la combinación de extractos y probióticos con medios selectivos para especies de bacterias lácticas y se estableció una metodología para la activación, crecimiento, antibiogramas y medios envenados. Mediante pruebas *in vitro*, se encontró que el probiótico *Enterococcus faecium* a una concentración de 9.0×10^2 UFC mL⁻¹ inhibió el crecimiento de *A. hydrophila* (2.0×10^8 UFC mL⁻¹) en cada uno de los tratamientos. Posteriormente, la combinación de los extractos de orégano y nopal con *E. faecium* mostró un halo de inhibición superior a 8.5 ± 1.5 mm en comparación con el extracto de sábila. Por otra parte, la combinación de *L. acidophilus*, a una concentración de 3.24×10^3 UFC mL⁻¹, con orégano, mostró mayor inhibición del patógeno en comparación con los extractos de nopal y sábila. Para el extracto de pozol con bacterias *E. faecium* a una concentración de 2.8×10^2 UFC mL⁻¹ indicó que cuando el probiótico se combinó con orégano y sábila, la inhibición fue superior en comparación con nopal, el cual no presentó inhibición de *A. hydrophila* en ninguno de las concentraciones. Por su parte, el extracto de alfalfa compuesto por bacterias de *B. subtilis* a una concentración de 1.0×10^3 UFC mL⁻¹ en

combinación con el extracto de nopal mostró la expansión del probiótico en la superficie del medio (20.0 ± 2.0 mm) evitando el crecimiento del patógeno. El extracto de maíz con *Lactobacillus plantarum* a concentraciones de 2.8×10^2 , 2.0×10^2 y 1.0×10^3 UFC mL⁻¹ en combinación con los extractos de nopal y sábila mostró halos de inhibición de 5.0 ± 0.1 mm. Los diferentes resultados expresan que la combinación de probióticos con extractos, tales como; orégano, nopal y sábila permitió la inhibición del patógeno, por lo que su uso sería una contribución para lograr sistemas acuícolas más sustentables.

Palabras clave: Probióticos, halo de inhibición, agroecosistemas.

**USE OF EXTRACTS VEGETABLE IN THE FOOD IN BREENDING OF TILAPIA
Oreochromis niloticus IN AGROECOSYSTEMS AQUACULTURE**

Zulema Guadalupe Huicab Pech, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2017.

In aquaculture, the use of vegetable extracts is an international demand, in response to the excessive impact of the application of chemicals to prevent the tilapia breeding mortality by bacterial diseases in cultivation systems. Among the bacterial diseases, cultivation of tilapia, *Aeromonas hydrophila* is a bacterium that causes 80% of mortality, which occurs throughout the production period. One of the alternatives to control the bacterial outbreak is the creation and innovation of products with natural probiotics and vegetable ingredients. For this reason, the objective of the present study was to decrease the mortality of tilapia breeding *Oreochromis niloticus* in agroecosystems aquaculture, caused by the presence of pathogenic bacteria, through the application of plant extracts, such as food additives, to improve the quality of organisms production and effluents. Internal and biochemical tests were performed for the presence of bacteria in the Nile Tilapia species. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the combination of extract and probiotics with selective media for species of lactic acid bacteria (BAL) was determined. A methodology for activation, growth, antibiograms and poisoned media was developed. As a result of *in vitro* tests of *Enterococcus faecium* at a concentration of 9.0×10^2 CFU mL⁻¹, the growth of *A. hydrophila* (2.0×10^8 CFU mL⁻¹) in each treatments was inhibited. Subsequently, the combination of extracts of oregano and nopal with *E. faecium* showed an halo of inhibition was larger than 8.5 ± 1.5 mm compared with *Aloe vera* extract. Furthermore, the combination of *L. acidophilus* 3.24×10^3 CFU mL⁻¹ with oregano concentration showed greater inhibition of the pathogen compared with nopal and sabila extracts. The bacteria *E. faecium* with a concentration of 2.8×10^2 CFU mL⁻¹ indicated that when this probiotic was combined with oregano and sabila, the inhibition was greater than that with nopal, which did not present inhibition of *A. hydrophila* in none of the concentrations. Moreover, *B. subtilis* being a probiotic from alfalfa with a concentration of 1.0×10^3 CFU mL⁻¹ in combination with nopal showed an expansion of the probiotic on the surface of the medium (20.0 ± 2.0 mm) preventing the growth of the pathogen *A. hydrophila*. For *Lactobacillus plantarum* obtained from the extract of corn to a

concentrations of 2.8×10^2 , 2.0×10^2 and 1.0×10^3 UFC mL⁻¹ in combination with cactus and sabila extracts showed halos of inhibition of 5.0 ± 0.1 mm against the pathogen *A. hydrophila*. The combination of probiotics with vegetable extracts such as oregano, nopal and sabila gave as a result the pathogen growth inhibition, which may contribute to produce tilapia in a more sustainable way in aquaculture systems.

Keywords: Probiotic, inhibition halo, agroecosystem.

AGRADECIMIENTOS

A *Dios* por su amor incondicional y las bendiciones que he recibido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por la beca (**229918**) otorgada durante el periodo de Agosto de 2013 a Agosto de 2017 para realizar mis estudios de Doctorado en el Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por permitirme formar parte de su programa de postgrado en Agroecosistemas Tropicales.

Al Dr. Cesáreo Landeros Sánchez, por fungir como mi Profesor Consejero, y por su paciencia y confianza durante mis estudios y la realización de la tesis.

A la Dra. María del Refugio Castañeda Chávez, como mi asesor de mi Consejo Particular, agradezco su apoyo y sus atenciones profesionales y personales.

A la Dra. Fabiola Lango Reynoso, por su apoyo en mi formación profesional y humano en el transcurso de mis estudios doctorales.

Al Dr. Catalino Jorge López Collado, por su apoyo en el transcurso de la tesis, sus comentarios y sugerencias para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Al Dr. Eugenio Carrillo Ávila, por su participación en mi Consejo particular y desarrollo de la tesis.

A mis compañeros y maestros del laboratorio. Gracias por su apoyo durante mi estancia en el Instituto Tecnológico de Boca, principalmente a la MC. Mijal, MC. Magnolia y MC. Christian.

A mis amigos del COLPOS VER. El Doctorado me permitió conocerlos y formar una familia invaluable.

A mi hija **Renata Maryam**, a mis padres: Ramón y María, y hermanas: Viridiana, Salome y Alberto, y sobrinos Antony, Diego y Regina. No hay palabras para explicar y hacer remunerado lo que realmente siento en mí ser, lo único que puedo decirles es **GRACIAS** por estar en el momento y lugar indicado. *Dios los bendiga siempre.*

DEDICATORIA

Con mucho cariño para ti...Abuelita María Albina... (QDEP)

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	3
2.1 Modelo teórico conceptual para el análisis del agroecosistema acuícola y el efecto de la concentración mínima inhibitoria de extractos vegetales y probióticos contra bacterias patógenas.....	3
2.1.1 Episteme.....	3
2.1.2 Teoría de sistemas y sistemas complejos.....	4
2.1.3 Concepto de Agroecosistemas AEST.....	5
2.1.4 El agroecosistema en cultivos de tilapia <i>O. niloticus</i> y uso de extractos naturales.....	8
2.2 Presencia y distribución de patógenos bacterianos en cultivos de <i>Oreochromis niloticus</i>	10
2.2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.2.2 <i>Francisella</i> sp.....	13
2.2.3 <i>Edwardsiella tarda</i>	14
2.2.4 <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
2.3 Sistema inmunológico de organismos acuáticos (hospedero).....	17
2.3.1 Perspectivas del patógeno.....	19
2.3.2 Perspectivas del medio ambiente.....	23
2.4 Alternativas naturales en el sector acuícola.....	26
2.4.1 Probióticos.....	26
2.4.2 Extractos vegetales en la acuicultura.....	27
2.4.3 Extractos de nopal <i>Opuntia ficus indica</i>	28
2.4.4 Extracto de orégano <i>Lippia berlandieri</i>	30
2.4.5 Extractos de sábila <i>Aloe vera</i>	32
2.5 Interés en los inmunoestimulantes en el sector acuícola.....	33
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	35
4. HIPOTESIS	36
5. OBJETIVOS	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1 Colecta de organismos.....	37
6.2 Toma de parámetros fisicoquímicos del agua.....	37
6.3 Procesamiento e identificación bacteriana.....	37
6.3.1 Tinción de Gram.....	38
6.3.2 Prueba de catalasa.....	38
6.3.3 Prueba de Motilidad, Indol y Ornitina (MIO).....	38
6.3.4 Prueba en Agar con hierro de Kligler/ azúcar triple y hierro.....	39
6.3.5 Prueba rojo de metilo (MR) y Prueba Voges-Proskauer (VP).....	39
6.4 Obtención de extractos vegetales de nopal <i>Opuntia ficus indica</i> , sábila <i>Aloe vera</i> y orégano <i>Lippia berlandieri</i>	40

6.5 Activación de probióticos de maíz <i>Lactobacillus plantarum</i> , alfalfa <i>Bacillus subtilis</i> , pozol <i>Enterococcus faecium</i> , suero de leche <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	41
6.6 Inoculación de cepas patógenas de <i>Aeromonas hydrophila</i>	41
6.7 Preparación del fermentado vegetal y los probióticos.....	43
6.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	43
6.9 Análisis estadístico.....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
7.1 Parámetros fisicoquímicos del agua.....	45
7.2 Análisis externo en tilapia <i>O. niloticus</i>	46
7.3 Composición taxonómica de bacterias encontradas en la especie de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	48
7.4 Activación de probióticos de maíz <i>Lactobacillus plantarum</i> , alfalfa <i>Bacillus subtilis</i> , pozol <i>Enterococcus faecium</i> , suero de leche <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	53
7.5 Pruebas de sensibilidad contra el patógeno <i>A. hydrophila</i>	55
7.6 Contrastación de hipótesis.....	73
8. CONCLUSIONES	74
9. LITERATURA CITADA	76

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Valores de parámetros fisicoquímicos del agua en estanques de pre-engorda de <i>O. niloticus</i>	45
Cuadro 2. Valores de parámetros fisicoquímicos del agua en estanques de engorda de <i>O. niloticus</i>	46
Cuadro 3. Presencia-Ausencia de patógenos en tilapia <i>O. niloticus</i> durante las etapas de pre-engorde y engorde	50
Cuadro 4. Determinación de géneros bacterianos por pruebas bioquímicas en los meses de marzo, abril y mayo. Bacilo (B), Cocos (C), Oxidasa (O), Catalasa (Ct), Motilidad (Mo), Indol (Ind), Ornitina (Orn), Lisina (Lis), Rojo de Metilo (MR), Vogues-Proskeaur (VP).....	51
Cuadro 5. Activación de probióticos en condiciones de temperatura ambiente, refrigeración y congelación.....	53
Cuadro 6. Relación de las combinaciones entre probiótico, patógeno y extractos naturales.....	72

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Modelo conceptual de un Agroecosistema acuícola.....	10
Figura 2.	Diagrama conceptual del equilibrio dinámico entre el hospedero, patógeno y medio ambiente. Tomado de Huicab-Pech <i>et al.</i> (2016).	25
Figura 3.	Proceso de extracción de plantas de nopal <i>Opuntia ficus indica</i> , sábila <i>Aloe vera</i> y orégano <i>Lippia berlandieri</i>	40
Figura 4.	Siembra y activación de probióticos <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	41
Figura 5.	Inoculación del patógeno <i>Aeromonas hydrophila</i> aplicando la siembra por picadura, estría cruzada y agitación	42
Figura 6.	Dilución de <i>Aeromonas hydrophila</i> en medios cuenta en placa y agar nutritivo.....	42
Figura 7.	Prueba microbiológica “antibiograma” y medición de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	43
Figura 8.	Signos externos de daños y anomalías. A, B y C: Decoloración de piel, D: Hemorragias en la piel, E: Opacidad corneal, F: Aletas deshilachadas.....	47
Figura 9.	Pruebas de catalasa en cepas probióticas de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	54
Figura 10.	Colonias de bacterias probióticas en medios de caldo y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe).....	54
Figura 11.	Halo de inhibición del probiótico <i>Enterococcus faecium</i> contra <i>A. hydrophila</i> . Se muestra diferencia significativa entre los tratamientos (concentración de bacterias probióticas).....	56
Figura 12.	Crecimiento de inhibición contra el patógeno <i>A. hydrophila</i>	57
Figura 13.	Metodología para el proceso de la fermentación. Preparación de medio Dzapec y pesado de extractos de orégano, nopal y sábila....	58
Figura 14.	Frascos con medio dzapec, extracto de plantas de nopal, sábila, orégano y probióticos.....	58
Figura 15.	Efecto del orégano <i>Lippia berlandieri</i> y sábila <i>Aloe vera</i> contra <i>A.</i>	

	<i>hydrophila</i>	60
Figura 16.	Efecto de extractos de nopal <i>Opuntia ficus indica</i> y <i>Enterococcus faecium</i> contra <i>A. hydrophila</i>	61
Figura 17.	Antibiogramas y halos de inhibición contra <i>A. hydrophila</i> al aplicar extractos de sábila y orégano.....	61
Figura 18.	Efecto del extracto de nopal <i>Opuntia ficus indica</i> contra <i>A. hydrophila</i> (A, B, C).....	62
Figura 19.	Efecto del extracto de orégano <i>L. berlandieri</i> contra <i>A. hydrophila</i> ..	63
Figura 20.	Inhibición de <i>A. hydrophila</i> al aplicar el orégano <i>L. berlandieri</i> (A, B, C).....	64
Figura 21.	Efecto del extracto de oregano <i>L. berlandieri</i> y sábila <i>Aloe vera</i> contra <i>A. hydrophila</i>	65
Figura 22.	Inhibición de <i>A. hydrophila</i> al aplicar <i>L. berlandieri</i> y <i>Aloe vera</i>	65
Figura 23.	Efecto del extracto de nopal <i>Opuntia ficus indica</i> contra <i>A. hydrophila</i>	68
Figura 24.	Frascos con extracto de oregano <i>L. berlandieri</i> y <i>B. subtilis</i> (A).Inhibición del <i>A. hydrophila</i> , al aplicar <i>Opuntia ficus</i> (B, C).....	69
Figura 25.	Efecto del extracto de nopal <i>O. ficus</i> , sábila <i>A. vera</i> y orégano <i>L. berlandieri</i> contra <i>A. hydrophila</i>	71
Figura 26.	Inhibición de <i>A. hydrophila</i> (A). Frascos con extractos de orégano, nopal y sábila en combinación con <i>L. plantarum</i> (B). Crecimiento de colonias probióticas de maíz <i>L. plantarum</i> (C).....	71

ABREVIATURAS

Unidades formadoras de colonias	UFC
Miligramos por litro	mg L ⁻¹
Hectárea	ha
Milímetro	mm
Concentración Mínima Inhibitoria	CMI
Unidades formadoras de colonias	UFC
Microlitro	μL
Mililitro	mL
Tonelada	t
Carbono	CO ₂
Catalasa	H ₂ O ₂

1. INTRODUCCIÓN

El género tilapia se considera un grupo de peces de importancia económica, comercial y nutritiva. Entre las especies comerciales se encuentra *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis hornorum*, *Tilapia rendalli* y *Tilapia zilli* (FAO, 2008). De acuerdo con la FAO (2010) 99% de la especie se cultiva fuera de su hábitat original, y su cultivo se posiciona en segundo lugar a nivel mundial, principalmente en los países de Filipinas, Indonesia, Tailandia, Malasia, China, Chile, México, Ecuador, Brasil y Colombia, con producciones que superan el cultivo de salmónidos y carpas (FAO, 2010). El éxito de la producción de tilapia se debe a que presentan: rápido crecimiento, facilidad de propagación, tolerancia a condiciones ambientales, fácil aceptación a los alimentos naturales y suplementos alimenticios, resistencia a enfermedades y mala calidad de agua.

El 90% de las enfermedades en los sistemas de cultivo están asociados con las deficientes prácticas de manejo, pobre aplicación de los programas de bioseguridad y falta de conocimiento del productor sobre la ausencia y presencia de riesgos patógenos, todo relacionado con la producción de alimentos a bajo costo a partir de la intensificación de cultivos acuícolas. Entre las enfermedades que causan mortalidades en tilapia se localizan los patógenos bacterianos de *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Francisella* sp., *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* (Huicab-Pech *et al.*, 2016). Algunos de estos patógenos presentan una distribución geográfica en regiones tropicales y templadas donde comúnmente se cultivan especies de agua cálidas, como es el caso de la tilapia del Nilo. La MSD (*Merck Sharp & Dohme Corp.*) Animal Health (2011) menciona que las mortalidades corresponden al incremento de densidades de siembra (número de peces por metro cúbico) y Bondad-Reantaso *et al.* (2005) indican que los problemas sanitarios y la introducción de especies son el resultado de la aparición de enfermedades emergentes.

Según Snieszko (1975) indica que la enfermedad se relaciona con la interacción que existe entre los peces, el agente patógeno y el medio acuático como hábitat; es decir, cuando un organismo se expone a una bacteria patógena en ambientes desfavorables, por ejemplo; mala calidad de agua o exceso de materia orgánica, la incidencia de la enfermedad es mayor, debido a que se rompe el equilibrio entre el huésped, hospedero y medio ambiente acuático. Sin embargo, los peces presentan una gran diversidad bacteriana, efecto simbiótico entre bacterias, que los protege para

adaptarse a cambios nutricionales y asimilación de alimento en el tracto digestivo (Al-Harbi y Uddin, 2005).

Actualmente, la acuicultura considera el uso de la medicina herbolaria “fitoterapia”, como una alternativa para reducir el impacto ambiental y mejorar la calidad sanitaria del cultivo, y al mismo tiempo prevenir enfermedades en organismos acuáticos (Prieto *et al.*, 2005). La fitoterapia es clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la ciencia que estudia aquellos productos de origen vegetal para la fabricación de medicamentos y síntesis de fármacos (Prieto *et al.*, 2005). La OMS indica que el 80% de la población terrestre usa organismos vegetales en aplicación terapéutica (WHO, 2008). Este concepto inicia desde la aplicación de la medicina tradicional la cual se define como la suma de saberes, aptitudes y prácticas de cura basadas en teorías, creencias y conocimientos de pueblos indígenas de diversas culturas.

El uso de probióticos en la acuicultura aún es mínimo, sin embargo, Gómez-Gil *et al.* (2000) indican que el aumento en la producción respecto con la talla (longitud y peso) y la resistencia de enfermedades favorece la relación costo-beneficio. Dentro de los métodos de selección se utilizan pruebas *in vitro* e *in vivo*; con la finalidad de conocer mediante pruebas antagónicas el mejor candidato contra bacterias patógenas en un tiempo determinado (Balcázar *et al.*, 2006). Estas pruebas se establecen con el objetivo de que las autoridades legislativas, la industria y el consumidor requieran un documento sobre los probióticos con el fin de conocer las propiedades microbianas de los productos (Qi *et al.*, 2009). Para la selección de cepas probióticas se consideran los siguientes criterios: no ser patógeno para los organismos acuáticos y el consumidor final; que se encuentren libres de plasmidios codificados; resistentes a sales biliares y pH bajos; que mantengan la capacidad de adhesión y colonización en el intestino (periodos cortos de duplicación); ser organismos antagónicos, poseer sustancias antimicrobiales y modular la respuesta inmune.

2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 Modelo teórico conceptual para el análisis del agroecosistema acuícola y el efecto de la concentración mínima inhibitoria de extractos vegetales y probióticos contra bacterias patógenas

En esta sección se hará una breve argumentación sobre la interpretación del concepto de agroecosistemas, así como algunos elementos teóricos-filosóficos de corrientes de pensamiento y posturas epistemológicas que explican el modelo de análisis del agroecosistema acuícola.

2.1.1 *Episteme*

Ésta investigación se fundamenta en la corriente empírico analítica, desde la visión positivista, debido a que aplica el método científico como su principal herramienta. Durkheim explica que la corriente positivista usa la razón y la objetividad. La corriente empírico de tipo clásico, manifiesta que el origen del conocimiento es a través de la experiencia, donde cada uno de los atributos e indicadores dependerán del objeto de estudio, los cuales serán evaluados a partir de la observación, la medición y la comparación de resultados (Pérez-Tamayo, 2008). En esta corriente se diseñan teorías sobre el fenómeno que se observa, tal y como lo menciona Mach (Pérez-Tamayo, 2008), y se fundamenta por el modelo científico de Galileo por el uso de números y diseños experimentales a partir de una pregunta de investigación, objetivos e hipótesis. Lo anterior permite buscar las causas que expliquen la naturaleza de los fenómenos, la confrontación de teorías y praxis, y al mismo tiempo establece conexiones entre variables y un método único de investigación (Mardones J. M. y Ursua N, 1994).

El filósofo positivista Augusto Comte hace referencia a la evolución del espíritu humano para explicar los fenómenos en relación a los hechos históricos, y menciona que todo lo que está dentro del conocimiento científico se considera cognoscible, es decir, que se fundamenta en la experiencia, y obedecen a las leyes naturales, las cuales son constantes y necesarias, sin embargo, el conocimiento científico reside también en la sociedad y sus costumbres, Comte clasifica a la ciencia como el único conocimiento verdadero, sin dejar de descubrir y explicar el comportamiento de las cosas para ser utilizadas en provecho de la humanidad.

2.1.2 Teoría de sistemas y sistemas complejos

La Teoría General de Sistemas (TGS) es una línea de pensamiento que permitió el desplazamiento de principios reduccionistas (método cartesiano). La TGS tiene un enfoque expansionista, es decir, cada objeto y acontecimiento parte de un sistema mayor (*suprasistema*), por lo tanto, un sistema es más que la suma de sus componentes y requiere de un trabajo con equipos multidisciplinarios.

La TGS es un término acuñado por el biólogo austriaco Ludwig von Bertalanffy en 1976, la postulación de la teoría integra a las ciencias naturales y sociales (Bertalanffy, 1973). La TGS ha presentado diversos cambios en su concepto desde los años 70. Un ejemplo lo demuestra Rosnay (1975) el cual relaciona el carácter dinámico de las interacciones entre los componentes y Dillon (1976) menciona la unión de los componentes por un objetivo común, coincidiendo actualmente con Herrscher (2003). Dent y Blackie (1979) consideran que un sistema es aquel que está integrado por subsistemas con una relación dinámica y estructura jerárquica organizada, es decir, que todos los sistemas pertenecen a sistemas superiores compuestos de sistemas (*subsistemas*) con un carácter abierto y evolutivo, sensible al ambiente donde se ubiquen y diferente a través del tiempo.

Los sistemas se consideran una abstracción de la realidad con estructura y función, y cumplen con los procesos de control y comunicación a partir de la cibernética *kybernetes*, es decir, el ente controlador (hombre o familia) quien modifica, interviene, orientan y define el agroecosistema (Altieri, 1995) con el objetivo de participar en el equilibrio ecológico y económico del Desarrollo Rural Sustentable de los AES (Martínez-Dávila *et al.*, 2011) de manera holística.

La TGS indica que cualquier actividad, como la agricultura, no puede ser separada de sus elementos, y que la síntesis, es el resultado de una totalidad mayor (*la producción de alimentos*) que la suma de sus partes.

Los sistemas tienen como elementos; la materia prima, la interacción de los componentes, entradas, salidas y límites (Hart, 1985). Sin embargo, la función del sistema es determinada por criterios de productividad, eficiencia y variabilidad, además de que el hombre con el uso de la percepción decide ver a los sistemas como un conjunto que posee propiedades, y señalaron que

los sistemas no son cosas, sino que hay cosas a las que tratamos como sistemas (Herrscher, 2003).

Ahora bien, desde el enfoque de sistemas complejos, un sistema complejo es una representación de un recorte de la realidad conceptualizado como una totalidad organizada, en la cual los elementos no son separables y por lo tanto, no pueden ser estudiados aisladamente (García, 2007). Lo anterior demuestra que estos sistemas representan una parte de la realidad y que su interpretación permite conocer aspectos físicos, biológicos, sociales, económicos y políticos, donde supuestos problemas o situaciones serán transformados por el uso de la investigación científica y tecnológica a partir de una visión compleja y holística (García, 2007).

García (2007) indicó que un sistema se construye por la abstracción e interpretación del objeto de investigación, y que el enfoque de sistemas complejos se establece por la percepción del controlador, el cual incluye aspectos de orden temporal y espacial que se manejan por la evolución y posibles transformaciones del sistema. El objetivo de estas teorías, tiene como función principal el desarrollo de nuevos enfoques de la investigación que pueda percibirse como modelos complejos de la realidad. Gliessman (2002) señaló que los objetos de estudio presentan en sus principios la complejidad entre las interacciones que existen en los procesos ecológicos y socioculturales, lo cual se observa desde el enfoque de agroecosistemas.

2.1.3 Concepto de Agroecosistemas AEST

El agroecosistema es una palabra compuesta *agro-eco-sistema*; donde el termino agro proviene del latín *ager* que significa campo, tierra, fuente de producción (Real Academia Española, 1992), el termino eco proviene del latín *oikos* que significa lugar donde se vive o estudio de las relaciones de los organismos con su medio, y sistema se define como un conjunto de cosas que ordenadamente relacionados entre sí contribuyen a determinado objeto y actúan como una unidad, una entidad o un todo (Becht, 1974). El agroecosistema (AEST) se considera la unidad óptima de estudio y desarrollo. Antes de conceptualizar el agroecosistema, se tendrá que conocer que es un sistema desde la perspectiva de la Teoría general de sistemas (Bertalanffi, 1976) y sistemas complejos (García, 2007).

El concepto de agroecosistemas involucra cadenas tróficas, ciclos de nutrimentos, comunidades de vegetales y animales, y el manejo del sistema por el hombre “*cibernético*”. El agroecosistema tiene el objetivo de usar el pensamiento y el análisis a fin de solucionar problemas complejos de manera holística a través de la unificación de varios campos de conocimiento (multidimensional) (Kast and Rosenzwaig, 1981). Lo anterior permite, desde un enfoque de sistemas, una visión amplia sobre aspectos y problemas del agro *ager*. El enfoque de sistemas en la agricultura, de acuerdo con Jones *et al.* (1997), presenta tres postulaciones; la primera es la naturaleza de los problemas contemporáneos, la necesidad del conocimiento de los sistemas agrícolas y los métodos convencionales inadecuados.

Ruiz-Rosado (1995) definió a los agroecosistemas como sistemas de relaciones entre los organismos coparticipes con la agricultura en sentido estricto y como la unidad agrícola donde intervienen factores económicos, sociales y tecnológicos, éstos promueven la sustentabilidad a través de las dimensiones sociales, económicas, políticas, tecnológicas y ecológicas.

El concepto de agroecosistema tiene sus raíces en la conceptualización de la agricultura. En 1977, Hernández-Xolocotzi consideró el agroecosistema como ecosistemas modificados para producir alimento y fibra para satisfacer las necesidades del hombre. Sin embargo, Gliessman (1990a) mencionó que el AEST debe ser expandido, restringido o alterado como una respuesta de las culturas humanas y su medio ambiente físico, biológico y social; y que se consideran más complejos que los ecosistemas naturales, principalmente por la interacción del hombre (Gliessman, 1990b). Desde el enfoque de sistemas, un agroecosistema es la unidad física donde se desarrolla la actividad agropecuaria, forestal y acuícola, e inciden factores económicos y ecológicos. El agroecosistema requiere de un análisis, diseño, manejo y evaluación, a fin de administrar los recursos naturales. Este manejo incluye la política local, nacional e internacional.

Como primera línea de complejidad, el agroecosistema presenta propiedades emergentes, por ejemplo; el cuadro *agro-ecológico* (productividad, estabilidad y sustentabilidad) y socio-económico (equidad); y como segunda línea se agrega el factor humano (cibernética).

Estos agroecosistemas incluyen el componente biótico y abiótico y la interacción entre ellos. De acuerdo con Martínez-Dávila (2001) el AEST “...es un modelo conceptual de la actividad agrícola en su nivel mínimo de control cibernético humano. Es considerado unidad óptima para

el estudio de la agricultura y para su propia transformación; está integrado a un sistema agrícola y rural regional a través de cadenas producción-consumo, con interferencias de política y cultura de instituciones públicas y privadas. El AEST es un sistema contingente abierto y construido a partir de la modificación social de un sistema natural, para contribuir a: 1) La producción de alimentos, materias primas y servicios ambientales que la sociedad en su conjunto demanda; 2) al bienestar de la población rural, y 3) a su propia sostenibilidad ecológica. El AEST posee procesos dinámicos de retroalimentación y control, regulados y autoregulados, como respuesta a las variaciones internas y de su entorno. La dimensión espacial, biodiversidad y objetivos del agroecosistema dependen del tipo de controlador que lo regula, de los recursos que éste maneja y de su interrelación con el entorno complejo”.

Posteriormente a este concepto Martínez-Dávila *et al.* (2004) integró el papel que desempeña el hombre, el cual se encarga del manejo y la transformación del agro. El AEST aplica la relación objeto-sujeto, esto permite conocer las necesidades de la sociedad y ubica a las investigaciones en la escala espacial o jerárquica que va desde subsistemas, sistemas y supra sistemas (*subsistema biológico, de trabajo, financiero, operacional, decisión y de información*) ejemplo; desde una parcela hasta el planeta (Ruiz y Oregui, 2001).

Posterior a conocer las relaciones que existen entre los sistemas y agroecosistemas, los sistemas complejos son una representación de un recorte de la realidad, conceptualizado como una totalidad organizada, este concepto debe ser aplicado para comprender y abordar el estudio de los sistemas de producción desde un enfoque epistémico. Los sistemas complejos permiten abordar el estudio de los sistemas a partir de un trabajo interdisciplinario, es decir, los grupos de investigación no son interdisciplinarios, son multidisciplinarios. Lo que es interdisciplinario es la metodología que implica el estudio del sistema complejo.

Un sistema complejo (SC) estudia una parte de la realidad donde se incluyen los aspectos físicos, biológicos, sociales, económicos y políticos, mediante la observación, hechos y teorías. Se gobiernan por una pregunta conductora que servirá de guía para la selección de los componentes del sistema, los límites y sus interrelaciones (interno y externo). La integración de información que se genere en los sistemas complejos es transformada durante la investigación. En primera, los límites pueden ser aquellas formas de producción y organización, económicas y culturales de

una región determinada. Los flujos de un sistema complejo pueden ser de materia, de energía, de crédito o de información, la cual se relaciona con la velocidad de cambio. Por su parte, los elementos son inter definibles y se constituyen por unidades complejas (*subsistemas*). En los sistemas complejos el primer proceso de análisis es el diagnóstico, el cual describe la situación real del fenómeno. De acuerdo con García (2007) estos sistemas incluyen procesos de primer, segundo y tercer nivel. Asimismo cuando se aplica el estudio a partir del enfoque de sistemas complejos es necesario estudiar el fenómeno bajo un marco conceptual y metodológico, a fin de conocer las características propias del sistema de estudio. Conway (1985,1987) en su definición, señaló que un AEST se considera como un ecosistema modificado por el hombre, el cual maneja los elementos para la producción de alimentos, fibras, productos y servicios. Con el paso del tiempo se incluyen elementos relacionados a niveles jerárquicos, (interacción vertical y horizontal) y propiedades emergentes tal y como lo postula Hart (1987).

2.1.4 El agroecosistema en cultivos de tilapia *O. niloticus* y uso de extractos naturales

El sector productivo acuícola demanda la intensificación de los cultivos con el objetivo de producir alimentos y mejorar la calidad de vida para la sociedad. La acuicultura maneja diversos elementos y componentes para transformar la materia prima que requiera el mercado regional, nacional e internacional. Esta actividad forma parte de los sistemas de producción agrícola con un manejo mínimo cibernético.

Un sistema de producción acuícola puede verse desde diversos enfoques conceptuales. Su concepto puede ser evolutivo, modelador, diagnóstico, espacio-temporal, sistémico y cibernético. Éstos modos de conceptualización se relacionan con el sistema acuícola, por ejemplo; la dependencia que existe entre el hombre y la naturaleza, el diseño y el manejo, para convertir la actividad en una entidad productiva y así favorecer el estado actual de la sociedad y su futuro (Gallardo-López, 2002). Al mismo tiempo, esta actividad es la unidad donde se cultiva y manejan especies vegetales y animales en un diferente arreglo temporal o espacial (Pérez-Vázquez, 1998).

Como concepto, el agroecosistema acuícola es un modelo conceptual modificado por el hombre, en su mínimo control cibernético, para satisfacer las demandas de la sociedad; integrando las dimensiones ecológicas, sociales, políticas y culturales en cada nivel jerárquico. El

agroecosistema acuícola integra la producción de alimentos, materia prima y la sustentabilidad del mismo, a partir de la transformación de insumos internos, a fin de obtener proteína de excelente calidad y sanidad. El agroecosistema acuícola cultiva diversas especies e involucra las cadenas tróficas, la comunidad de microorganismos, interacción de factores abióticos y el manejo por el hombre. Sin embargo, requiere de una visión sustentable con el ambiente y el enfoque de sistemas complejos para el desarrollo de estrategias que mejoren el proceso de producción. Los agroecosistemas acuícolas, como unidad estudio, requieren de un análisis preliminar para la solución de problemas (presencia de enfermedades bacterianas), es por ello que es necesario estudiar e investigar desde un enfoque sistémico complejo (*modelo conceptual o de simulación*) a partir de la aplicación epistemológica por grupos de trabajo multidisciplinario e interdisciplinario regidos por una política institucional (Figura 1).

La aplicación de la TGS y SC en el sector acuícola permite conocer y entender los principales problemas desde una base multidimensional (biológica, cultural, física y socioeconómica), tecnológica y ecológica, y su influencia a través del tiempo. Es interesante observar el campo productivo desde un enfoque de sistemas debido a que nos permite conocer y entender el comportamiento y las posibles soluciones desde el enfoque multidisciplinario y sus relaciones con la sociedad. Por tal motivo, el agroecosistemas es un sistema, el cual es construido a partir de la modificación social de un sistema natural, es decir, es un sistema contingente abierto, pero que necesita de una perspectiva de acción y objeto de estudio, como las principales causas de su enfoque y su concepto, respectivamente (Vilaboa-Arroniz *et al.*, 2009; Martínez-Dávila, 2011).

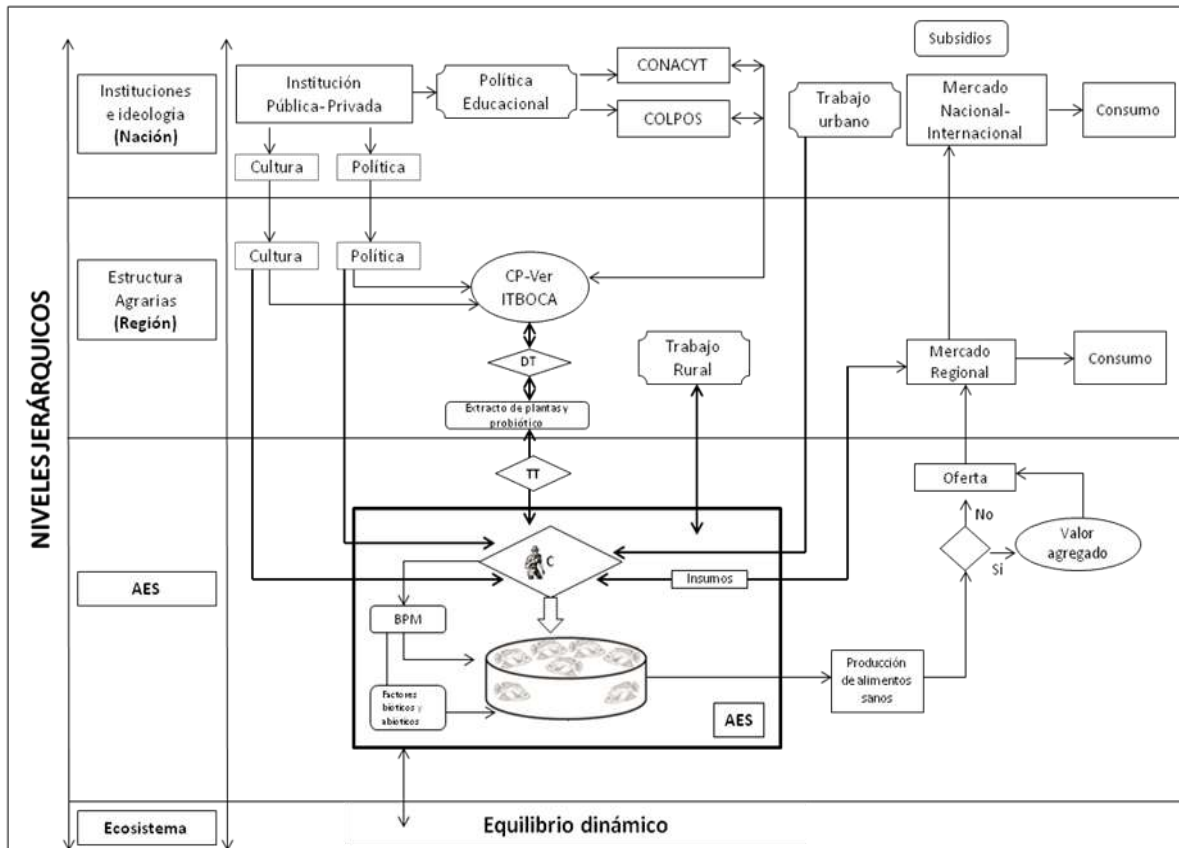


Figura 1. Modelo conceptual de un Agroecosistema acuícola.

2.2 Presencia y distribución de patógenos bacterianos en cultivos de *Oreochromis niloticus*

Entre las principales enfermedades bacterianas que causan elevadas pérdidas económicas se localizan las ocasionadas por las especies de *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Francisella* sp., *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* (Huicab-Pech *et al.*, 2016). Algunos se consideran patógenos facultativos, sin embargo su mayor forma de expansión en el cultivo se relaciona con el equilibrio entre el medio ambiente, estrés y hospedero (Huicab-Pech *et al.*, 2016). A continuación se describirán las bacterias patógenas con mayor impacto en el sector acuícola.

2.2.1 *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas es un patógeno facultativo Gram negativo, pertenece a la familia *Vibrionaceae* y mide $0.5 \times 10 \mu$. Dentro del linaje, se enlistan cuatro especies; *A. salmonicida* considerada la

causante de la furunculosis, y *A. sobria*, *A. caniae* y *A. hydrophila* como el principal agente de la septicemia, este último es el agente causal del síndrome de septicemia hemorrágica o plaga roja en la piel (Austin y Austin, 2007) y se distingue por ser un patógeno oportunista y contaminante en ambientes de cultivo.

Dentro del linaje de *Aeromonas* se definen *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas piscícola*, los cuales han sido aislados en especies de tilapia *Oreochromis* sp, trucha *Oncorhynchus mykiss*, salmón *Salmo Salar*, bagre *Ictalurus punctatus* y carpa dorada *Carassius auratus* (Austin and Austin, 2007). La especie de *Aeromonas hydrophila* presenta una prevalencia de 10 y 85% en cualquier fase de cultivo, y se considera el agente bacteriano más importante en cultivos de peces de agua dulce, especialmente trucha arcoíris, tilapia, incluyendo peces ornamentales y marinos (Larsen and Jensen, 1977; Pathiratne *et al.*, 1994; Lilley *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 2004; Burr *et al.*, 2012; Soto-Rodríguez *et al.*, 2013), así también es reportado en otros animales, incluyendo mamíferos y humanos, el último amenazado por la especie patógena de *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* y *A. caniae* (Palumbo *et al.*, 1992), Sin embargo, también es latente en hospederos con actividad corporal homeotérmico y poiquitérmico; de acuerdo a Newman (1993) menciona que *Aeromonas salmonicida* afecta especialmente a especies de salmónidos y ciprinidos, los cuales habitan en temperaturas frías, mientras que *A. hydrophila* afecta a diversas especies que habitan en ambientes variados.

El patógeno ocasiona hemorragias en piel y branquias, y necrosis en órganos internos, así como debilidad y anorexia (Yardimci & Aydin, 2011). El género *Aeromonas* es una especie autóctona y propia del medio ambiente, sin embargo, el grado de patogenicidad depende de la resistencia de la especie y las condiciones ambientales; de acuerdo a Conroy (2014) y Newman (1993), la bacteria se encuentra presente a cualquier temperatura, concentraciones de amonios altos y de oxígenos bajos. *Aeromonas hydrophila* es una bacteria comensal o saprófita, la cual predomina dentro del sistema digestivo y la piel (Al-Harbi *et al.*, 2004).

En estudios de tilapia *O. niloticus*, los peces fueron inyectados experimentalmente por vía intraperitoneal con *Aeromonas hydrophila* con una concentración letal de 1×10^8 UFC (Yardimci & Aydin, 2011), y 1×10^2 y 1×10^7 UFC por pez (Li and Shuang-Hu, 2011), respectivamente. Por su parte Li and Shuang-Hu (2011) evaluaron experimentalmente, por inyección intraperitoneal,

con *Aeromonas sobria* a una concentración letal LD₅₀ de 4.17x10³ UFC, 0.1x10²-0.1 x10⁷ UFC por pez; éste patógeno es el agente causal de cola rota en tilapia *O. niloticus* en China. Yardimci & Aydin (2011) y Conroy (2014) reportaron que *Aeromonas* causa problemas de exoftalmia, acumulación de fluidos (Faktorovich, 1969), pérdida de escamas y tejido dérmico, con daños necróticos en láminas branquiales, así como la pérdida de la visión por ruptura orbital de los ojos; además, causa septicemia en órganos internos, especialmente hígado y riñón, mientras que en piel provoca úlceras, hemorragias y edemas en el músculo, afectando de esta forma el sistema inmune innato caracterizado como la primera línea de defensa del organismo la cual abarca superficies mucosas, piel y sustancias humorales (Penagos *et al.*, 2009; Suchanit *et al.*, 2010). Por ello *A. hydrophila* es aislado de la superficie de la piel e intestino de los peces debido a que producen gran cantidad de citotóxicos, causantes de la necrosis celular (Donta and Haddow, 1978).

A. hydrophila es común en tilapia, de acuerdo con los reportes de Al-Harbi *et al.*, 2004, Al-Harbi y Uddin, 2005, y Conroy (2014), los cuales mencionan que esta bacteria forma parte de la bacterioflora de las tilapias. Sin embargo, el patógeno es capaz de provocar elevadas mortalidades en cultivo de peces, por ser un patógeno facultativo (Ventura *et al.*, 1988). De acuerdo con Molnár and Csaba (2005) señalaron que el patógeno es visible en Carpa común, principalmente *Aeromonas salmonicida* sups. *achromogenes*. Rubio-Limonta *et al.* (2010) evalúan el comportamiento del patógeno en regiones Occidente, Centro y Oriente de Cuba, y determinan mayor presencia de *Aeromonas* en cultivo intensivo de *Oreochromis* sp., en comparación con especies bacterianas de *Pseudomonas* sp, *Enterobacterias* sp, *Flexibacter* sp, *Flavobacterium* sp, *Vibrios* sp y *Streptococcus* sp. Harikrishnand y Balasundaram (2005) mencionaron que *A. hydrophila* invade al pez cuando hay un incremento de estrés, lo cual se relaciona con lo mencionado por Snieszko (1975).

El género *Aeromonas* se ha considerado un patógeno secundario, esto quiere decir que depende de la infección o daño previo de un patógeno primario, esto debido a que conserva una limitada capacidad invasiva en el hospedero, y su posición depende de factores de estrés por oxígeno disuelto bajo (mgL⁻¹), alto contenido orgánico, contaminación industrial, fluctuaciones de temperatura (T,°C) y lesiones físicas del pez (Nieto *et al.*, 1985; Harikrishnand and

Balasundaram, 2005), y como resultado, la invasión oportunista por el patógeno (Harikrishnand and Balasundaram, 2005).

2.2.2 *Francisella* sp

Francisella es una bacteria coco bacilo Gram-negativo, intracelular facultativo y aerobio facultativo (Jeffery *et al.*, 2010), asimismo se clasifica como una enfermedad emergente en peces de cultivo y especies silvestres, es decir, que la presencia del patógeno o la aparición de la bacteria en nuevos hospederos se incrementa de acuerdo a la relación entre la incidencia/prevalencia-tiempo (Woolhouse & Dye, 2001).

Francisella presenta una prevalencia de entre 85 y 90% en fases de cultivo de alevines, juveniles y engorde. Presenta una distribución diversa alrededor del mundo y es reportado en países como Inglaterra, Europa, Chile, Brasil, Egipto, Costa Rica, Indonesia y Japón (Davies *et al.*, 1886; Khoo *et al.*, 1995; Fakuda *et al.*, 2002; Ottem *et al.*, 2007; Jeffery *et al.*, 2010). El género *Francisella* se divide en dos subespecies, ambas son altamente patógenas de acuerdo al ambiente donde se encuentre, por ejemplo en la zona tropical se presenta la especie *Francisella noatunensis subsp Orientalis* y en la zona templada *F. noatunensis subsp Noatunensis*. De acuerdo con el análisis de filogenia del gen 16S rRNA, se considera que la especie de *Francisella* se divide en dos linajes conocidos como *Francisella tularensis* (zoonosis) y *Francisella philomiragia* (Colquhoun y Duodu, 2011) causantes de enfermedades en humanos y peces, respectivamente.

El patógeno causa lesiones crónicas, debido a la infiltración intracelular. Estas anomalías fueron reportadas en diversas especies, principalmente tilapia nilotica (Soto *et al.*, 2009a); asimismo es reportado y diagnosticado en humanos, aves, reptiles, crustáceos, muestras de suelo y agua (Soto *et al.*, 2009b). *Francisella* sp., ha sido aislado en la especie de abulón gigante *Hailotis gigantea* (Kamaishi *et al.*, 2010), bacalao *Gadus morhua* (Ottem *et al.*, 2007), tilapia *Oreochromis niloticus* (Jeffery *et al.*, 2010), Salmón del Atlántico *Salmo salar* y robalo *Morone chrysops x M. saxatilis* (Jeffery *et al.*, 2010).

El patógeno se caracteriza por presentar signos no específicos externos, tales como nado errático, exoftalmia, anorexia, anemia y hemorragia alrededor de aletas pectorales (Soto *et al.*, 2009), y

signos clínicos internos, tales como hiperplasia epitelial en branquias, esplenomegalia, renomegalia, granulomas, nódulos y necrosis en órganos internos, comúnmente situados en bazo, corazón, hígado, riñón, cerebro y musculatura (Mauel *et al.*, 2007; Ottem *et al.*, 2009). El patógeno se transmite de forma horizontal, usando como vehículo precursor el agua, provocando brotes de infección de pez a pez por contacto directo (Mauel *et al.*, 2007). El grado de patogenicidad se relaciona con temperaturas menores de 25°C, es decir a temperaturas entre 26.5°C y 29.2°C no hay mortalidad de tilapia *Oreochromis niloticus*, por lo tanto, la temperatura es una variable que favorece la propagación de la enfermedad. En estudios experimentales, evalúan la concentración letal por inyección intraperitoneal e intramuscular, equivalente de 23 UFC por pez (Soto *et al.*, 2009a).

2.2.3 *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella sp., es un patógeno estricto Gram negativo, con un medida de 2.3 µm de longitud y 1 µm de diámetro. Es el agente causal de la septicemia y comúnmente se alberga en el intestino de los peces. El género se compone de tres especies, caracterizadas como *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* y *E. hoshinae*. *E. tarda* es reportado en cultivos de tilapia *Oreochromis niloticus*, anguila *Anguilla japonica*, bagre de canal *Ictalurus punctatus*, Pargo *Sea bream* y lenguado *Scophthalmus maximus* y tetra híbridos de tilapia *O. mossambicus* x *O. niloticus* x *O. urolepis hornorum* x *O. aureus* (Clavijo *et al.*, 2002), también se encuentra en perros, reptiles y aves (Newman, 1993). Park *et al.* (2012) mencionan que la especie de *E. ictaluri* es ampliamente distribuida, sin embargo, *E. tarda* se caracteriza por causar zoonosis (Woo *et al.*, 2010).

De acuerdo a los reportes, el patógeno está presente en Taiwán, Estados Unidos, Venezuela, y Japón (Newman, 1993; Clavijo *et al.*, 2002). El patógeno se encuentra presente en ambientes con altas temperaturas, pobre calidad de agua y excedente contenido de materia orgánica, estas condiciones permiten su adherencia y replicación dentro de las células de los peces. Generalmente, el género *Edwardsiellosis* presenta un cuadro clínico de septicemia en la parte interna y externa del pez, incluyendo órganos internos como riñón, hígado y bazo, y externos como hemorragias en piel, recto, aletas, inflamación abdominal y ojos opacos, además, presenta síntomas de exoftalmia, nado anormal y movimientos en formas de espiral. Sin embargo, de

acuerdo a Clavijo *et al.* (2002) indican que la presencia de *E. tarda* en tetra híbridos de tilapia fue en organismos aparentemente sanos (asintomáticos).

2.2.4 *Streptococcus agalactiae*

El género *Streptococcus* es un patógeno Gram positivo emergente en cultivos de peces de agua dulce y marina; y se caracteriza por presentar septicemia y meningoencefalitis. El primer caso de infección se dio en Japón durante el siglo XIX (Hoshina *et al.*, 1958). Principalmente, *Streptococcus agalactiae* se presenta a una prevalencia de entre 40 y 70% en etapas de alevines, juveniles y engorde; y es reportado en diversas especies de peces alrededor del mundo, lo anterior debido a que su distribución geográfica incluye regiones con clima templado y tropical, como lo presenta Brasil, China, Malasia y Estados Unidos (Ye *et al.*, 2011; Pretto-Giordano *et al.*, 2010; Mian *et al.*, 2009). *S. agalactiae* es reportado en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, bagre de canal *Ictalurus punctatus* y dorada *Sparus sarba* (Ye *et al.*, 2011); y también es localizado en animales terrestres, tales como, perros, cerdos, vacas y caballos; incluyendo al hombre (Johri *et al.*, 2006).

Los principales síntomas de infección son nado errático o en círculos, movimientos descoordinados, alteraciones en piel, anorexia o disminución de apetito, exoftalmia, opacidad de córnea, extensión de la cavidad visceral, hemorragia e inflamación abdominal, reblandecimiento del cerebro e hígado, hepatomegalia y palidez en el órgano, así como esplenomegalia y adherencia visceral (Eldar *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 2006; Pretto-Giordano *et al.*, 2010). Al igual, la bacteria provoca elevadas mortalidades en tilapia *Oreochromis niloticus* de entre 90 y 100% con una virulencia de *Streptococcus agalactiae* (cepa SA20-06/6.14x10^{1.17} UFC), aislada de diferentes cultivos, a partir de la dosis letal LD₅₀ 1.12x10⁶ UFC/mL⁻¹ a 72 h después de la infección (Mian *et al.*, 2009). *Streptococcus* se transmite por contacto directo e indirecto, es decir, utiliza el agua como la vía principal de transmisión, principalmente por la dispersión de peces infectados vivos o muertos, moribundos o aparentemente sanos, los cuales liberan a la bacteria en el agua provocando la invasión y replicación celular en piel y órganos internos. La bacteria es capaz de sobrevivir durante largos periodos en agua, lodo o estanques, e incluso en el equipo utilizado en las operaciones habituales. Mian *et al.* (2009) indican que a temperaturas

mayores de 27°C la incidencia del patógeno es irrevocable, por ejemplo, el incremento de la biomasa de siembra provoca el brote de infección (Jeffery *et al.*, 2010).

En cultivos experimentales, la concentración de 1×10^1 UFC y 1×10^5 UFC ocasionan entre 80 y 100% de mortalidad en cultivos de tilapia *Oreochromis niloticus* (Mian *et al.*, 2009 y Ye *et al.*, 2011). MSD (*Merck Sharp & Dohme Corp*) Animal Health (2011) confirma la presencia de dos grupos diferentes de *S. agalactiae*, designados como biotipo I y II. Biotipo I se caracteriza por presentar mortalidades en organismos juveniles, mientras que el biotipo II se distingue por mortalidades en organismos adultos o talla de engorde, con una prevalencia de 56% en países como China, Indonesia, Vietnam, Filipinas y América latina (Salvador, 2011).

De acuerdo con Hernández *et al.* (2009) mencionan que la infección de *S. agalactiae* causa daños en cerebro, con porcentaje de infección de 71.2%, mientras que el hígado, riñón, ojos, tracto gastrointestinal, corazón, branquias y gónada presentan una prevalencia mínima (14.4%). Asimismo la bacteria reduce la eficiencia alimenticia y ganancia en peso, afectando de esta manera el desempeño productivo de los organismos (Ye *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos estudios reportan la presencia de bacterias mesófilicas en los sistemas naturales, por ejemplo, Al-Harbi *et al.* (2005) determinan la presencia de 19 especies de bacterias, entre éstos el género *Streptococcus* sp en muestras de agua ($1.4 \pm 1.5 \times 10^3$ a $8.6 \pm 2.7 \times 10^3$ UFC g⁻¹), branquias ($8.7 \pm 1.9 \times 10^5$ a $2.1 \pm 0.9 \times 10^6$ UFC g⁻¹) y tracto intestinal de tilapia ($2.8 \pm 2.4 \times 10^7$ a $1.0 \pm 1.6 \times 10^8$ UFC g⁻¹); e indican una prevalencia mayor del 10%, con una diversificación mayor en intestino y menor en branquias; éstas variaciones dependen de la actividad metabólica de los peces en relación a los rangos máximos y mínimos de temperatura del medio acuático (Al-Harbi y Uddin, 2005; Al-Harbi, 2003).

En estudios recientes, Pretto-Giordano *et al.* (2010) evaluaron el grado de patogénesis *Streptococcus agalactiae* con una concentración de 1.5×10^8 UFC por pez, 5.0×10^7 UFC por pez, 2.0×10^7 UFC por pez y 6.0×10^6 UFC por pez, y determinan que con la concentración de 1.5×10^8 UFC por pez la mortalidad fue de 67.5 al 90% durante las primeras 48 h después de la inoculación intraperitoneal en tilapia con una mortalidad acumulada de 44.4%. De acuerdo con Newman (1993) reportó que la inoculación de *Streptococcus agalactiae* puede ser por infección-inmersión, infección-intraperitoneal e infección-muscular, sin embargo el grado patogénico

dependerá de la concentración del inóculo, así como el tipo de cepa, periodo de observación, la edad y peso de los organismos; además los factores temperatura, la variación de la diversidad fenotípica y la dinámica genotípica son atributos importantes que califican la virulencia de la cepa (Pretto-Giordano *et al.*, 2005; Mian *et al.*, 2009).

2.3 Sistema inmunológico de organismos acuáticos (hospedero)

La ocurrencia de infección por enfermedades depende de la interacción y equilibrio cíclico del patógeno, hospedero y medio ambiente (Sniesko, 1974, 1975; Hedrick, 1998). De acuerdo con Hedrick (1998), indica que entre las variables del hospedero se puede considerar el sistema inmune, la influencia genética y la nutrición; estas variables determinan el grado de resistencia y la susceptibilidad de la enfermedad. Lo anterior, se encuentra conectado con la funcionalidad del sistema inmune, principalmente para el control de enfermedades desde un trabajo óptimo de las funciones biológicas, químicas y físicas que actúan en el hospedero como defensa inmune. Entre los medios de defensa se involucran funciones contra microorganismos patógenos y la inmune-vigilancia para enfermedades autoinmunes y alérgicas (Toche, 2012). La enfermedad se relaciona con la respuesta inmune del hospedero, que puede ser afectada por la interrelación del patógeno y el medio ambiente (variables biológicas y ecológicas, actuando como un sistema integral en el hábitat acuático). En términos más simples, la enfermedad es una desviación del funcionamiento fisiológico normal, y puede ser benigna o insidiosa dependiendo del impacto que provoque, por ejemplo, las causas de mortalidad en la acuicultura son el resultado de infecciones con agentes biológicos, sin embargo, también actúa de manera conjunta la presencia de compuestos o productos químicos, metales, plaguicidas, factores nutricionales y factores ambientales (Newman, 2012).

El hospedero presenta dos formas de respuesta; la respuesta inmune humoral y celular; la respuesta inmune está condicionada a la agresión exógena y endógena (Toche, 2012). Así mismo, el sistema inmune funciona de forma integrada, y se clasifica como el sistema inmune innato que activa el sistema inmune adquirido en respuesta a las infecciones y utiliza mecanismos del sistema inmune innato para eliminar los microorganismos no benéficos (Toche, 2012). El sistema inmune innato se considera como la primera línea de defensa del huésped la cual se encuentra presente en todos los organismos multicelulares. Esta primera línea responde

de la misma forma a diferentes estímulos infecciosos y distingue estructuras comunes pero no afines a grupos de microorganismos (Toche, 2012). Sus principales componentes están constituidos por barreras físicas y químicas, células fagocítica, células natural killer, sistema complemento, citoquinas y receptores tipo Toll (Toche, 2012). El SII (sistema inmune innato) carece de memoria en caso de exposiciones a un antígeno específico, es decir, el nivel de contaminación puede ser igual como la primera vez, aunque el sistema inmune innato presente los elementos, la reacción de respuesta es nula. Entre sus barreras físicas el mucus de la piel y la piel en peces, tienen un gran número de sustancias antígenas y sustancias internas, tales como: monocitos, macrófagos y células citotóxicas no específicas (Penagos *et al.*, 2009). El hospedero se condiciona a la respuesta inmune humoral y celular, la cual varía entre los individuos dentro de una población. Una de las causas más estudiadas en los peces es el estrés sobre el sistema inmunológico, por lo que se ha demostrado que en las últimas dos décadas la relación que existe en el sistema inmune, nervioso y endócrino actúan como un sistema de bi-direccionalidad (Flores-Quintana, 2002).

En la acuicultura, el estrés puede ser determinado por el periodo de adaptación a cambios ambientales en su medio acuático; éstos síntomas se asocian a falta de oxígeno, altas densidades, manipulación, cambios de temperatura y contaminantes en el agua, donde el proceso de equilibrio entre el hospedador, patógeno y el medio acuático es nulo. En peces, el estrés se condiciona a la presencia de enfermedades bacterianas y parasitarias siendo la primera vía de infección que se presenta en los sistemas de cultivo acuícolas. El estado nutricional también es un factor que afecta el sistema inmunológico, por ejemplo, la carencia de algunas vitaminas como la C y E alteran las funciones de macrófagos y la fagocitosis efectuada por las membranas celulares de leucitos, así como la disminución de la flora intestinal, y a su vez la resistencia bacteriana; lo anterior se ve influenciado por la hormona cortisol la cual afecta el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos (Flores-Quintana, 2002). En la actualidad, se ha incursionado a sistemas de cultivo que permiten el equilibrio entre el hospedero, el medio de cultivo y el patógeno; en este entorno, se trata de entender y comprender el papel fundamental de cada uno de los actores que están en los sistemas de producción y los que se encuentran cercanos a la línea de afectación y no de beneficio. Las características del hospedero están en función de las rasgos genéticos de la especie, la edad, el tamaño, el desarrollo del organismo y la tendencia

nutricional y reproductiva, así como de los medios de defensa inmunológica, es decir, la capacidad de susceptibilidad y la adaptación patogénica (Hedrick, 1998). Por ejemplo, la nutrición, como proceso biológico contribuye al aprovechamiento de nutrientes y mantiene el equilibrio homeostático del organismo a nivel molecular y macrosistémico, garantizando que todos los eventos fisiológicos se efectúen de forma correcta, logrando una salud adecuada y previniendo enfermedades. La nutrición se clasifica como el proceso a través del cual el organismo absorbe y asimila las sustancias necesarias para su funcionamiento y energía.

2.3.1 Perspectivas del patógeno

La patogenicidad del patógeno se relaciona con la interacción del huésped y el medio ambiente, es decir, la infección se asocia a variables de estrés y variables ambientales, tales como; temperatura, salinidad, oxígeno, amonio, nitratos y nitritos. Los patógenos se consideran obligatorios cuando se relaciona directamente con la infección del hospedero, y se constituyen por estructuras de pared celular, membrana plasmática, citoplasma, ribosomas y región nuclear; mientras que el patógeno facultativo sobrevive en ausencia del huésped y se compone de estructuras como cápsulas, flagelos, pelos, endosporas e inclusiones citoplasmáticas. Hedrick (1998) indica que la enfermedad por agentes patógenos depende de la cepa, biotipo, serotipo y genotipo, así como la dosis y números de patógenos, duración y la vía de entrada en el hospedero. Sus condiciones de crecimiento y desarrollo dependen de la concentración de iones de hidrógeno, temperatura, presión osmótica, presencia de oxígeno (aerobias y anaerobias), presencia de CO₂, humedad y desecación, y luz. Los sistemas de patógeno-hospedero suelen guardar una relación en equilibrio entre el hospedero, patógeno y el medio ambiente, siendo el sistema inmune el principal regulador de la interacción de estos indicadores (Plumb and Shoemaker, 1999). Es decir, la interacción de patógenos, el medio ambiente y hospedero, se rompe por razones ya sea naturales, como climáticas, o en su caso por razones antropogénicas, relacionadas con la intensificación y manejo en la actividad acuícola (Huicab-Pech *et al.*, 2016), lo anterior manifiesta la aparición de enfermedades infecciosas activas provocando alteraciones del sistema fisiológico, nervioso y digestivo. En este sentido, para evitar la presencia de agentes infecciosos, la acuicultura se somete al uso de antibióticos, capaces de eliminar y provocar

resistencia bacteriana con el uso excesivo, sin respetar las dosis recomendadas por la FDA (Food and Drug Administration).

El desarrollo de cepas resistentes a drogas permite conocer los mecanismos fisiológicos y moleculares responsables de la resistencia génica de la bacteria y el hospedero. De acuerdo con Bravo *et al.* (2005) mencionaron que la resistencia a antibióticos se relaciona con la capacidad celular, natural o adquirida que tiene el hospedero para sobrevivir en presencia de un antibiótico/químico donde al principio era susceptible. El uso de los antibióticos es ocasionado debido a la extensión acuícola, es decir al aumento de las densidades de siembra, aunado a esto, se acompañan problemas relacionados a enfermedades en los organismos acuáticos; por lo que surge la necesidad de emplear productos químicos para combatir y controlar de forma preventiva o correctiva la presencia de las enfermedades infecciosas (Cabello *et al.*, 2003, 2004). En este contexto, el uso indiscriminado de antibióticos, genera trastornos como toxicidad por exceso, efectos negativos en el medio ambiente, resistencia génica bacteriana, parasita y vírica; así como la obtención de residuos de antibióticos en los tejidos de los organismos acuícolas, impactando de esta forma la salud de los peces y la salud humana, lo anterior instituido por la Organización Mundial de la salud (OMS) y el *Codex Alimentario* (SENASICA, 2003).

Existen diversas opciones en que se puede contrarrestar la enfermedad, o en su caso, actuar como un preventivo, tratamiento o control en la incidencia de infección, como es el uso de antibióticos, probióticos, antimicrobiales, vacunas, mejora genética de lotes de organismos acuáticos, inmunoestimulantes y buenas prácticas de manejo (Vaseeharan and Thaya, 2014). Para reducir el uso excesivo de drogas o compuestos químicos, se analizan alternativas viables que inhiban la presencia de patógenos como es el uso de vacunas (Newman, 1993), las cuales están compuestas por bacterinas o suspensiones de células enteras inactivas con formalina.

Las vacunas estimulan el sistema inmunológico para producir anticuerpos que permiten prevenir enfermedades específicas bacterianas. Las primeras vacunas que se comercializaron en los 70's están relacionadas a bacterias del genero *Vibrios* sp (Newman, 1999). Las vacunas son herramientas que minimizan los costos cuando se presentan enfermedades. Vaseeharan and Thaya (2014) indicaron que las vacunas están fabricadas por bacterinas, ADN y vacunas virales. Como se menciona anteriormente, los antibióticos se consideran sustancias químicas y biológicas

producidas por organismos vivos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y destruir especies bacterianas con una mínima concentración, es decir, actúan de acuerdo a su potencial biológico, toxicidad y modo de acción e interfieren en las reacciones bioquímicas de los patógenos debido a que bloquean la vía metabólica o la síntesis de macromoléculas esenciales para la bacteria. Esta vía metabólica se relaciona con la obtención de energía química para almacenamiento (biosíntesis), conversión de nutrientes exógenos en unidades precursoras de la célula bacteriana y la degradación de moléculas que se emplean para la movilidad y captación de nutrientes (Forbes, 2002). Lo anterior sucede debido a que las bacterias codifican ciertos fenotipos, como es el caso de los plasmidios R, los cuales se relacionan con la resistencia a drogas o metales pesados con capacidad de virulencia y colonización (Pardilla-Mata, 2011). Los plasmidios son moléculas de DNA extra cromosómicas, de doble cadena y circulares, capaces de replicarse dependientemente del cromosoma bacteriano.

Por su parte, la acción de los antimicrobianos, de acuerdo a su origen son naturales y sintéticos; los antimicrobianos naturales son producidos por organismos vivos, tales como bacterias y hongos, y los antimicrobianos sintéticos son producidos por la síntesis química, como es el caso de los nitrofanos. Su potencial depende de la capacidad de acción sobre un tipo de bacteria, diversas especies bacterinas o en su caso, sobre bacterias Gram negativas y positivas, y se pueden considerar de espectro reducido, intermedio y amplio, respectivamente.

Los antimicrobianos presentan actividad bacteriostática y bactericida; la primera detiene e impide el crecimiento de una población bacteriana y en el caso de la segunda, su modo de acción es letal y rápido sobre bacterias, y el efecto que presentan es irreversible. Por su parte los mecanismos de acción actúan sobre los componentes principales, tales como pared celular, membrana celular, síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleicos. La capacidad de los antimicrobianos, antibióticos y otros, dependerá de la condición del patógeno, es decir, los patógenos bacterianos producen toxinas de naturaleza proteica que les permite vivir en el entorno a partir de los sistemas de defensa y la respuesta inmune del huésped.

El ciclo celular del hospedero participa en procesos de respuesta inmune, mantenimiento de la barrera epitelial y la diferenciación celular, estas condiciones afectan de forma directa el crecimiento y la colonización de las bacterias patógenas en el organismo acuático. Sin embargo,

las condiciones pueden ser manipuladas por los patógenos bacterianos afectando directamente las funciones de los componentes celulares. Actualmente, la actividad acuícola demanda productos para evitar el uso de antibióticos y quimioterapéuticos; entre estas alternativas se consideran importantes aquellos derivados de plantas medicinales, como inmunoestimulantes, los cuales tienen la ventaja de reforzar el sistema inmunológico para el control de enfermedades en los sistemas acuícolas (Veseharan and Thaya, 2014). Los inmunoestimulantes son compuestos naturales que aumentan la resistencia del huésped frente a enfermedades patógenas; sin embargo entre sus desventajas se considera la administración oral a largo plazo, debido a que puede resultar en una disminución de la eficacia y una sobredosis en la inmunosupresión (Bricknel and Dalmo, 2005). La comunicación bacteriana en peces es igual a la que presentan los organismos superiores, es decir, tienen comportamientos de comunicación, cooperación y asociación compleja, como: la transferencia de plasmidios, virulencia, simbiosis y adaptación a un lugar. Esta última se asocia a las condiciones favorables que se presentan cuando el conjunto bacteriano se somete a un peligro y aparecen como mecanismo de defensa; lo anterior, es regulado por un proceso conocido como equilibrio quórum (Pardilla-Mata, 2011).

Entre la comunidad bacteriana existen interacciones sociales que permiten la sincronización para mantener un comportamiento común, es decir, actúan como organismos multicelulares. Sin embargo, cuando el conjunto bacteriano cumple con otros compromisos se presenta la individualidad y la diversidad del grupo (Pardilla-Mata, 2011).

El grupo de bacterias patógenas o no patógenas tiene la capacidad de efectuar mecanismos de comunicación entre sus células, a lo que se le llama "*quórum sensing*". En este proceso las bacterias son capaces de saber cuántas son a partir de la producción y acumulación de moléculas de señalización, feromonas, que se exportan en su entorno para poder comunicarse con otras bacterias por medio de su receptor de moléculas (Pardilla-Mata, 2011).

El beneficio que aporta este tipo de comunicación intracelular permite a las bacterias coordinar y responder a cambios bruscos en los factores ambientales, así como a la disponibilidad de nutrientes y a la presencia de microbios o toxinas en su entorno, actuando de forma grupal para obtener mejores resultados que no podrían alcanzar individualmente (Pardilla-Mata, 2011). Lo anterior, indica que la presencia de bacterias en el ambiente natural y no natural ocasiona el

agrupamiento de especies bacterianas que actúan bajo un fin determinado, por ejemplo, como defensa y ataque a partir de concentraciones elevadas de moléculas auto inductoras/feromonas que permite la adaptación e interacción de bacterias en entornos de difícil dispersión bacteriana, como por ejemplo; en el interior del huésped.

2.3.2 Perspectivas del medio ambiente

Los efectos y variaciones que tiene el medio ambiente sobre la triada que existe entre el hospedero y el patógeno, se consideran primordiales en la aparición de enfermedades. Los factores que se involucran en el medio ambiente se componen de características físicas y químicas, que son analizados y medidos de manera cuantitativa con respecto a tiempo y espacio, usualmente es necesario realizar monitoreos continuos para conocer la exposición bacteriana en función del comportamiento ambiental. Las principales variables que se relacionan directamente con el desequilibrio entre el patógeno y el hospedero son la temperatura, pH, materia orgánica, oxígeno disuelto, nitritos y nitratos, por ejemplo; los efectos de las bajas temperaturas sobre el sistema inmune se reflejan sobre el componente celular; dañando principalmente la función de las células T helper (Le Morvan, 1998). Estas variables deben mantenerse en los ecosistemas naturales, o en su caso, en los sistemas acuícolas.

Por su parte, los efectos secundarios, considerados procesos biológicos, están relacionados con la actividad antropogénica, la cual afecta directamente a la diversidad y la densidad de la biota causando problemas por la presencia de enfermedades infecciosas bacterianas, parasitarias y vírales (Veseharan and Thaya, 2014). Las actividades antropogénicas se relacionan con la intervención humana, principalmente para la generación de energía, tala inmoderada de grandes extensiones de tierra, cultivos agrícolas, incluyendo riego y pastoreo, y la minería, lo cual ha ocasionado, a partir de escurrimientos ecológicos la acumulación de ciertos contaminantes, plaguicidas y metales pesados, causantes de una variación biológica en los ecosistemas naturales. Estos provocan que se rompa la triada existente entre el patógeno y el hospedero (Figura 2), así como también el impacto de resiliencia en suelos y aguas, incluyendo ríos, lagos, esteros y mar. Lo anterior causando impactos económicos y ecológicos.

La influencia de las variaciones ambientales en organismos vertebrados pueden repercutir en el estrés del organismo por las altas densidades de cultivo, la exposición a químicos y

contaminantes tóxicos en el agua. Uno de los factores intrínsecos más estudiados en los peces, es el estrés sobre el sistema inmunológico; y comúnmente se considera como un periodo de adaptación a los cambios ambientales en su medio. En peces, el estrés se condiciona por los niveles de la hormona cortisol y la respuesta de comportamiento de los peces (Small and Bilodeau, 2005); la hormona de cortisol tiene la labor de redistribuir las células del sistema inmune, así como los elementos del sistema inmune innato, a fin de actuar como la primera línea de defensa del organismo (Schreck y Maule, 2001; Small and Bilodeau, 2005).

El estrés es una función de adaptación frente a una amenaza percibida, así como una respuesta de acción para preservar al individuo; el estrés se define como la respuesta de la célula u organismo a cualquier demanda del estado normal en reposo. Este desequilibrio produce daños colaterales en la demanda energética del sistema fisiológico, reduce el crecimiento, suprime el sistema reproductivo y el sistema inmune (Figura 2).

El estrés producido en los peces puede ser primario, secundario y terciario. Lo anterior se debe a la liberación de catecolaminas y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI) y los niveles de cortisol en la sangre (Schreck *et al.*, 2001; Ashley, 2007). De acuerdo con Wedemeyer (1997) mencionó que el estrés es el factor principal en la salud de los peces, sin embargo, no se relaciona de forma directa con las malas condiciones ambientales, por lo que es necesario que las prácticas acuícolas se efectúen correctamente para evitar el factor estrés, así como las posibles lesiones físicas ocasionadas durante la manipulación de organismos, lo que podría provocar de forma natural la susceptibilidad del organismo, así como la ocurrencia de patógenos infecciosos, entrando por la principal vía de defensa: la piel. El estrés puede ser agudo o letal, crónico o subletal y crónico directo e indirecto; estas variaciones de estrés dependerán de la exposición de derrames de sustancias químicas, cambios en los factores ambientales, exposiciones a corto y largo plazo de agentes causantes de estrés, y finalmente, daño en las funciones metabólicas y actividades conductuales, respectivamente (Ocampo y Camberos, 1999).

Es necesario realizar y plantear protocolos de gestión y el diseño óptimo del sistema, con la finalidad de obtener un cultivo sano y sostenible que involucre el bienestar del organismo (Ashley, 2007). A nivel natural los ecosistemas dulces y marinos poseen un aumento de

contaminación en cuerpos de agua por la actividad antropogénica; este tipo de contaminación es un indicador de estrés ambiental (Ocampo y Camberos, 1999).

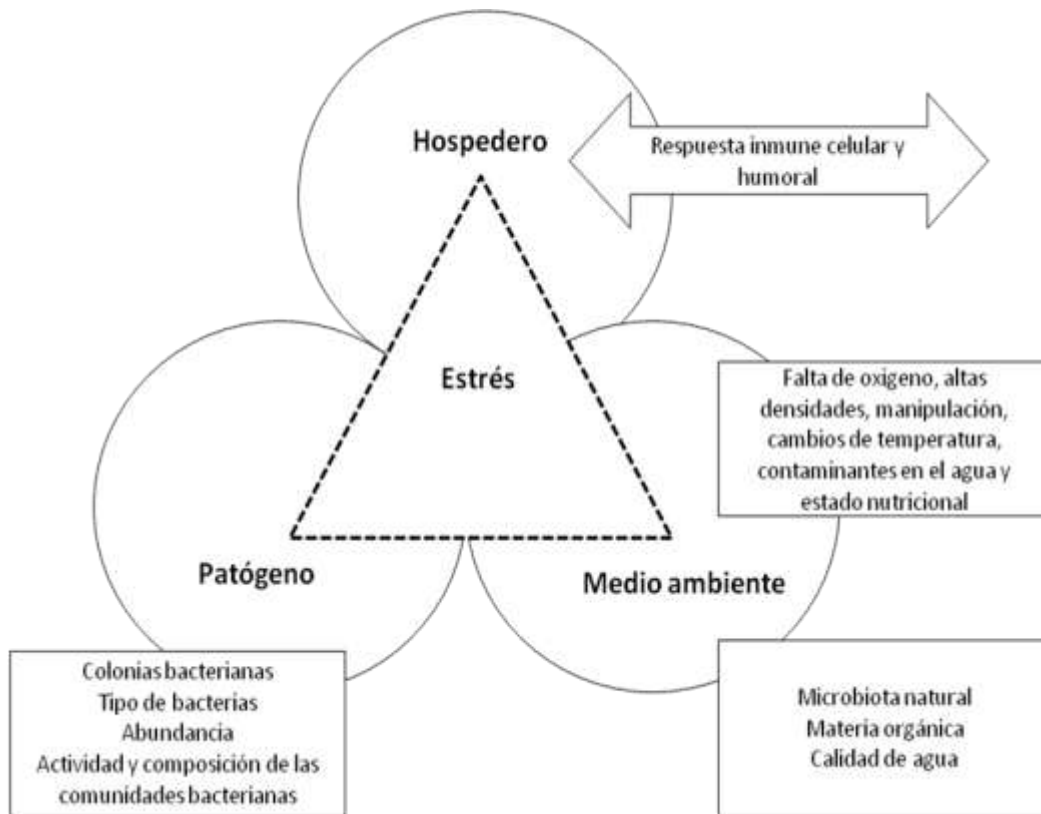


Figura 2. Diagrama conceptual del equilibrio dinámico entre el hospedero, patógeno y medio ambiente. Tomado de Huicab-Pech *et al.* (2016).

En la acuicultura, el estrés puede ser físico y se relaciona con la clasificación biométrica de los organismos (niveles jerárquicos de la población), el transporte del organismo y la vacunación común (Ocampo y Camberos, 1999). También puede ser social, relacionado a las altas densidades de siembra, el estrés físico a cambios bruscos de temperatura y traumatismos, el estrés químico a contaminantes endógenos y exógenos, y finalmente el estrés nutricional a deficiencias nutricionales en la dieta (Ocampo y Camberos, 1999). Lo anterior afecta al nivel de organización celular, las estructuras de la población y la fisiología del organismo. Ambientalmente, las enfermedades acuícolas se relacionan con la baja respuesta inmune, por lo que una solución sería la manipulación de la microbiota que existe en los sistemas de producción, es decir, los patógenos pueden ser controlados por la contraparte microbiológica benéfica, donde se encuentran el hospedador y el patógeno en equilibrio, con la finalidad de no

existir un efecto adverso (Figura 2). Por tanto, es necesario realizar la manipulación de colonias bacterianas, donde sea necesario conocer el tipo de bacteria, el número de bacterias presentes, la actividad y la composición de las comunidades en conjunto, presentando comportamientos complejos de cooperación.

2.4 Alternativas naturales en el sector acuícola

2.4.1 Probióticos

El término probiótico proviene del griego “*pro y bios*” que significan “a favor de la vida”. Actualmente la FAO (2002) designa el término probiótico a bacterias que causan un beneficio a los seres humanos y animales. El primer estudio fue reportado por Eli Metchnikoff, el cual afirma que el uso de probióticos modifica la flora del organismo y sustituye aquellos microbios nocivos por microbios útiles (Metchnikoff, 1907).

A partir de los años 60, el término se modifica de acuerdo a las nuevas investigaciones. Lilley y Stillwell (1965) lo describen como aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otros conservando un efecto de resistencia. Parker (1974) lo refirió como organismos o sustancias que favorecen el balance de la microflora intestinal. Sin embargo, Fuller (1989) lo describe como un suplemento alimenticio a base de microorganismos vivos que mantienen el equilibrio intestinal del hospedero. Muchos de los conceptos han sido desplazados por el hecho de usar terminologías que no definen el término.

Muchas definiciones son descartadas debido a que algunos productos no son considerados como suplementos alimenticios; por ejemplo Tannock (1997) menciona que los probióticos es un grupo de células microbianas vivas que actúan como suplementos en la dieta.

Los conceptos cambian en función de las áreas de estudio; en el sector acuícola la FAO (2002) define el término como microorganismos vivos que confieren un beneficio de salud al hospedero que cuando son consumidos en cantidades adecuadas, además de que actúan como control biológico, presentan un efecto de biorremediación de los problemas ambientales (Qi *et al.*, 2009).

Los probióticos son ampliamente estudiados en la nutrición humana, sin embargo, en la industria acuícola los estudios aún son muy escasos, Robertson *et al.* (2000) mencionan que su uso permite el control de agentes infecciosos potenciales, por lo que su empleo en la acuicultura favorece el bienestar animal en el cultivo de crustáceos, moluscos y peces (Vijayakumaran, 2001). En la acuicultura los probióticos son aplicados como aditivos en el alimento (Vijayakumaran, 2001) los cuales han mostrado resultados significativos en el crecimiento de los organismos y resistencia del sistema inmune (Apún-Molina, 2007; Peraza-Gómez, 2008). El género *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus* y hongos unicelulares como levaduras son considerados como cepas probióticas en la acuicultura. Sin embargo, uno de los problemas relacionados con la viabilidad de bacterias probióticas en el alimento se pierde cuando se somete éste a los procesos de granulación, almacenamiento, manipulación y preparación, por lo que se considera como una alternativa el uso de simbióticos (probióticos-prebióticos) como fuente fermentable de bacterias benéficas y fuente de carbono (Merrifield *et al.*, 2010). Los probióticos se consideran aquellos organismos que en cantidades adecuadas aportan un beneficio al hospedero, y los prebióticos se componen por oligosacáridos que permiten el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo, ambos mostrando resistencia a la acidez gástrica y estimulación selectiva de bacterias benéficas (Rodríguez-Estrada *et al.*, 2009; Merrifield *et al.*, 2010).

2.4.2 Extractos vegetales en la acuicultura

Las plantas son clasificadas como una fuente invaluable de moléculas biológicamente activas por la producción de metabolitos secundarios con capacidad farmacológica (Serrano, 2006) los cuales poseen químicos activos de polifenoles, flavonoides, fitoestrógenos, isoprenoides, compuestos azufrados, fenoles, glucósidos, saponinas, monoterpenos, carotenoides, vitaminas, fibras y minerales (Aguilar *et al.*, 2004). En la industria farmacéutica, las plantas son consideradas productos quimioterapéuticos, debido a que tienen un efecto contra enfermedades bacterianas, fúngicas y degenerativas (Serrano *et al.*, 2006), como lo reporta Punitha *et al.* (2008) y Sankar *et al.* (2011).

En la acuicultura, los productos naturales son una opción para el manejo de diversas enfermedades. Tripathi y Dubbey (2004) mencionan que los productos naturales son igual de

efectivos que los antibióticos y se consideran desde la antigüedad como una cura para múltiples dolencias en los seres humanos. A través del progreso industrial del siglo XX se desarrollaron técnicas para la creación de comprimidos, cápsulas, jarabes, soluciones y suspensiones a partir de productos sintéticos y pócimas empleadas para la curación de enfermedades. El uso de plantas en la medicina tradicional; es clasificada como fitoterapia según la OMS, y es caracterizada como la ciencia que estudia el empleo de productos de origen vegetal para prevenir o curar un periodo patológico.

El uso de plantas desempeña un papel importante en la alimentación, medicina, vivienda y vestido (Celis *et al.*, 2008). Su empleo se describe desde los inicios de la vida humana y comúnmente se utilizan como agentes terapéuticos por su diversidad química y biológica.

Las plantas se clasifican como una fuente invaluable de moléculas biológicamente activas por la producción de metabolitos secundarios. Entre los componentes herbales, los fitoquímicos son considerados como compuestos químicos naturales y se definen como aquellas sustancias químicas presentes en vegetales comestibles. Los fitoquímicos tienen una gran variedad de colores de frutas y verduras; asimismo sus propiedades más específicas en relación a la estructura química, aplicación y obtención natural/sintética son importantes para la industria farmacéutica (Serrano *et al.*, 2006).

En la industria farmacéutica, las plantas se consideran la materia prima utilizada para la obtención de productos quimioterapéuticos, debido a que actúan como tratamientos efectivos contra enfermedades infecciosas bacterianas, fúngicas y degenerativas presentes en el cuerpo humano (Serrano *et al.*, 2006). Algunos extractos vegetales pueden considerarse como inmunoestimulantes por su contenido de componentes activos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas.

2.4.3 Extractos de nopal *Opuntia ficus indica*

El nopal *Opuntia* spp., es una cactácea, presente en zonas áridas y semiáridas. Esta planta es originaria de América tropical y subtropical. Los nopales presentan diversa taxonomía por la variabilidad fenotípica. El nombre científico fue asignado por Tournefort en 1700, lo anterior se debe a la semejanza con una planta espinosa en el poblado *Opus* en Grecia (Scheinvar, 1999).

En México existe una gran diversidad de especies y extensa distribución geográfica (Torres-Ponce *et al.*, 2015), y la producción de nopal ocupa el sexto lugar en volumen de producción de hortalizas y el octavo lugar en valor de la producción (SIAP-SAGARPA, 2007).

De acuerdo con Aguirre-Cárdenas *et al.* (2011) en México existen 3 millones de ha de nopal nativo y 233 000 ha de nopal cultivado, siendo un importante recurso en términos de producción y consumo humano. Es una planta arbustiva con tronco leñoso y ramas que se forman por cladodios (nopalitos). La epidermis del nopal tiene dos capas, una compuesta por células verdes (clorénquima) y otra capa interna formada por un cilindro de células blancas (parénquima) (Granados- Sánchez y Castañeda- Pérez, 2003). El nopal se considera, por su composición nutrimental, un excelente producto alimenticio por su contenido de fibra dietética y pectina, por lo que es una alternativa como alimento funcional. El nopal presenta propiedades medicinales, puede actuar como antioxidante, antiviral y anticancerígeno. Su uso remonta desde épocas prehispánicas donde se emplea como medicamento, en la construcción y en las artes. Posterior al tiempo, este recurso ha presentado un potencial agrotecnológico en la industria alimenticia, medicina farmacología y en la industria agropecuaria, principalmente (Aguilar *et al.*, 2008), por su contenido de carotenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos, vitamina C y E (Yahia y Mondragón, 2011). Los aztecas usaban el nopal como una fibra y remedio para fiebres, limpieza de infecciones y alivio para inflamaciones, especialmente en seres humanos.

Opuntia spp., capta el CO₂ de la atmósfera el cual será utilizado para la síntesis de carbohidratos durante la noche, permitiendo que la pérdida de agua sea menor (metabolismo del ácido crusaláceo), lo que finalmente inhibe o suspende el crecimiento de varias especies bacterianas.

El nopal se aprovecha para el crecimiento y regeneración de suelos pobres. La especie que ha sido cultivada en diferentes partes del mundo es *Opuntia ficus indica* (Sáenz *et al.*, 2006).

La especie de *Opuntia ficus indica* contiene minerales, proteínas, fibra dietética y fitoquímicos (Bensadón *et al.*, 2010). La composición química del nopal en base húmeda es de 91%, proteínas de 0.66%, grasas 0.11%, carbohidratos 5.5%, celulosa 1.15% y cenizas de 1.58%(Aguilar *et al.*, 2008). En humanos, el nopal reduce los problemas gastrointestinales y los trastornos digestivos (Bensadón *et al.*, 2010). Sin embargo, en el sector agropecuario, se aprovecha como forraje de

ganado en zonas semi-áridas, principalmente en países como México, Brasil, Sudáfrica, entre otros (Felker *et al.*, 2006).

El nopal cuando se fermenta en estado sólido produce proteína microbiana a partir de la degradación de la glucosa existente en la planta; este proceso se basa en el crecimiento de microorganismos en el sustrato insoluble en ausencia de agua añadida. Cuando el nopal se combina con *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se reporta el 12.8% y 26% proteína cruda, respectivamente (Oliveira, 2001) y (Araujo *et al.*, 2005), por lo tanto puede ser un suplemento de proteína en la alimentación animal.

La fermentación en estado sólido actúa como sustrato o soporte inerte para el crecimiento de células microbianas (Sato y Sudo, 1999; Pandey *et al.*, 2001). El uso del nopal aumenta la nutrición debido a la presencia de proteínas microbianas de fosfato, potasio y calcio, y vitaminas B, los cuales favorecen el crecimiento de los animales (Villas-Boas y Esposito, 2000).

2.4.4 Extracto de orégano *Lippia berlandieri*

El orégano es una planta que se encuentra ampliamente distribuida en 24 estados de la República Mexicana, principalmente en las regiones áridas y semiáridas de los Estados de Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Jalisco, San Luis Potosí, Zacatecas, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Baja California Sur y Coahuila (Silva-Vázquez *et al.*, 2008). En el mundo, el género *Lippia* se encuentra distribuido en América Central, América del Sur y terrenos tropicales de África (Terblanche and Kornelius, 1996). En los sitios donde crece el orégano, el suelo tiene de 5 a 35 cm de profundidad con una textura franco arenosa (50-60%, 20-30% limo, 10-25% de arcilla) (Silva-Vázquez *et al.*, 2008).

Lippia berlandieri es una especie importante económicamente en el país. Su consumo se relaciona con la alimentación debido a que se usa como un condimento alimenticio, y en menor uso en la industria farmacéutica (Silva, 2005). La planta posee efectos antimicrobianos por su contenido de carvacrol y timol (compuestos en plantas jóvenes), los cuales son la causa de inhibición de los microorganismos patógenos (Santoyo *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2006). La composición química de la planta se relaciona con la especie de orégano, la fenología de la planta, las condiciones geográficas, periodos de cosecha y métodos de extracción (Santoyo *et al.*,

2006). La OMS estima que el 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales y sus compuestos activos, como es el uso de orégano, el cual se relaciona con la elaboración de fármacos, licores y cosméticos. Las sustancias químicas son fáciles de obtener y analizar en el aceite esencial del orégano. En su gran mayoría, los compuestos más abundantes son los monoterpenos y los ácidos fenólicos (Silva-Vázquez *et al.*, 2008). Los principales quimiotipos de la especie *L. berlandieri* son el carvacrol y el timol, cada uno con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (*L. berlandieri* es la que contiene más concentración de carvacrol, entre las diversas especies conocidas y estudiadas de orégano).

Como morfología podemos observarlos como arbustos de hojas oblongas que alcanzan entre 1.2-2 m de altura, con 4 a 6 pedúnculos por nudo, cuenta con flores en espiga sub globosas, corolas blancas o amarillentas y zigomorfas. Las hojas se pierden en la época de secas, pero reverdecen durante la temporada de lluvias. Cuando las hojas son amarillas pierden su valor comercial y son desechadas (Angulo-Carrera *et al.*, 2005).

En los extractos de orégano se han identificado compuestos de flavonoides, como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano, para el caso de la especie *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, r-cimeno, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo.

El orégano contiene monoterpenoides, compuestos volátiles, los cuales son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor y sabor de las plantas. El orégano posee compuestos antioxidantes, estos tienen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo (envejecimiento y enfermedades crónicas degenerativas). Este efecto se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos, por ejemplo en el orégano se han encontrado rangos mayores de 140 mmol 100 g⁻¹. El potencial antioxidante es determinado por la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, de HOCl y por la prueba de la rancidez. El orégano es una fuente potencial de vitamina C y de otros compuestos antioxidantes como los carotenoides.

A nivel ecológico, las plantaciones de orégano contribuyen a retener y formar el suelo en zonas erosionadas, a mantener los ciclos de los nutrientes y a proporcionar alimento y refugio a muchas especies de animales silvestres (Angulo-Carrera *et al.*, 2005).

La efectividad del orégano se ha analizado contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. En bacterias los estudios se dirigen a la actividad de la planta como inhibidor de crecimiento, principalmente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Ávila-Sosa *et al.*, 2008). En el sector acuícola su uso fue evaluado en especies de camarón *Litopenaeus vannamei*; en el cual se evaluaron los componentes de timol y carvacrol contra la bacteria de *Vibrio alginolyticus* (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2012).

2.4.5 Extractos de sábila *Aloe vera*

Es una especie originaria de África. Su cultivo se realiza en Venezuela, la cuenca del Caribe, Texas, Arizona y Florida.

Sus propiedades medicinales son diversas, actúan como antimicrobiano, anticoagulante, antiviral, antiinflamatorio, fungicida, antibiótico y agente regenerativo de tejidos. Se consideran un recurso de alto valor nutricional y medicinal en México y otros países, por ejemplo; el jugo de *Aloe vera* tiene capacidad bacteriostática y bactericida sobre diferentes tipos de organismos (Contreras-Pinzón *et al.*, 2007).

Aloe proviene del término árabe *alloeh* que significa “sustancia brillante y amarga”, también se le denomina sábila (Martínez *et al.*, 1996). Existen más de 400 especies, de las cuales una de las más beneficiosas para el hombre es el *Aloe vera*.

Es una planta herbácea perenne, acaule (tallo vegetativo reducido) que produce grandes estolones y raíces fasciculadas; con hojas gruesas y carnosas, que miden de 50 a 70 cm de largo, 10 o 20 cm de ancho y 5 cm de grueso. Presentan un color verde glauco, se agrupan en roseta, son sésiles y poseen borde espinoso dentado en sus vainas. Esta planta tiene la capacidad de adaptarse en áreas con poca disponibilidad de agua. *Aloe vera* contiene una sustancia líquida, amarga y amarillenta, llamada acíbar, la cual se obtiene por escurrimiento del corte transversal de las hojas; esta característica de *Aloe* interviene en el proceso de control de la evapotranspiración. *Aloe vera* posee azúcares como glucosa, galactosa y arabinosa, y polisacáridos con alto contenido de fructosa y azúcares hidrolizables. Además pueden actuar

como antioxidantes debido a la presencia de compuestos fenólicos: como los cromonas y antraquinonas, los primeros se utilizan como antiinflamatorios y antibióticos (Dagne *et al.*, 2000). Por su parte, las antraquinonas son compuestos aromáticos polihidroxilados, la cual es una fuente importante de colorantes.

Aloe vera contiene aloemitina, aloemodina (regula el funcionamiento de la mucosa intestinal), aloeooleína (disminuye la acidez), aloetina (neutraliza el efecto de las toxinas microbiana), aminoácidos (interviene en la formación de proteínas), carricina (refuerza el sistema inmune y aumenta las defensas), saponinas (antiséptico), minerales (posee calcio, magnesio, potasio, zinc y cobre) y fosfato de manosa (agente de crecimiento de los tejidos con efecto cicatrizante). Además de que esta planta actúa como cicatrizante, se ha repostado la actividad antimicrobiana del jugo de las hojas, principalmente contra bacterias de las especies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Waller *et al.*, 1978). Nutritionalmente la planta contiene vitaminas hidrosolubles y liposolubles, como es la presencia de tiamina (B1) y niacina (B3) y vitaminas A y E, respectivamente.

Contreras-Pinzón *et al.* (2007) indican que el *Aloe vera* puede actuar en los procesos de biotransformación microbiana, debido a que mejora el valor nutritivo, la disponibilidad de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas del grupo B y minerales. Su uso como sustrato para el desarrollo de BAL se debe al contenido nutricional y composición química.

El *Aloe vera* es una fuente de azúcar, almidón y material celulósico, por lo que pueden usarse en las dietas de animales, principalmente, cuando se busca mejorar sus condiciones nutrimentales (Toyo *et al.*, 2016).

2.5 Interés en los inmunoestimulantes en el sector acuícola

Los inmunoestimulantes son aquellos aditivos o nutrientes habituales, como proteínas, polisacáridos o lípidos, que se utilizan en la acuicultura con el objetivo de mejorar la respuesta inmune específica de los peces (Sirimanapong *et al.*, 2015) y la resistencia a la enfermedad (Sirimanapong *et al.*, 2015).

López-Pérez (1994) define a los inmunoestimulantes como elementos farmacéuticos que mejoran la actividad y respuesta inmunitaria del organismo, también se conocen como inmuno-incrementadores, inmuno-reguladores, inmuno-moduladores e inmuno-restauradores. En su

concepto, son aquellos componentes naturales que modulan el sistema inmune, este componente se refleja por el incremento de resistencia del hospedero con los patógenos infecciosos. Doñate *et al.* (2010) y Dehasque *et al.* (1999) mencionaron que los inmunoestimulantes aumentan la resistencia a estrés y enfermedades en peces y camarones. Anderson (1992) lo definió como químicos, drogas o estresantes que elevan los mecanismos de defensas no específicas. De acuerdo con Van-Hai (2015) un inmunoestimulante causa efecto al hospedero.

Los inmunoestimulantes se obtienen a partir de fragmentos de la pared celular de los microorganismos (levaduras, hongos y bacterias), algunos de estos fragmentos activos se representan por β -glucanos, moléculas poliglucosas, péptidos muramil, lipopolisacáridos, lipopéptidos y aciloligopéptidos (Le Moullac *et al.*, 1998). Existe una amplia gama de inmunoestimulantes, sin embargo pocos pueden ser empleados en la actividad acuícola (Siwicki *et al.*, 1998).

Un inmunoestimulante es una sustancia que mejora los mecanismos de defensa específicos y no específicos del organismo (Ganguly *et al.*, 2010), y se definen como fármacos o compuestos presentes en los extractos de plantas o como ingredientes activos de amplio espectro los cuales funcionan contra patógenos infecciosos. En la acuicultura, los inmunoestimulantes se consideran una alternativa de bajo costo y un ingrediente para la eliminación de bacterias *A. hydrophila* en la especie de tilapia *O. niloticus*.

Los glucanos son polisacáridos, compuestos por enlaces (β -1,3/1,4/1,6), que se encuentran en las estructuras extracelulares de microorganismos, plantas y en la superficie celular de los animales; algunos glucanos se encuentra en especies de cebada, avena, maíz, algunos micelios y hongos.

El uso de inmunoestimulantes puede considerarse una opción que favorece el desarrollo sostenible, es decir, un equilibrio económico-biológico como una estrategia proactiva contra enfermedades (Newman, 1999). Entre las desventajas, los inmunoestimulantes exhiben un efecto a corto tiempo, por lo que se recomienda que la aplicación se realice de forma preventiva. Una de las prioridades para prolongar el uso de inmunoestimulantes en el sector acuícola es la disminución de residuos en el producto final FAO (2016).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La acuicultura presenta un amplio crecimiento a nivel nacional e internacional. Estos sistemas de producción tienen como propósito cultivar proteína para el consumo humano, generar nuevos empleos y rendimientos económicos desde la etapa de crías hasta la comercialización del producto acuícola. La intensificación de los cultivos, especialmente para el cultivo de *Oreochromis niloticus*, ha provocado la aparición de agentes infecciosos como es el caso de *Aeromonas hydrophila*, causante del 80% mortalidad de tilapia nilotica. Lo anterior, es causa del aumento en la aplicación de antibióticos de alto espectro, lo cual ocasiona la contaminación directa del agua, la resistencia génica bacteriana en los agroecosistemas acuícolas y la contaminación de los ecosistemas naturales. Países Europeos prohíben en su totalidad el uso de estos compuestos químicos, sin embargo, en México se aplican de manera rutinaria y sin control en los cultivos. Por esta razón, es necesario implementar estrategias que permitan el control y la prevención de enfermedades bacterianas. Una de ellas es la aplicación de productos naturales que inhiban el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* y mejoren la calidad del agua. La medicina tradicional ha sido aplicada en cultivos agrícolas, pecuarios y ganaderos, logrando la ausencia de enfermedades bacterianas, fúngicas y víricas, y la mejora inmunitaria y digestiva de los organismos y plantas agrícolas. En el presente estudio determinó la concentración mínima inhibitoria de la combinación de extractos acuosos de nopal *Opuntia ficus indica*, orégano *Lippia berlandieri* y sábila *Aloe vera* con cepas probióticas de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus subtilis*, extraídos de suero de leche, maíz, alfalfa y pozol, respectivamente y evitar el crecimiento patógeno de *Aeromonas hydrophila*. Lo anterior permitirá obtener un producto que beneficie al campo, la sociedad y el medio ambiente, y al mismo tiempo se derive el desarrollo y la innovación de alimentos efectivos y competitivos que contribuyan a resolver las demandas de la sociedad y los ecosistemas naturales.

4. HIPOTESIS

La aplicación de extractos vegetales, como aditivos alimenticios, para el cultivo de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* en agroecosistemas acuícolas, disminuye la mortalidad de los organismos, causada por la presencia de bacterias patógenas, y mejora la calidad de la producción de organismos y de efluentes.

5. OBJETIVO

Disminuir la mortalidad de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* en agroecosistemas acuícolas, causada por la presencia de bacterias patógenas, mediante la aplicación de extractos vegetales, como aditivos alimenticios, para mejorar la calidad de la producción de organismos y de efluentes.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo 1. Identificar las bacterias patógenas causantes del 50% de mortalidad de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* en un agroecosistema acuícola

6.1 Colecta de organismos

En una granja del estado de Veracruz, se colectaron un total de 51 organismos de tilapia *O. niloticus*. Posteriormente, los organismos fueron transportados en bolsas de polietileno con agua al 40% de su capacidad en hieleras a 4°C (NOM-109-SSA1-1994; DOF, 1994) al Laboratorio de Investigación y Recursos Acuáticos del Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz.

6.2 Toma de parámetros fisicoquímicos del agua

Los parámetros del agua se midieron mensualmente en la granja acuícola. Se registró concentración de oxígeno (mg L), temperatura (°C), salinidad (ppm) y pH con una sonda multiparamétrica marca YSI 556 MPS. Se determinaron nitritos (mg L) y nitratos (mg L) con el kit calorimétrico CHEMets®. Lo anterior con la finalidad de comparar la presencia y ausencia de bacterias.

6.3 Procesamiento e identificación bacteriana

Cada organismo de tilapia fue observado en el laboratorio por medio externo macroscópico para la identificación de lesiones en piel y aletas. Se hizo un corte ventral para observar órganos internos tales como branquias, intestino, bazo, hígado, vesícula biliar y riñón.

Estos órganos fueron seleccionados para determinar el género bacteriano y aislar los patógenos. Se tomó una porción mínima de la muestra de intestino, bazo y branquias, con un asa de platino y se sembró por duplicado mediante estría cruzada en cajas de Agar de Trypticosa Soya (TSA), Agar Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa (TCBS) y medio selectivo para el grupo de *Pseudomonas* (*Pseudomonas* F Agar) (Whitman y MacNair, 2004). El tiempo de incubación fue de 24-48 h a 34°C.

Después del crecimiento bacteriano, se seleccionaron algunas colonias para realizar tinción de Gram, pruebas bioquímicas y presuntivas, principalmente; motilidad, indol, catalasa, ornitina,

agar de hierro triple de hierro, rojo de metilo y pruebas de Voges-Proskauer. Estas pruebas se explican a continuación:

6.3.1 Tinción de Gram

Para la prueba de tinción de Gram se tomó una pequeña muestra de intestino, bazo y branquias, con un asa de platino y se extendió sobre un portaobjeto. La muestra fue fijada por el calor, pasándola suavemente sobre la flama del mechero hasta que se secase. La tinción se realizó con violeta de cristal o violeta de genciana, cubriendo la muestra homogéneamente, se dejó que la solución funcionara durante un minuto a 25°C. Se enjuagó con agua y se secó al aire, para posteriormente añadir lugol durante un minuto, y luego continuar lavándolo con agua. La decoloración se realizó con alcohol durante 15 a 20 s y se lavó con agua. Se utilizó safranina, como tinción contrastante, durante 15 s, se lavó con agua y se dejó secar. Las bacterias Gram (+) mostraron un color púrpura y las bacterias Gram (-) un color rosa o rojo.

6.3.2 Prueba de catalasa

Para la prueba de catalasa se realizó con un alícuota tomado del centro de una colonia de bacterias con 18 y 48 h de incubación y fue colocado sobre un portaobjetos de vidrio. A continuación, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 30% (H₂O₂). Un resultado positivo se muestra con burbujeo y un resultado negativo sin burbujeo.

6.3.3 Prueba de Motilidad, Indol y Ornitina (MIO)

El ensayo de motilidad, indol y ornitina (MIO) se realizó en tubos con agar MIO; en cada tubo se sembraron colonias de bacterias y se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de 24 h de incubación, la prueba de movilidad tomó como positivos aquellos que generaron turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra, mientras que los negativos fueron aquellos que mostraron crecimiento sólo en la línea de siembra. El ensayo de indol se determinó mediante el reactivo de Erlinch o Kovacs, se dejó calentar el medio a temperatura ambiente antes de la inoculación. Los tubos se inocularon con un mango de platino, en el que se transfirió una porción de cultivo puro y se incubó a 37°C durante 40 a 48 h. A continuación, se añadieron 0,5 ml del Reactivo Kovac y se agitaron suavemente para determinar la producción de Indol. Se tomó como positivo cuando al añadir el reactivo se observó la formación de una banda de color rojo en la

parte superior del medio. Un color amarillo indica un indol negativo después de la adición del reactivo de Kovacs.

6.3.4 Prueba en Agar con hierro de Kligler/ azúcar triple y hierro

Se utilizó agar KIA para la prueba de Kligler. Por inclinación, se tomó una alícuota de cultivo puro de una colonia aislada de la bacteria y se sembró por picadura en el medio de cultivo de agar para posteriormente realizar una estriación de siembra. Se incubaron durante 24 h. Como resultados se observó una formación de burbujas, lo que indicaría la producción de gas, y el ennegrecimiento indicó la producción de sulfuro de hidrógeno.

6.3.5 Prueba rojo de metilo (MR) y Prueba Voges-Proskauer (VP)

Para los ensayos de rojo de metilo se utilizaron como medio de cultivo caldo MR-VP. Se tomó una colonia bacteriana y se sembró por agitación, posteriormente se incubó por 24 h. Después de la incubación, se añadieron 5 gotas del indicador rojo de metilo, el color rojo brillante indica una reacción positiva y el color amarillo indica una negativa. Para los tubos de ensayo de Voges-Proskauer (VP) se usó el caldo MR/VP donde se colocó una alícuota de la colonia y se sembró agitando en el caldo, con una incubación de 24 h. Después de la incubación, se añadieron 0,2 ml de hidróxido de potasio (KOH); El resultado positivo se indica por un color rosa-rojo y el resultado negativo por un color amarillo o cobre.

Objetivo 2. Evaluar el efecto de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos vegetales, como aditivos alimenticios, y el efecto de nuevas prácticas de manejo, en la mortalidad de crías de tilapia *O. niloticus*.

6.4 Obtención de extractos vegetales de nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*

En esta etapa se ocuparon las siguientes plantas el desierto mexicano: nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*. Las plantas fueron secadas en una estufa a 40°C durante 24 h. Se sometieron a un proceso de infusión de 3 h a 60°C con agitación, de donde obtuvieron extractos, que se pesaron en relación de 10 gr: 1000 mL (extracto: agua). Finalmente, el residuo de las plantas se separó del extracto vegetal, y las plantas se colocaron en un horno por 24 h a 60°C. Posteriormente, éstas se molieron, a fin de obtener partículas finas de 50 micras aproximadamente (Figura 3)

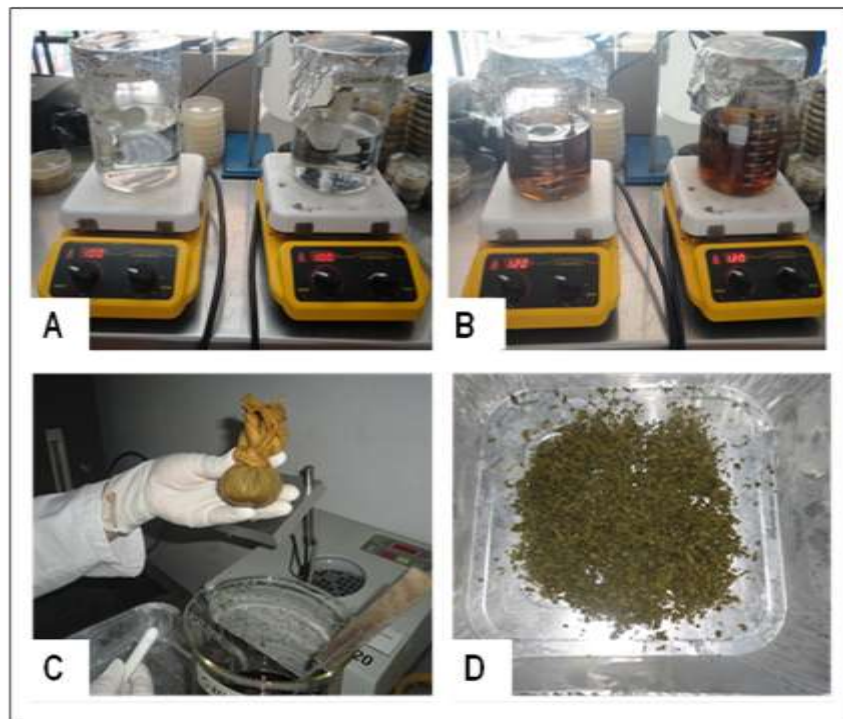


Figura 3. Proceso de extracción de plantas de nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*.

6.5 Activación de probióticos de maíz *Lactobacillus plantarum*, alfalfa *Bacillus subtilis*, pozol *Enterococcus faecium*, suero de leche *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*

Se activaron los probióticos que se encontraban en condiciones de medio ambiente (30°C), refrigeración (10 °C) y congelación (0°C). Donde se incluían probióticos de maíz *Lactobacillus plantarum*, alfalfa *Bacillus subtilis*, pozol *Enterococcus faecium*, suero de leche *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*. La activación de estos, permitió conocer su crecimiento, su viabilidad y conservación.

Para la activación de probióticos se ocuparon los medios MRS agar y caldo (medios para crecimiento de *Lactobacillus*), así también se utilizaron los medios de agar y caldo nutritivo (crecimiento), cuenta en placa (número de colonias) y medio Mueller-Hinton (Pruebas de sensibilidad-antibiogramas). A cada uno de los probióticos se les realizó la prueba de catalasa (3% de peróxido de hidrogeno H₂O₂) (Figura 4)

Para conocer la concentración de bacterias probióticas se realizaron diluciones seriadas en tubos con NaCl al 90% y el conteo de bacterias fue en agar MRS. Para la evaluación inhibitoria se utilizaron las concentraciones más altas de bacterias probióticas correspondientes a la cepa, 1x10¹ y 1x10² UFC (Figura 4)

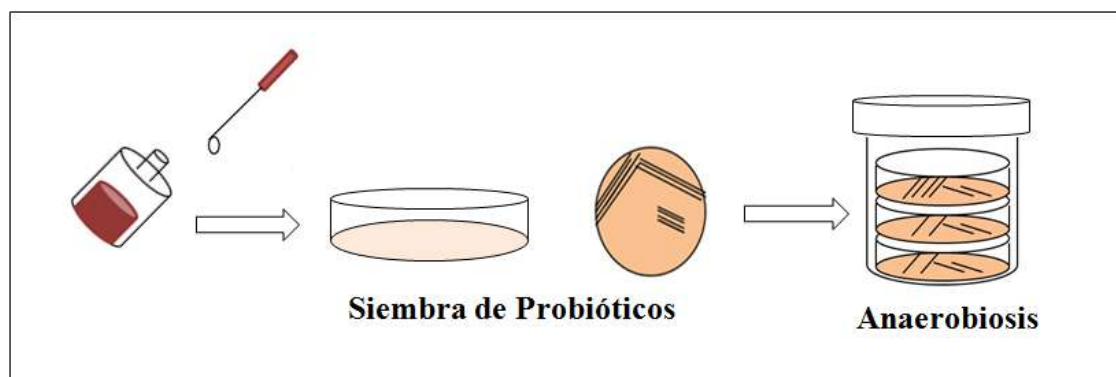


Figura 4. Siembra y activación de probióticos *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*.

6.6 Inoculación de cepas patógenas de *Aeromonas hydrophila*

La cepa patógena *Aeromonas hydrophila* fue adquirida por el Centro de Investigación Alimentación y Desarrollo (CIAD). Para realizar la inoculación de *Aeromonas hydrophila* se

utilizaron medios de TSA (Agar Tripcasa de Soya) con NaCl (Cloruro de sodio) al 3% y TSB (Caldo Tripcasa de Soya) con NaCl. La siembra en medios TSA con NaCl fue por agitación y picadura, con una incubación de 24 h a 35°C. Así mismo, se realizó la siembra de *A. hydrophila* en matraces con caldo nutritivo con una incubación de 24 h a 35°C (Figura 5)

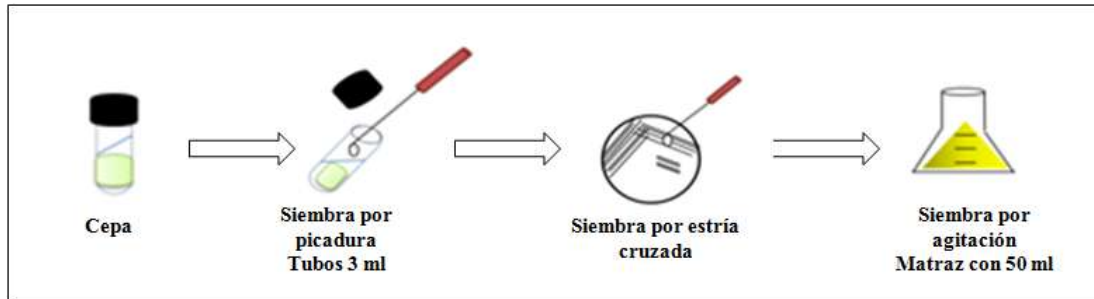


Figura 5. Inoculación del patógeno *Aeromonas hydrophila* aplicando la siembra por picadura, estría cruzada y agitación.

Posterior al crecimiento bacteriano, se realizó la dilución en medios de solución salina a una concentración del 90% de NaCl. El objetivo del método fue conocer la concentración de bacterias en 1 ml de solución salina. Posterior a un día de crecimiento, se tomó una alícuota del tubo y se sembró en medios de cultivo cuenta en placa y agar nutritivo (por estría cruzada), las cajas se incubaron a 35°C por 24 h (Figura 6)

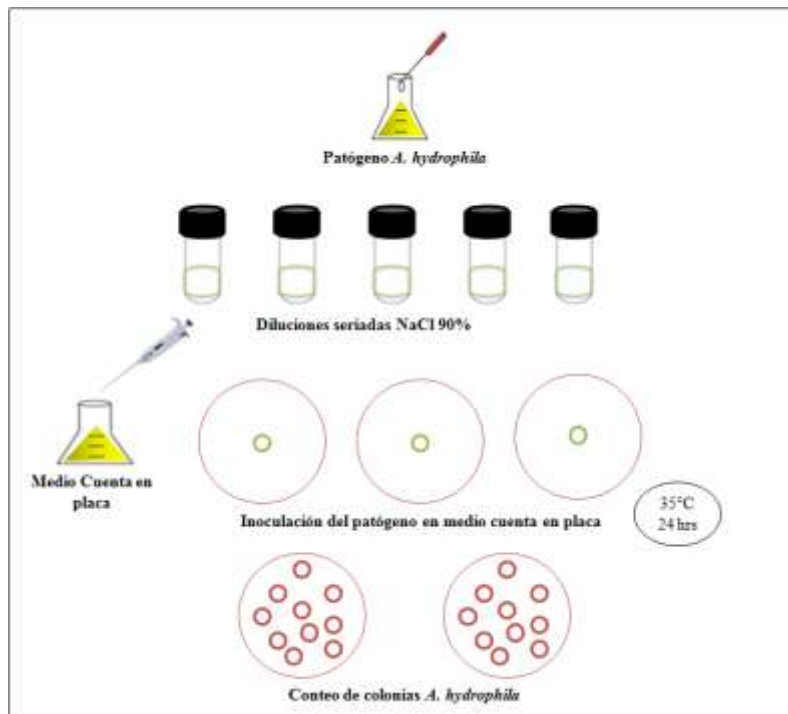


Figura 6. Dilución de *Aeromonas hydrophila* en medios cuenta en placa y agar nutritivo.

6.7 Preparación del fermentado vegetal y los probióticos

Se realizó la fermentación de extractos vegetales y probióticos de nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*, los cuales serán combinados con los probióticos de maíz *Lactobacillus plantarum*, alfalfa *Bacillus subtilis*, pozol *Enterococcus faecium*, suero de leche *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*. La relación de los compuestos del fermentado fueron: 3 ml de medio dzapec (combinación de azúcares), 300 μL de probiótico (maíz, alfalfa, pozol y suero de leche) y 3 g de extracto (nopál, sábila y orégano), a cada combinación se aplicó anaerobiosis. Los frascos fueron mantenidos a una temperatura de 37°C durante 4 y 10 días (d).

6.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Posterior al periodo de fermentación, de las combinaciones del extracto vegetal y los probióticos, se realizó el análisis de la CMI contra el patógeno *A. hydrophila*. La CMI se determinó en medios de agar Mueller-Hinton. Se colocó una muestra de 50 μL de *A. hydrophila* en el centro de la caja con agar Mueller-Hinton, se aplicó el método de barrido con ayuda de una vara de vidrio en forma de “L”, posteriormente se colocaron seis discos de 4 mm de diámetro impregnados con el fermentado correspondiente, y dos discos con oxítetraciclina como control. Cada muestra se realizó por duplicado para cada una de las combinaciones de extractos con probióticos y diluciones de *Aeromonas hydrophila*. Se aplicó anaerobiosis y se incubaron por 24 h a 37°C (Figura 4). Las variables que se tomaron en cuenta para determinar las CMI fue: el halo de inhibición (mm), la concentración de la combinación entre el extracto y los probióticos (UFC mL^{-1}), la concentración del patógeno (UFC mL^{-1}) y el tiempo de incubación (h) (Figura 7)

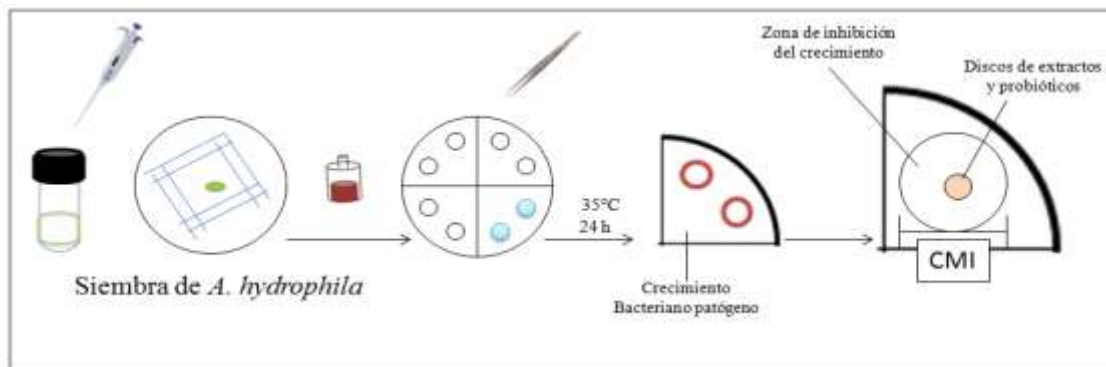


Figura 7. Prueba microbiológica “antibiograma” y medición de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

6.9 Análisis estadístico

Análisis estadístico exploratorio: Para el análisis de ausencia y presencia de bacterias patógenas, se ocupó el manual de Whitman y MacNair (2004). Los datos fueron procesados en la paquetería de office Excel. Frecuencia de medias, valores mínimos y máximos.

La Concentración Mínima Inhibitoria: se analizó por pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, ANOVA ($p < 0.05$), y pruebas de correlación, con el Software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1. Determinación bacteriana en *O. niloticus*

7.1 Parámetros fisicoquímicos del agua

Los parámetros fisicoquímicos del agua en los estanques de pre-engorda y engorda se encontraron dentro de los límites para el cultivo de tilapia nilotica *Oreochromis niloticus* (Cuadro 1 y 2). Los resultados mostraron que la presencia de bacterias patógenas no se relaciona significativamente con los parámetros fisicoquímicos (FQ) del agua, es decir, los parámetros FQ no se consideran un indicativo de enfermedad en la granja de producción, además de que se encuentran dentro de los valores óptimos para el cultivo de tilapia de acuerdo con Saavedra (2006) y Meyer (2007). *Aeromonas hydrophila* se relaciona con los cambios bruscos de temperatura, oxígeno disuelto e inadecuada nutrición. De acuerdo con Conroy (2014) y Li y Caí (2011) la variación constante de los parámetros fisicoquímicos es un factor de estrés que beneficia el brote de enfermedades causadas por bacterias oportunistas; no obstante, en el estudio no hubo relación directa con los parámetros fisicoquímicos.

Cuadro 1. Valores de parámetros fisicoquímicos del agua en estanques de pre-engorda de cultivo de *Oreochromis niloticus*.

	Temperatura	Oxígeno	pH	Nitritos	Nitratos
	(°C)	(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Óptimo	25-32.0	5.0-9.0	6.0-9.0	0.1	1.2-2.0
Marzo	22.5±1.12	7.5±1.9	9.1	0.25	0.25
Abril	22.9±0.91	7.7±1.83	8.9	0.5	0.5
Mayo	23.1±0.77	7.4±1.93	9.2	0.25	0.25

Cuadro 2. Valores de parámetros fisicoquímicos del agua en estanques de engorda de tilapia *Oreochromis niloticus*

	Temperatura	Oxígeno	pH	Nitritos	Nitratos
	(°C)	(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Marzo	23±2.34	7±2.26	8.07	0.25	0.25
Abril	24±1.14	6.9±2.21	8.5	0.5	0.5
Mayo	24.8±0.97	7±2.20	8.3	0.25	0.25

7.2 Análisis externo en tilapia *O. niloticus*

El análisis externo mostró signos clínicos de enfermedad, principalmente hemorragias en la piel, opacidad corneal, ulceración en el cuerpo, decoloración en el hígado, aletas deshilachadas e inflamación de intestino y vesícula (Figura 8). Estas anomalías se consideran como los principales síntomas de infección reportados por Eldar *et al.* (1995), Figueiredo *et al.* (2006), Pretto-Giordano *et al.* (2010), quienes observaron signos como; alteraciones en piel, anorexia, exoftalmia, opacidad de córnea, extensión de la cavidad visceral, hemorragia e inflamación abdominal, hepatomegalia y esplenomegalia. De acuerdo con Soto *et al.* (2009) las bacterias causan hiperplasia epitelial en branquias, esplenomegalia, renomegalia y necrosis en órganos internos, principalmente en bazo, corazón, hígado, riñón, cerebro y musculatura. Por ejemplo Yardimci & Aydin (2011), Penagos *et al.* (2009) y Suchanit *et al.* (2010) indicaron que *Aeromonas hydrophila* se relaciona con hemorragias en branquias y piel, debilidad y anorexia, así como la pérdida de la visión por ruptura orbital de los ojos. Coincidiendo con lo anterior Clavijo *et al.* (2002) mencionaron que la presencia del género *Edwardsiella* sp, provoca septicemia en órganos internos y externos, incluyendo riñón, hígado y bazo, piel, recto, aletas, inflamación abdominal y ojos opacos. Algunos patógenos se transmiten de forma horizontal y utilizan como vehículo precursor el agua, provocando brotes de infección de pez a pez por contacto directo (Mauel *et al.*, 2007). Newman (1993) mencionó que el grado de patogenicidad depende de la resistencia de la especie y las condiciones ambientales, debido a que algunos patógenos se encuentran presentes en ambientes con altas temperaturas, pobre calidad de agua y

acumulación de materia orgánica. Estas condiciones permiten la adherencia y replicación bacteriana celular en los peces (Huicab-Pech *et al.*, 2016).

En este sentido, el manejo y la manipulación de organismos en el presente estudio se considera inadecuado debido a que las actividades realizadas en las fases de producción no cumplen con el Manual de Buenas Prácticas establecido por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), los cuales demandan el cumplimiento de las referencias establecidas por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), Organización para la alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de Comisión del *Codex Alimentario*; concentradas en el manejo de agua, manejo de alimentos, manejo de sustancias químicas y fármacos e inocuidad del producto durante la cosecha; estas medidas de seguridad reducen los riesgos de contaminación biológica, física y química, y evitan las posibles pérdidas ocasionadas por las enfermedades, en éste caso pérdidas por bacterias oportunistas.



Figura 8. Signos externos de daños y anomalías. A, B y C: Decoloración de piel, D: Hemorragias en la piel, E: Opacidad corneal, F: Aletas deshilachadas.

7.3 Composición taxonómica de bacterias encontradas en la especie de tilapia *Oreochromis niloticus*

Se identificaron 11 géneros bacterianos en etapa de pre-engorda y engorda de tilapia, principalmente; *Arthrobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Vibrios* sp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella* sp., *Flexibacter* sp. y *Flavobacterium* sp.

La tinción de Gram comprobó la presencia de organismos Gram negativos con 55% de predominancia *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella* sp., *Flexibacter* sp., y *Flavobacterium* sp., y 45% de organismos Gram positivos de *Arthrobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., y *Streptococcus* sp. Los resultados coinciden con Al-Harby y Naim-Uddin (2004) los cuales determinaron una prevalencia de 77% de bacilos Gram negativas en la flora intestinal de tilapia y una prevalencia >10% de bacterias *Aeromonas hydrophila*, *Swewanella putrefaciens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Escherichia coli* y *Vibrio Cholerae*. Algunas de las bacterias que se encontraron en el presente estudio se consideran autóctonas del ambiente acuático, como es el caso de la bacteria *Aeromonas hydrophila* y *Vibrios* sp (Al-Harby y Naim-Uddin, 2004).

La presencia de diversos géneros bacterianos varían de acuerdo al crecimiento de los organismos; sin embargo, la causa de su diversificación se debe al consumo de alimento y la calidad de agua. Las bacterias Gram negativas son la principal causa de enfermedad bacteriana, por ejemplo Austin y Austin (2007) mencionaron que el género *Aeromonas* sp., provoca la furunculosis y la septicemia hemorrágica en la piel. Lo anterior coincide con lo señalado por Calvo y Martínez-Martínez (2009) los cuales consideran que las bacterias Gram negativas son enlistadas en el margen de la salud pública, así como de alto impacto por la resistencia a los antibióticos.

En marzo, abril y mayo se detectó la presencia de *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrios* sp. y *Enterococcus* sp., siendo el mes de marzo (90.0%) el que tuvo mayor incidencia de géneros bacterianos en comparación con los meses de abril (63.9%) y mayo (72.7%).

Se registró la presencia de cinco géneros bacterianos durante la fase de engorde, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrios* sp., *Enterococcus* sp., y *Micrococcus* sp., con una mayor incidencia en marzo, abril y mayo. La mayor presencia de patógenos, durante esta etapa, se determinó principalmente en marzo y mayo (Cuadro 3).

En ambas fases de producción, la incidencia de *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., y *Aeromonas* sp., se relaciona con lo reportado por Soto (2009) en tilapias cultivadas en jaulas flotantes; además, éstos géneros pueden provocar un brote epidémico por su potencial patógeno bacteriano. Al-Harbi *et al.* (2005) indicaron que la presencia de bacterias en la flora digestiva del pez es normal; sin embargo, el brote de enfermedad se relaciona cuando existe el factor de estrés a partir de la interacción entre peces, agentes patógenos y el medio acuático, como hábitat natural del organismo, así como los factores de mala calidad de agua y exceso de materia orgánica, que permiten que la incidencia de enfermedad sea mayor como lo señalaron Huicab-Pech *et al.* (2016). A pesar de que los peces presentan una gran diversidad bacteriana, Snieszko (1975) señaló que existe un efecto simbiótico entre bacterias, es decir, el hospedero se adapta a los cambios nutricionales y a la asimilación de alimento en el tracto digestivo a través del equilibrio bacteriano.

Los géneros bacterianos encontrados en el presente trabajo, pertenecen al linaje de especies como *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus iniae*, *Pseudomonas* spp., *Edwardsiella* sp., *Flexibacter* sp., y *Flavobacterium* sp., los cuales representan un riesgo para la salud humana. Las bacterias son organismos autóctonos del medio acuático, incluyendo agua y sedimento. La presencia como patógeno oportunista se debe a las condiciones del medio acuático y el estrés que favorecen su proliferación, de acuerdo con Burr *et al.* (2012), Soto-Rodríguez *et al.* (2013), Palumbo *et al.* (1992) y Woo *et al.* (2010), los organismos bajo condiciones de estrés son susceptibles a la presencia de patógenos oportunistas causantes de septicemia hemorrágica y signos clínicos como nado errático o en círculos, movimientos descoordinados, anorexia o disminución de apetito, exoftalmia, opacidad de córnea, extensión de la cavidad visceral, hemorragia e inflamación abdominal, reblandecimiento del cerebro y hígado, hepatomegalia y palidez en el órgano, así como esplenomegalia y adherencia visceral comúnmente encontrado en cultivos y estudios a nivel

experimental. El género *Sthapylococcus* sp y *Micrococcus* sp se presentó en organismos de engorda. De acuerdo con Mhango *et al.* (2010) y González-Rodríguez *et al.* (1999) la falta de higiene en el manejo de los peces se relaciona con bacterias comunes en la piel humana y la flora bacteriana normal de peces dulceacuícolas. El cultivo de tilapia presentó aquellas bacterias que se encuentran en la NOM-115-SSA1-1994, por lo que su actividad infectiva se relaciona con intoxicaciones alimentarias en el ser humano, además de que algunas se clasifican como patógenos indicativos de contaminación fecal, como es el caso de *Enterococcus* sp., *Vibrio* sp., y *Sthapylococcus* sp. Por su parte Soto (2009) señaló que la variación de temperatura, los asentamientos humanos, la cantidad de alimento suministrado, la calidad nutricional y los métodos de cosecha, se relacionan con la incidencia de bacterias oportunistas en el cultivo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Presencia-Ausencia de patógenos en tilapia *O. niloticus* durante las etapas de pre-engorde y engorde.

Meses	Pre-engorde	Engorde
Marzo	<i>Aeromonas</i> sp. <i>Edwardsiella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrios</i> sp. <i>Flexibacter</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrios</i> sp. <i>Flexibacter</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.
Abril	<i>Aeromonas</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrios</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp. <i>Edwardsiella</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrios</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.
Mayo	<i>Aeromonas</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrios</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp. <i>Edwardsiella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrios</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.

Cuadro 4. Determinación de géneros bacterianos por pruebas bioquímicas en los meses marzo, abril y mayo.

Bacteria	Gram		O	Ct	Mo	Ind	Orn	Lis	MR	VP
MARZO										
<i>Arthrobacter</i> sp.	+	C	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	+	C	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	C	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp.	+	C	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Streptococcus</i> sp.	+	C	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Aeromonas</i> sp.	-	B	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Vibrio</i> sp.	-	B	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas flourescens</i>	-	B	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Edwardsiella</i> sp.	-	B	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Flexibacter</i> sp.	-	B	+	-	-	-	-	-	-	-
ABRIL										
<i>Enterococcus</i> sp.	+	C	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	C	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp.	+	C	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Aeromonas</i> sp.	-	B	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Vibrio</i> sp.	-	B	-	+	+	-	-	+	-	-

<i>Pseudomonas</i> sp.	-	B	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Edwardsiella</i> sp.	-	B	-	+	-	-	-	-	-	-
MAYO										
<i>Streptococcus</i> sp.	+	C	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	+	C	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Micrococcus</i> sp.	+	C	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Aeromonas sobria</i>	-	B	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Flavobacterium columnare</i>	-	B	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	B	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Vibrios</i> sp.	-	B	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Edwardsiella</i> sp.	-	B	-	+	+	+	+	+	-	-

Bacilo (B), Cocos (C), Oxidasa (O), Catalasa (Ct), Motilidad (Mo), Indol (Ind), Ornitina (Orn), Lisina (Lis), Rojo de Metilo (MR), Vogues-Proskeaur (VP).

7.4 Activación de probióticos de maíz *Lactobacillus plantarum*, alfalfa *Bacillus subtilis*, pozol *Enterococcus faecium*, suero de leche *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*

La activación de probióticos mostró que a temperaturas bajo cero su calidad probiótica es alta. Es decir, las muestras probióticas mantenidas en la fase de congelación mostraron mayor cantidad de colonias en el cultivo en agar y caldo MRS (Figura 10), además de que la inhibición sobre patógenos infecciosos fue mayor (Cuadro 5).

Cuadro 5. Activación de probióticos en condiciones de temperatura ambiente, refrigeración y congelación.

Activación y crecimiento de bacterias probióticas en Caldo MRS				
Probióticos	Bacteria	T° Ambiente	Refrigeración	Congelación
Suero de leche	<i>Enterococcus faecium</i>	SI	SI	SI
Maíz	<i>Lactobacillus plantarum</i>	SI	SI	SI
Pozol	<i>Enterococcus faecium</i>	NO	SI	SI
Alfalfa	<i>Bacillus subtilis</i>	SI	SI	SI
Suero de leche M2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SI	SI	SI

En pruebas de catalasa los probióticos fueron positivos, debido a que mostraron burbujeo al aplicar el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) sobre la colonia pura probiótica (Figura 9).

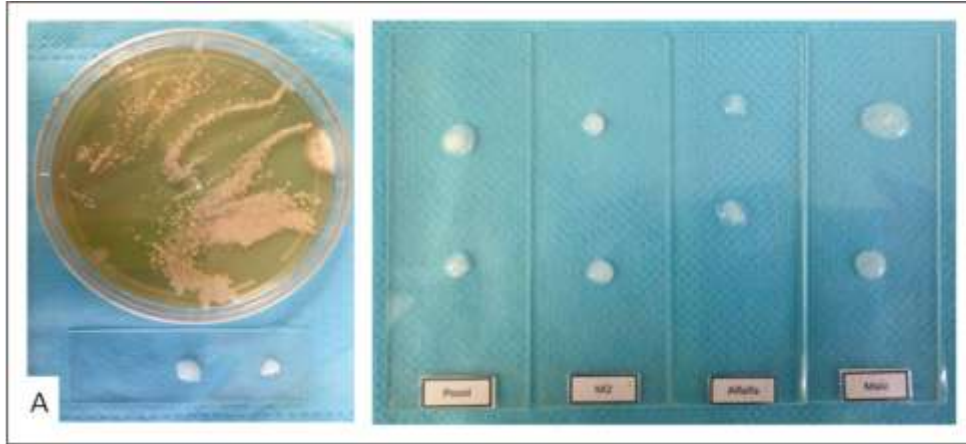


Figura 9. Pruebas de catalasa en cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*.

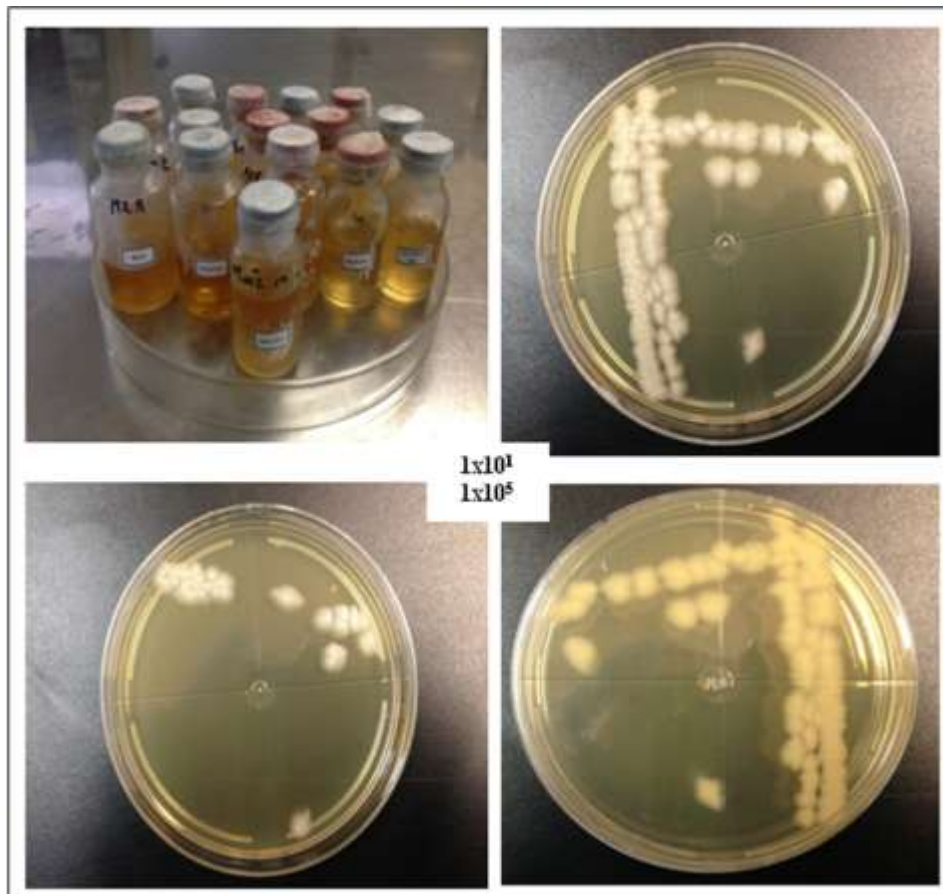


Figura 10. Colonias de bacterias probióticas en medios de caldo y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe).

7.5 Pruebas de sensibilidad contra el patógeno *A. hydrophila*

El extracto de leche de cabra con bacterias *Enterococcus faecium* mostró un mayor halo de inhibición contra el patógeno *A. hydrophila*. La concentración mínima inhibitoria se presentó cuando la concentración del patógeno fue de 2.0×10^8 UFC mL⁻¹ y la concentración de bacterias probióticas fue de A: 9.0×10^2 y B: 3.5×10^3 UFC mL⁻¹. Los resultados señalaron inhibición del patógeno cuando la concentración de bacterias probióticas es mayor. Se considera que el uso adecuado del probiótico debe aplicarse en las primeras 24 y 48 h, debido a que se observaron diferencias significativas en las concentraciones A y B (Figura 11) en relación al tiempo de exposición del probiótico. Los resultados indicaron que la capacidad de inhibición fue provocada por bacterias *E. faecium* las cuales están presentes en los extractos de sueros de leche de cabra y pozol. De acuerdo con Klare *et al.* (2003) *E. faecium* es un grupo de bacterias ácido lácticas que actúan como un probiótico natural en la acuicultura y que se encuentran distribuidas en la naturaleza, por lo que se considera una cepa de baja patogenicidad.

E. faecium es una bacteria ácido láctica propuesta en la acuicultura como un agente con potencial probiótico. Klare *et al.*, (2003) indicaron que la bacteria se encuentra en peces sanos y se desempeña con baja patogenicidad en el hospedero. *E. faecium* tiene la capacidad de producir bacteriocinas (péptidos pequeños), las cuales perforan la membrana celular de la bacteria patógena. Rolfe (2000) mencionó que *E. faecium* actúan en el sistema inmunológico de los organismos acuáticos e intervienen de manera positiva en el equilibrio microbiano intestinal, lo anterior coincidió con Fuller (1989). De acuerdo con Vandenberg (1993) y Aymerich *et al.* (2000), la cepa de *E. faecium* en la industria alimenticia (producción de queso y yogurt) extiende la vida útil de los productos por su contenido de ácido láctico y ácido acético, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas. Coincidiendo con lo anterior Kos *et al.* (2008) y Ramakrishnan *et al.* (2008) reportaron que la especie *E. faecium* MTCC 5695 contiene propiedades bioactivas, antioxidativas y bioprotectoras, las cuales estimulan el crecimiento celular y actúan como agentes terapéuticos en la flora intestinal humana y animal.

Entre sus propiedades, toleran concentraciones altas de ácidos y pH bajos, es decir, tienen la capacidad de colonizar fácilmente el hábitat del tracto digestivo, lo que coincide con lo encontrado por Chang and Liu (2000) en un estudio realizado con la especie anguila Europea

Anguilla anguilla L., donde observaron una colonización bacteriana (73%) por *Enterococcus faecium* SF68 y *Bacillus toyoi* en la microflora intestinal a partir de la adición de bacterias en dietas suministradas por 14 días, provocando que la especie anguila Europea *Anguilla anguilla* L., sea resistente a *Edwardsiella tarda*. Lo anterior coincide con Marcin *et al.* (2006) los cuales demostraron que la sinergia entre la cepa *Enterococcus faecium* M-74 y el aceite de orégano influye sobre la ganancia de peso en cerdos destetados.

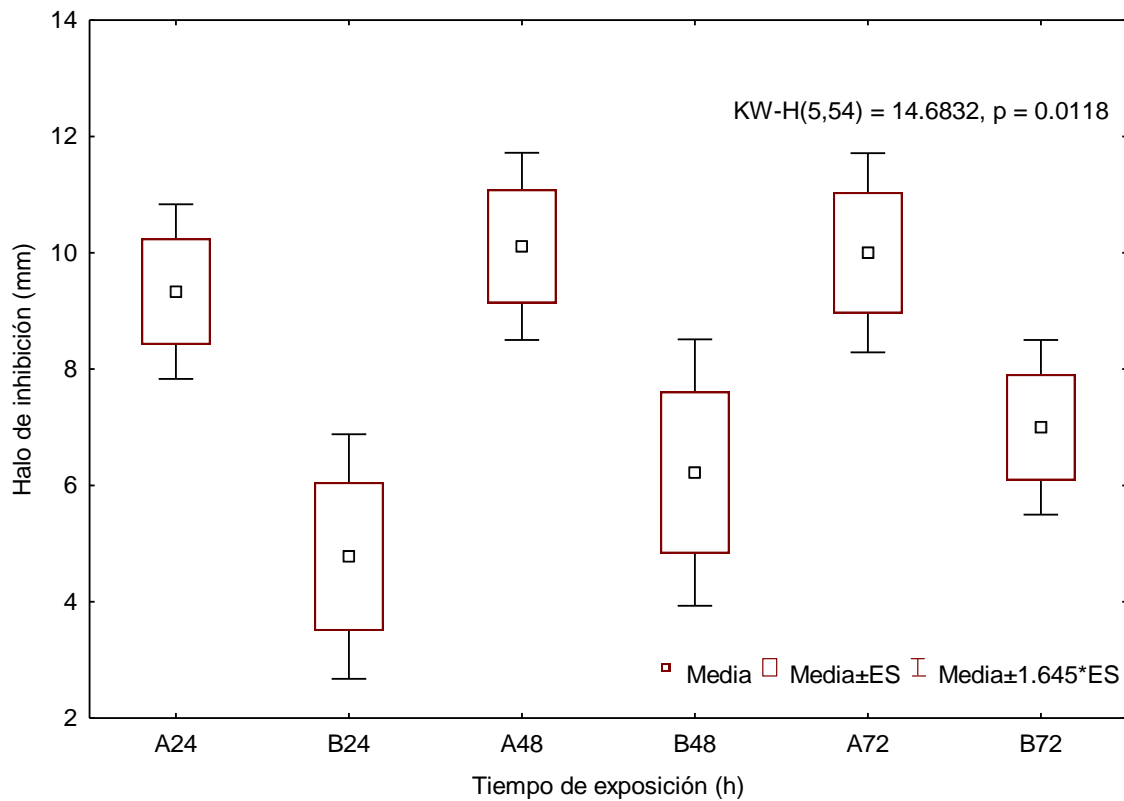


Figura 11. Halo de inhibición del probiótico *Enterococcus faecium* contra *A. hydrophila*. Se muestra diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

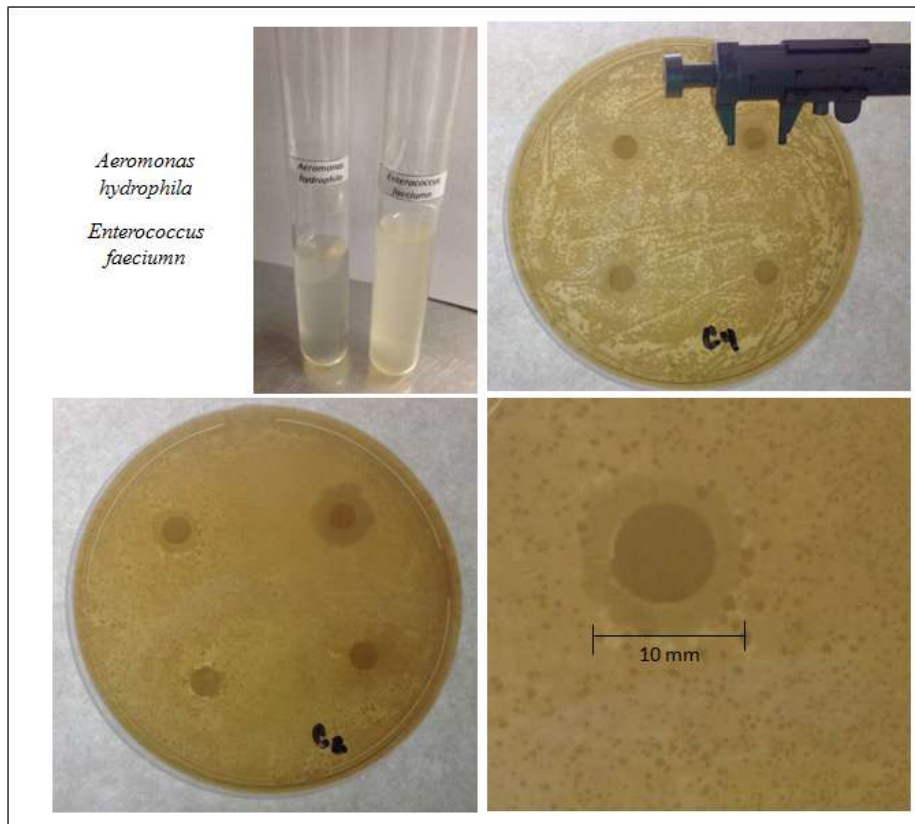


Figura 12. Crecimiento de bacterias probióticas y halo de inhibición contra el patógeno *A. hydrophila*.

Posterior a la prueba de sensibilidad se realizó la fermentación del probiótico *Enterococcus faecium* en combinación con los extractos vegetales de nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*, en combinación con el medio dzapec. Este análisis permitió conocer las CMI del fermentado contra el patógeno (Figura 13, 14).

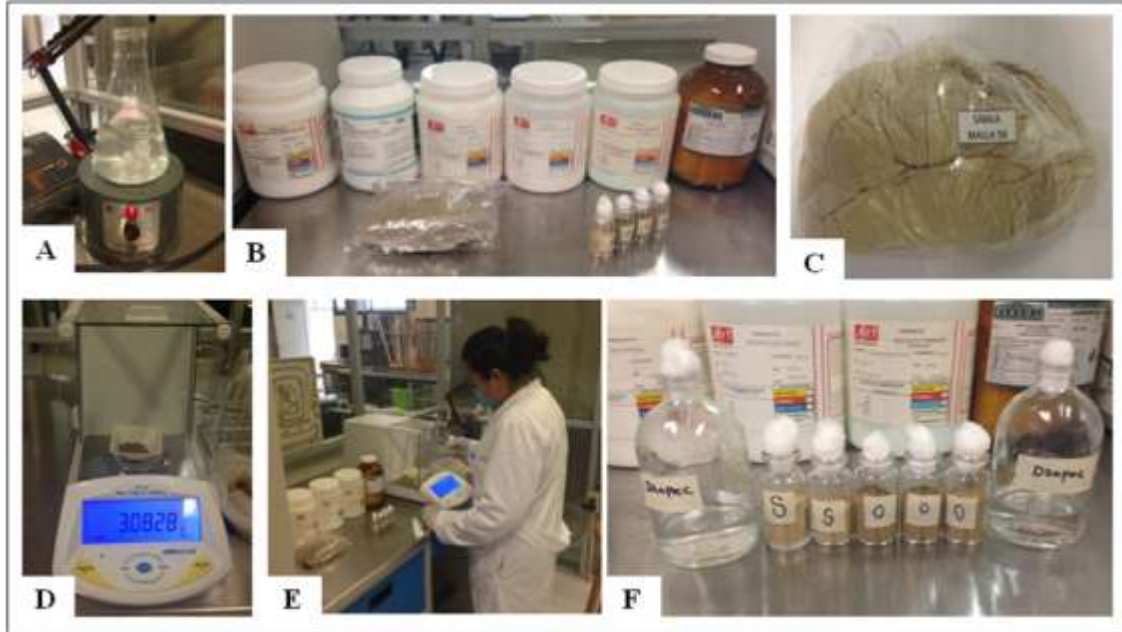


Figura 13. Metodología para el proceso de la fermentación. Preparación de medio dzapec y pesado de extractos de orégano, nopal y sábila.

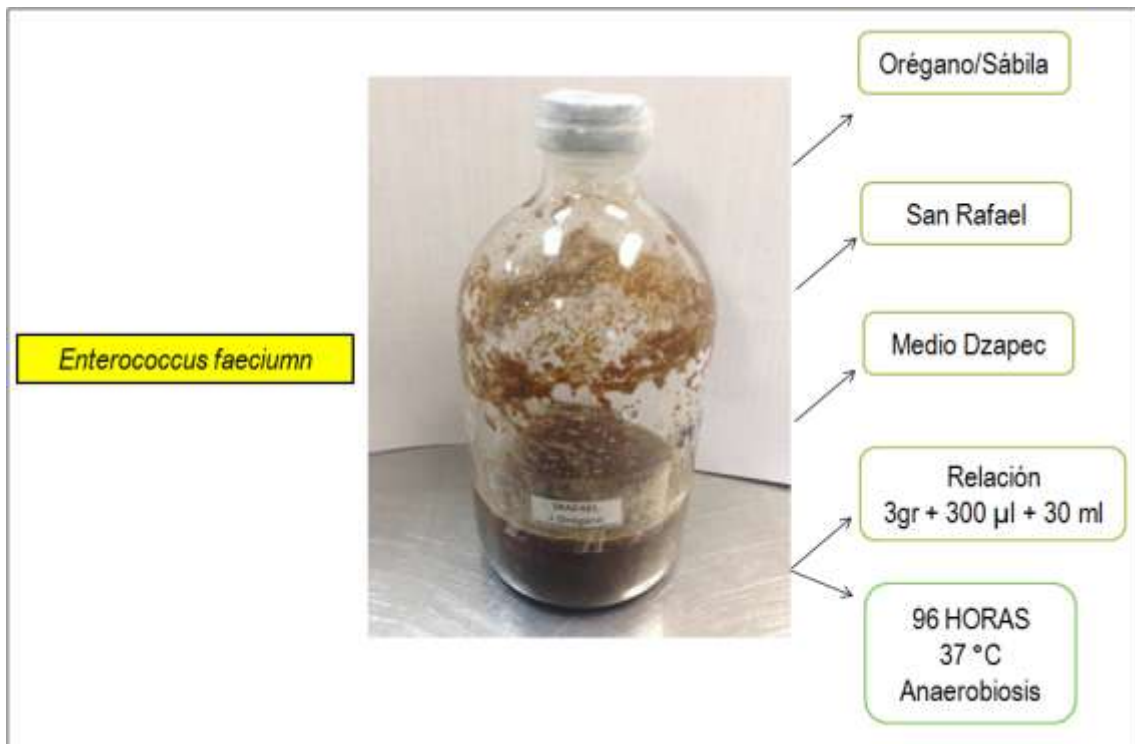


Figura 14. Frascos con medio dzapec, extracto de plantas de nopal, sábila, orégano y probióticos.

Como resultados, se obtuvo que la combinación de *Enterococcus faecium* con extractos de orégano *Lippia berlandieri* y nopal *Opuntia ficus indica*, mostraron halos de inhibición entre 8.5 ± 1.5 mm y el extracto de sábila *Aloe vera* con un halo de inhibición de 8.0 ± 1.0 mm.

La combinación del extracto de nopal con *E. faecium* permite que el crecimiento del patógeno disminuyan. Aguilar *et al.* (2006) y Torres-Ponce *et al.* (2015) señalaron que el nopal presenta propiedades medicinales de alto potencial agrotecnológico, como antiviral y antibacteriano aplicadas en la industria agropecuaria, industria alimenticia y farmacológica.

El extracto de orégano y sábila mostró mayor inhibición cuando fue expuesto a 24 y 48 h de incubación, es decir, que a 72 h ya no se presentó crecimiento del probiótico. El extracto de nopal en combinación con *E. faecium* presentó un crecimiento exponencial a través del tiempo de incubación (Figura 15).

El nopal, como material fibroso, favorece el proceso digestivo y reduce los problemas intestinales y al mismo tiempo mejora la absorción de los nutrientes alimenticios. De acuerdo con Paredes-Aguilar *et al.* (2007), durante el proceso de fermentación, el nopal, produce una proteína microbiana por la degradación de la glucosa que se encuentra presente en la planta, por lo tanto se puede usar como sustrato para el crecimiento de bacterias probióticas, así como se muestra en el presente estudio (Figura 16, 17).

Las bacterias ácido lácticas de *Enterococcus spp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Aerococcus sp.*, y *Pediococcus sp.*, forman parte de la flora gastrointestinal y se caracterizan por ser bacterias cocoides, bacilares inmóviles que obtienen su energía por fermentación de azúcares, los resultados coincidieron con Marcin *et al.* (2006) los cuales demostraron que la presencia de *Enterococcus faecium* en el tracto digestivo, estimula el crecimiento y el aumento de peso de ganado porcino.

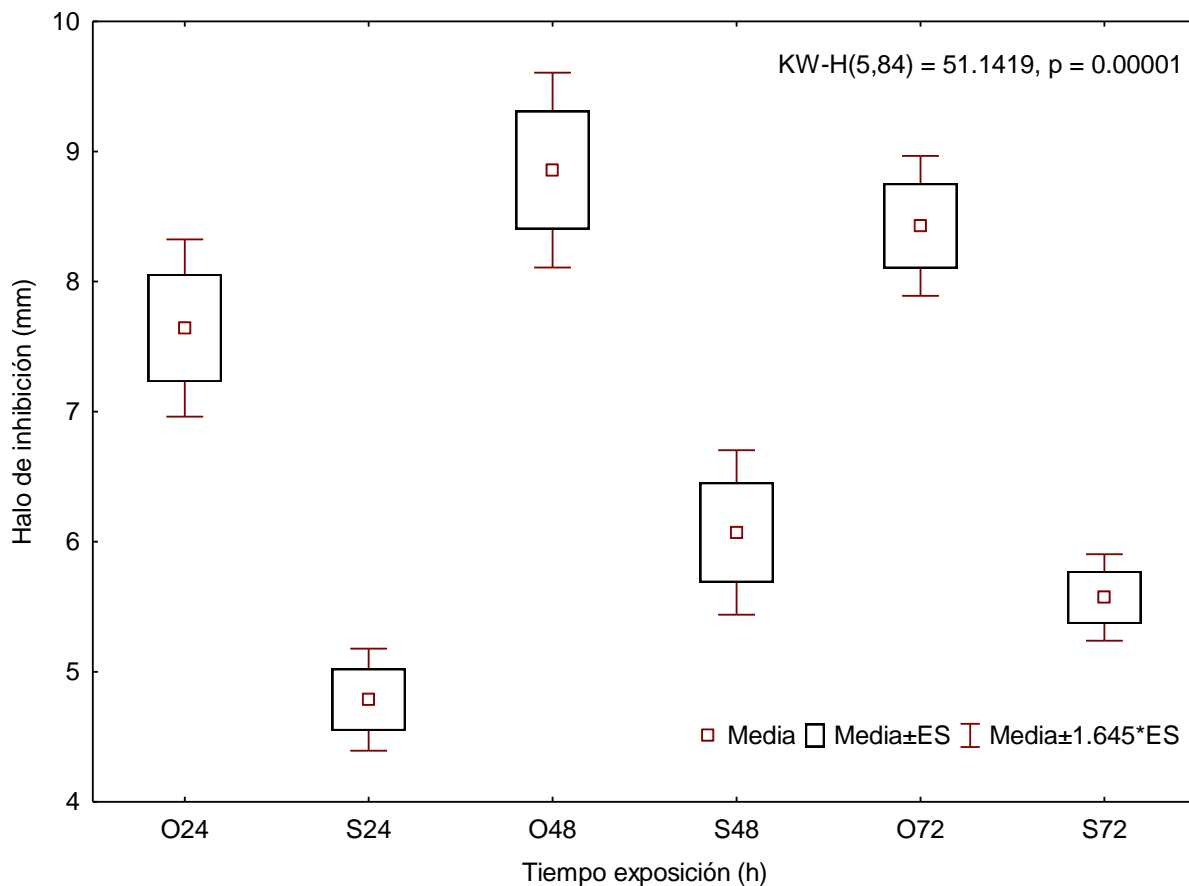


Figura 15. Efecto del orégano *Lippia berlandieri* y sábila *Aloe vera* contra *A. hydrophila*. KW-H (Pruebas de Kruskal Wallis).

Paredes-Aguilar *et al.* (2007) señalaron que el efecto del orégano por su contenido de bacteriocinas puede actuar contra *Vibrios* patógenos, además de ser un aditivo o conservador en la industria alimenticia.

Lo anterior coincide con lo señalado por Rangel *et al.* (2008) y Terblanché y Kornelius (1996), los cuales sugieren que la aplicación de orégano, como aceite esencial, evita la contaminación de los alimentos susceptibles a bacterias del género *Vibrio*, esto en consecuencia, de la fracción alta de timol de la planta.

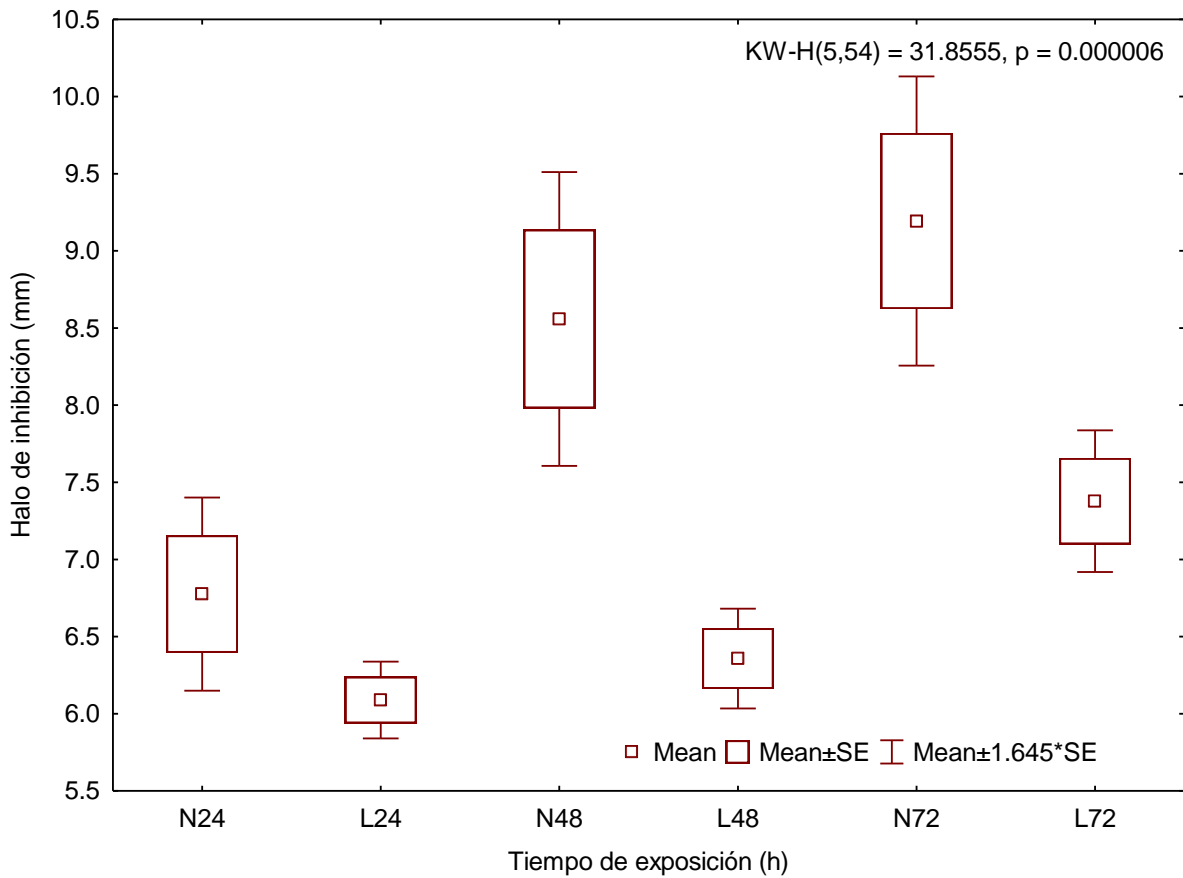


Figura 16. Efecto de extractos de nopal *Opuntia ficus indica* y *Enterococcus faecium* contra *A. hydrophila*. KW-H (Pruebas de Kruskal Wallis).

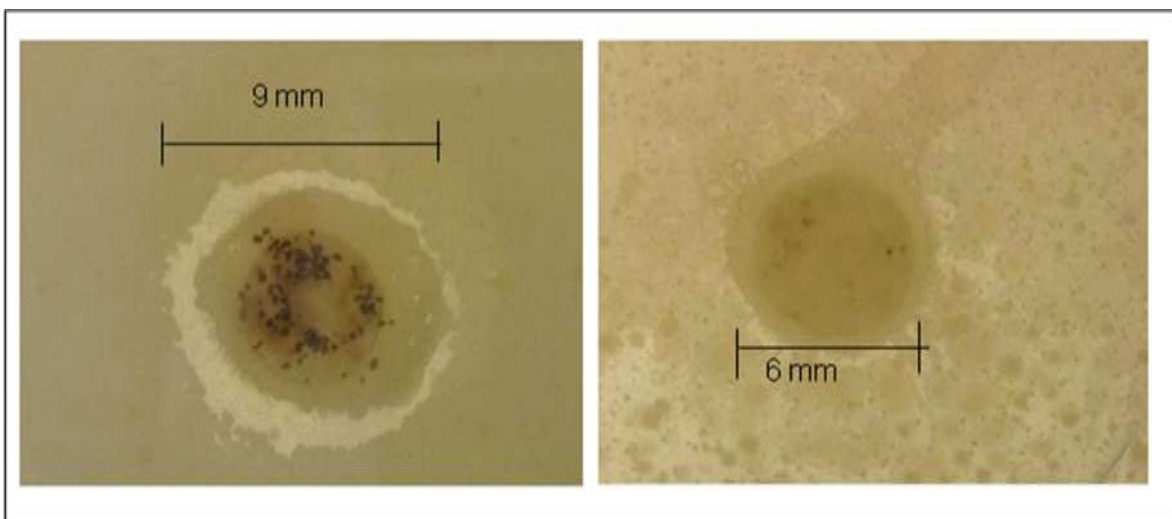


Figura 17. Antibiogramas y halos de inhibición contra *A. hydrophila* al aplicar extractos de sábila y orégano.

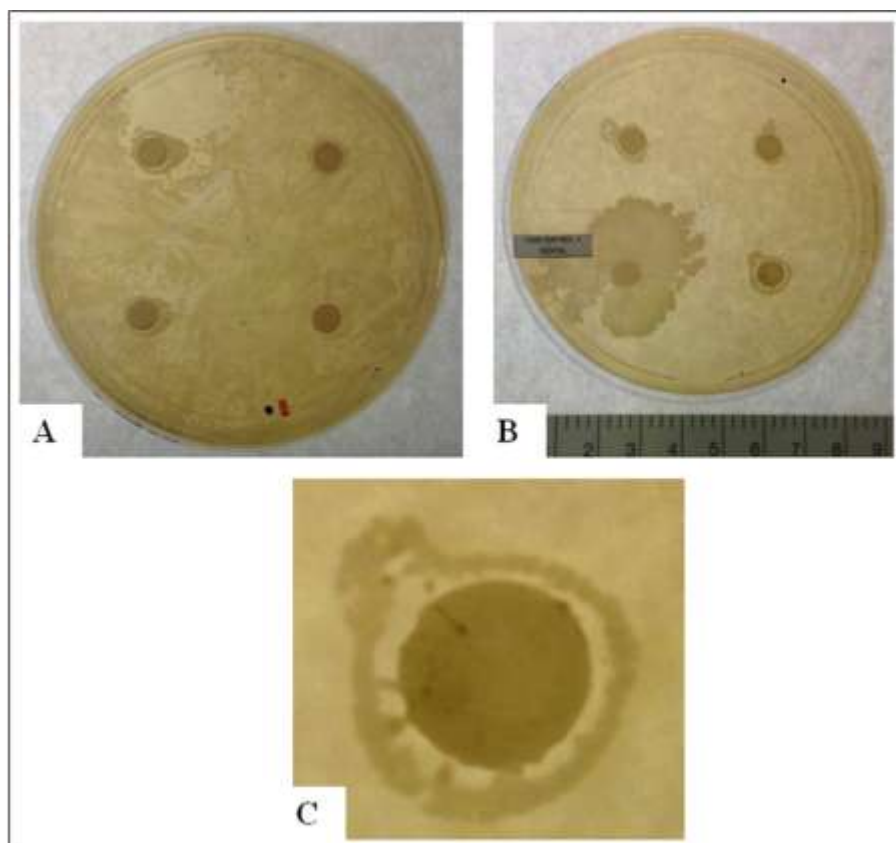


Figura 18. Efecto del extracto de nopal *Opuntia ficus índica* contra *A. hydrophila* (A, B, C)

Para la determinación del efecto de *Lactobacillus acidophilus* en combinación con los extractos de nopal *Opuntia ficus índica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*. Se evaluaron dos concentraciones del fermentado. Se ocupó la cepa de *Lactobacillus acidophilus* a una concentración 3.24×10^3 UFC mL⁻¹, la cual se identificó como A y AB, y la concentración 10.0×10^4 UFC mL⁻¹ se identificó como C y D. Estas concentraciones fueron evaluadas contra dos diferentes diluciones de *A. hydrophila* representadas por 1.28×10^3 y 1.20×10^4 UFC mL⁻¹. Como resultados se obtuvo que la combinación de *L. acidophilus* con el extracto de orégano *L. berlandieri* mostró mayor inhibición contra *A. hydrophila* en comparación con los extractos de sábila y nopal, los cuales no mostraron inhibición. El extracto de orégano con *L. acidophilus* en sus diferentes diluciones y el tiempo de exposición no mostraron diferencia significativa en ninguno de sus tratamientos ($p > 0.05$) (Figura 19). *Lactobacillus acidophilus* mostró crecimiento bacteriano y competencia por sitios; es decir, que este probiótico es capaz de competir contra el patógeno debido al crecimiento en el análisis *in vitro* (18-20 mm); por lo tanto, podemos concluir que esta bacteria es capaz de colonizar el tracto digestivo del organismo y actuar como un agente

preventivo, como es el caso de *Enterococcus faecium*. Los resultados se compararon con Ahilan *et al.* (2004) quienes reportaron que la adición de *Lactobacillus* spp en dietas para *Carassius auratus* produce un mayor crecimiento en la especie. Por su parte, Al-donail *et al.* (2009) señalaron que *Lactobacillus acidophilus*, en cultivos de bagre africano *Clarias gariepinus*, influye en la mejora del crecimiento, la supervivencia y nutrición de organismos; sin embargo, en ambos estudios no se observó la eliminación del agente patógeno, como lo mostró *Enterococcus faecium* en dietas de anguilla europea y cerdos destetados. Estudios realizados por Herrera-Sirias *et al.* (2014) indicaron que *Lactobacillus acidophilus* actúa contra *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* en camarones *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, una de las desventajas que presentan algunas bacterias del género *Lactobacillus* es la mínima tolerancia a pH bajos (O'sullivan, 2001) (Figura 19).

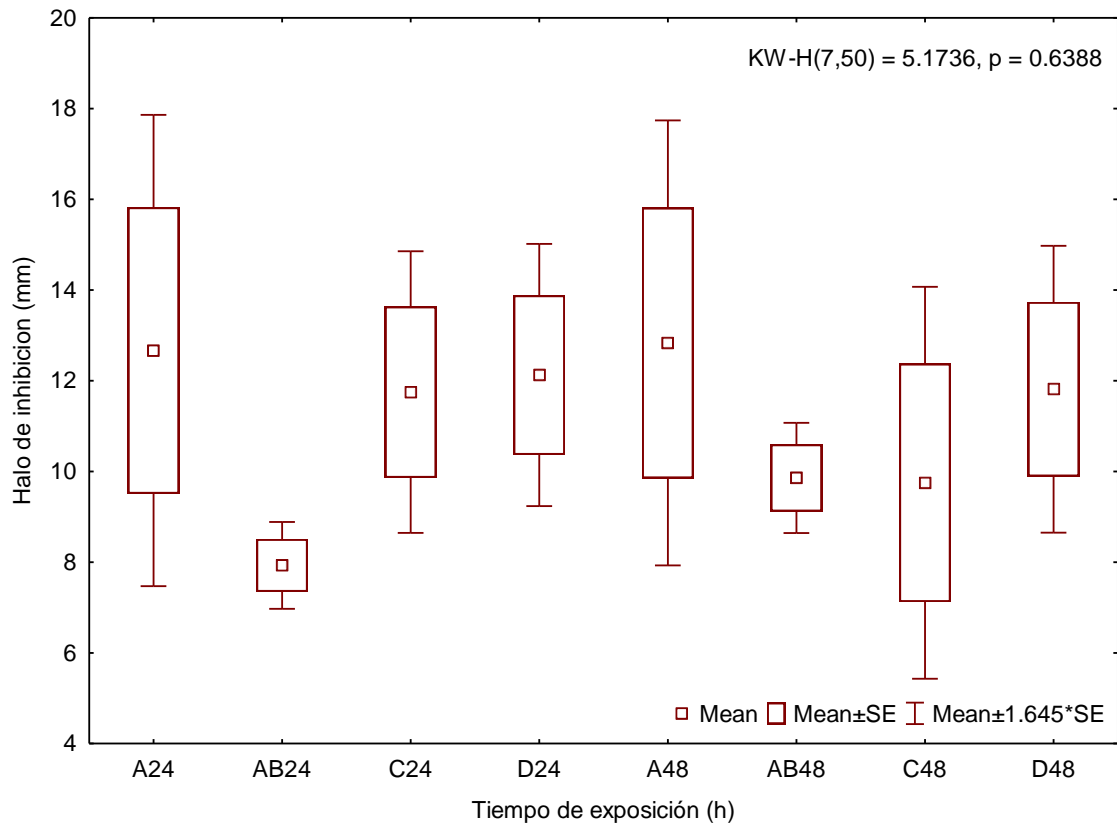


Figura 19. Efecto del extracto de orégano *L. berlandieri* contra *A. hydrophila*. KW-H (Pruebas de Kruskal Wallis).

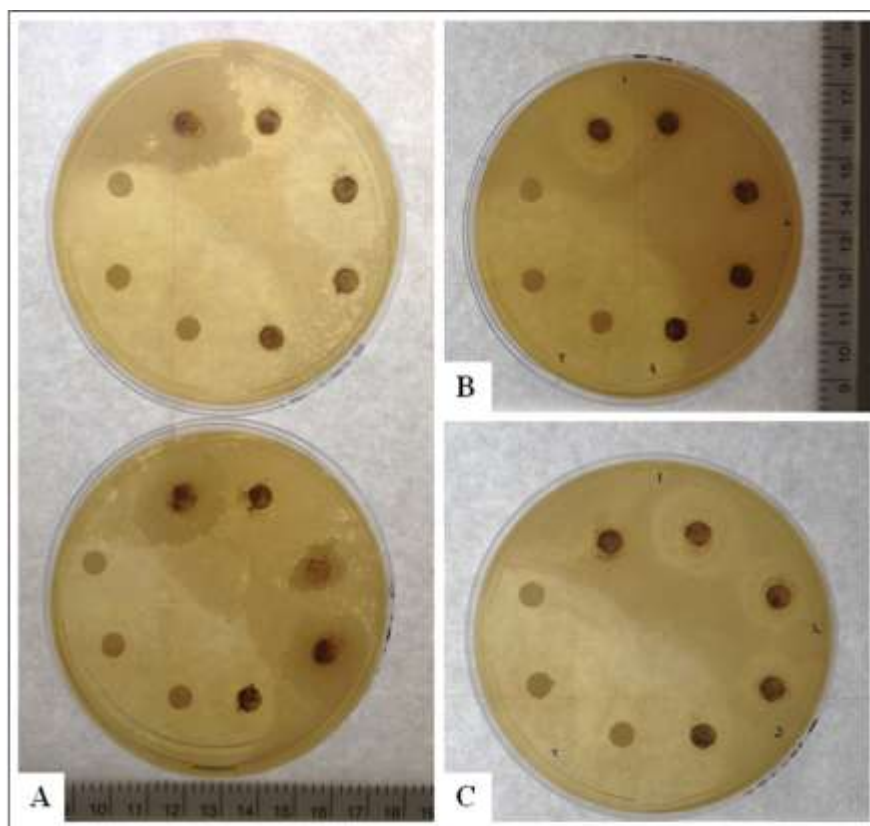


Figura 20. Inhibición de *A. hydrophila* al aplicar el orégano *L. berlandieri* (A, B, C).

En esta fase se determinó la CMI con la combinación del probiótico *E. faecium* (extracto del fruto pozol) con los extractos de nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri*. Para éste análisis se evaluaron tres concentraciones del fermentado; cepa con 2.8×10^2 UFC mL⁻¹, 2.0×10^2 UFC mL⁻¹ y 1.0×10^3 UFC mL⁻¹, los cuales se combinaron con los extractos de nopal, sábila y orégano contra una concentración 9.6×10^2 UFC mL⁻¹ de *A. hydrophila*. Como resultados se obtuvo que el extracto de sábila en combinación con *E. faecium* a una concentración de 2.8×10^2 UFC mL⁻¹ mostró un mayor halo de inhibición en comparación con las concentraciones 2.0×10^2 UFC mL⁻¹ y 1.0×10^3 UFC mL⁻¹; en relación al tiempo de exposición, se tiene que durante las primeras 24 y 48 h la calidad del fermentado es eficiente. Sábila es un excelente extracto para la inhibición de *A. hydrophila* en comparación con el extracto de orégano. El análisis de extracto de nopal en combinación con *E. faecium* no mostró crecimiento e inhibición del patógeno. Por su parte, la combinación del extracto de orégano y *E. faecium* mostró que la concentración de 2×10^2 UFC mL⁻¹ presentó un crecimiento mayor que la concentración 2.8×10^2 UFC mL⁻¹ y 1.0×10^3 UFC mL⁻¹ (Figura 21, 22).

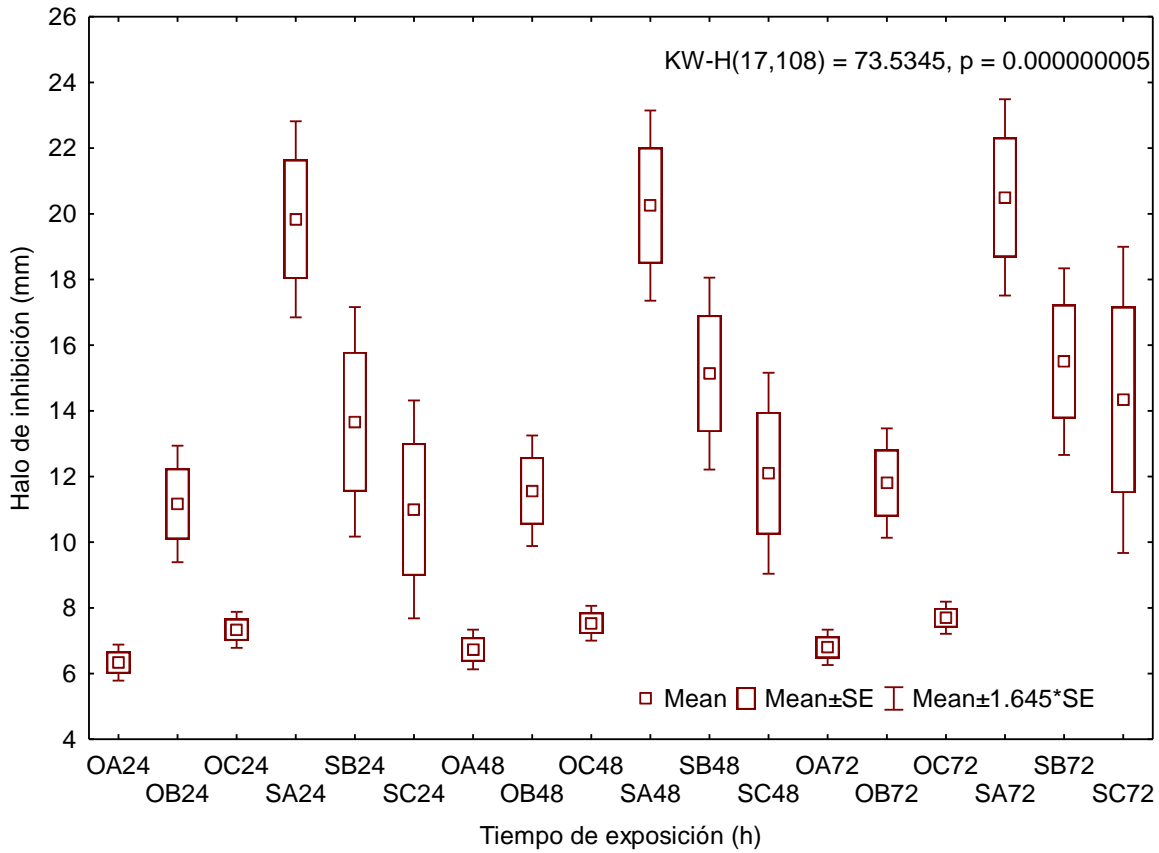


Figura 21. Efecto del extracto de oregano *L. berlandieri* y sábila *Aloe vera* contra *A. hydrophila*. KW-H (Pruebas de Kruskal Wallis).

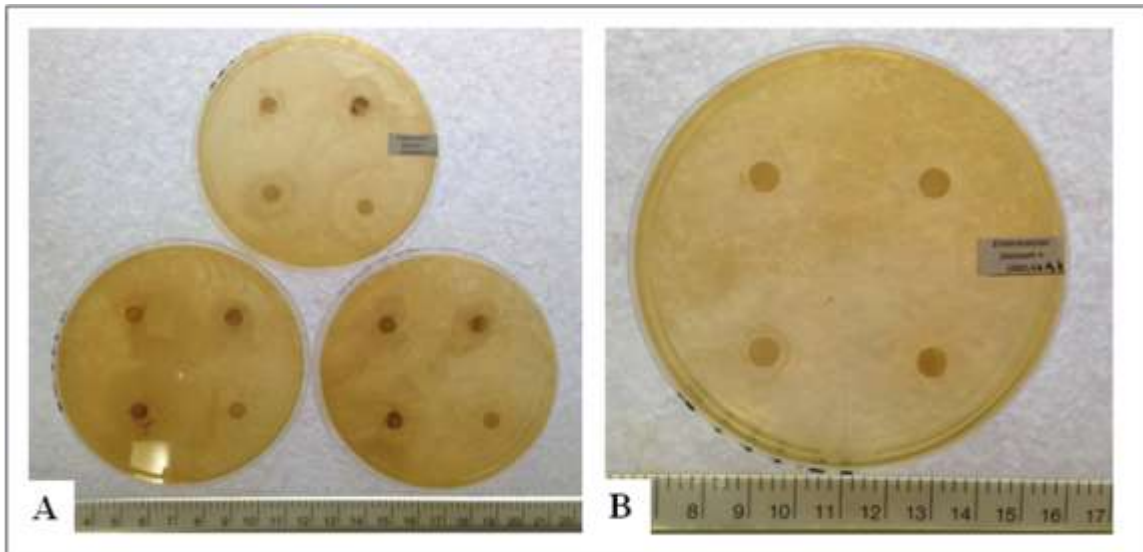


Figura 22. Inhibición de *A. hydrophila* al aplicar *L. berlandieri* y *Aloe vera*.

Por su parte, el probiótico de *Bacillus subtilis* se evaluó a concentraciones de 1.2×10^2 , 2.0×10^2 y 1.0×10^3 UFC mL⁻¹, y se representaron por las claves A, B y C. La concentración de bacterias *A. hydrophila* fue 6.2×10^6 UFC mL⁻¹. Como resultado se obtuvo que la combinación del extracto de nopal a una concentración de A y B con *B. subtilis* mostró halos inhibición de 20.0 ± 2.0 mm. El nopal se considera un excelente extracto en combinación con *Bacillus subtilis* (extracto de alfalfa) en comparación con el extracto de orégano y sábila (Figura 23). El nopal, como fuente de alimento, contiene minerales, proteínas, fibra dietética y fitoquímicos, lo que describe su poder antimicrobiano (Bensadón *et al.*, 2010) (Figura 24). Coincidiendo con Felker *et al.* (2006), el nopal se usa como forraje de ganado en diversos países incluyendo México, su principal aporte es reducir los trastornos digestivos de los animales. Los resultados del presente trabajo demostraron que cuando la planta se fermenta en estado sólido es capaz de producir proteínas microbianas por la degradación de la glucosa que se encuentra en la planta, estimulando el crecimiento de microorganismos en el sustrato con una fuente de azúcares (medio dzapec). Autores como Oliveira (2001) y Araujo *et al.* (2005) evaluaron la combinación de *Aspergillus niger* (hongo de vegetales) y *Saccharomyces cerevisiae*, y encontraron que la cantidad de proteína cruda (12.8%-26%) es un suplemento para la alimentación animal. En este trabajo, se ocupó el extracto de nopal como una fuente sólida para el crecimiento de células microbianas; lo anterior contrastó con lo reportado por Pandey *et al.* (2001) y Sato y Sudo (1999). En contraste con Sierra (2008) *Bacillus* produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, que el organismo emplea como fuente de energía, además de que crecen en medios sintéticos con contenido de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes. *Bacillus* poseen capacidad de movimiento y velocidad de crecimiento, por lo que su reconocimiento es fácil en pruebas de catalasa. La cepa de *Bacillus subtilis* se obtiene de la planta de alfalfa, de acuerdo con Velázquez *et al.* (2008), Reva *et al.* (2002), Benedezi *et al.* (2008), Calvo *et al.* (2008), Trivedi *et al.* (2007) y Rojas *et al.* (2008) *B. subtilis* se aísla de la rizosfera y tejidos internos de los cultivos de caña de azúcar, algodón, trigo, maíz, papa y arroz, esta bacteria promueve el crecimiento vegetal y el control biológico contra patógenos, por lo tanto se considera una planta alimentaria, forrajera y medicinal por su potencial antifúngico.

En los trabajos de Villas-Boas y Esposito (2000) señalaron que el uso de nopal aumenta la nutrición de proteínas microbianas de fosfato, potasio y calcio. Por su parte la especie de

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva que se encuentra distribuida en el suelo, sin embargo, no muestra toxicidad en los vertebrados. Estas bacterias poseen un efecto de acción bactericida y fungicida, y su principal uso se da en el sector agrícola como un excelente pesticida en plantas.

En la acuicultura, *Bacillus subtilis* se ha evaluado para comprobar el crecimiento de tilapia *O. niloticus* y langostino *Macrobrachium rosenbergii*; por lo que Günther y Jiménez-Montealegre (2004) determinaron que el producto Aquabiotic (Loveland Industries Ltd, USA), compuesto de 0.1% *B. subtilis*, 5×10^8 CFU g⁻¹ y 99.9% maltrina, al ser aplicado en el alimento no mostró valor significativo, por lo anterior reportaron que la adición de la bacteria afectó negativamente los procesos digestivos de los organismos debido al cambio en la dieta. Sin embargo, esta bacteria es capaz de producir enzimas, proteasas y amilasas, que mejoran el crecimiento en los animales, como se reportó en el sector pecuario. Por su parte Liu *et al.* (2012) demostraron que *Bacillus subtilis* E20 (10^8 CFU g⁻¹), como suplemento alimenticio, puede reducir la mortalidad de grupos de *Epinephelus coioides* infectados por iridovirus. La EPA (2010) (*Environmental Protection Agency*) propuso a que se realicen investigaciones utilizando la bacteria *Bacillus subtilis* en organismos acuáticos. *Bacillus subtilis* en el sector agrícola es considerada una bacteria promotora de crecimiento vegetal. Su uso como biofertilizante provoca el desarrollo en la estructura de la raíz mejorando la absorción de nutrientes, calidad de la fruta y control biológico, coincidiendo con lo reportado por Karakurt y Aslantas (2010) y Sharma *et al.* (2009). Los resultados demostraron que la combinación de *B. subtilis* y nopal, en pruebas *in vitro*, logró expandirse en la superficie del medio, evitando el crecimiento *A. hydrophila*. Comparando con León (2001) y Ahemad y Saghir (2010) *B. subtilis* compete por nutrientes y espacio evitando el desarrollo y el crecimiento del patógeno. Otros extractos y/o plantas han sido incorporados a la dieta, como lo reportado por Punitha *et al.* (2008) quienes evaluaron cinco tipos de plantas de las especies de *Cynodon dactylon*, *Piper longum*, *Phyllanthus niruri*, *Tridax procumbens* y *Zingiber officinalis* contra la infección de *Vibrio harveyi* en peces juveniles de *Epinephelus tauvina* y encontraron que el uso de plantas mejoró los mecanismos de defensa inespecífica, y la respiración intra y extra celular. Por su parte, Abasali y Mohamad (2010) determinaron que la incorporación de extractos de *Ocimum basilicum*, *Cinnamomun zeylanicum*, *Junglas regia* y *Mentha piperia* con concentraciones de 1250 mg kg⁻¹ contra *Aeromonas hydrophila* (1×10^8 UFC

por pez) mejoró la inmunidad no específica, incrementó la resistencia contra la infección y la supervivencia de *Cyprinus carpio* (91.4%). Sankar *et al.* (2011) demostraron que el uso de *Ricinus communis* en larvas *Penaeus monodon* (0.0012 ± 0.001 mg) incremento la supervivencia (94%) y mejoró la resistencia contra *Vibrios*. Asimismo, Kasiri *et al.* (2011) mencionaron que la aplicación de extractos de la especie *Echinacea purpurea* incrementó el crecimiento y el comportamiento reproductivo durante las primeras etapas larvales de *Pterophyllum scalare*. Entre los estudios actuales, se cita a Park and Choi (2014), quienes encontraron que el uso del extracto de *Prunella vulgaris* labiatae induce la respuesta inmune específica y no específica de los peces, por lo que se podría utilizar como un suplemento en la dieta. Asimismo se destaca el uso de probióticos, los cuales se componen comúnmente de bacterias ácido lácticas, cepas *Vibrios* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* y hongos unicelulares, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Venkat *et al.*, 2004; Addel-Tawwab *et al.*, 2008).

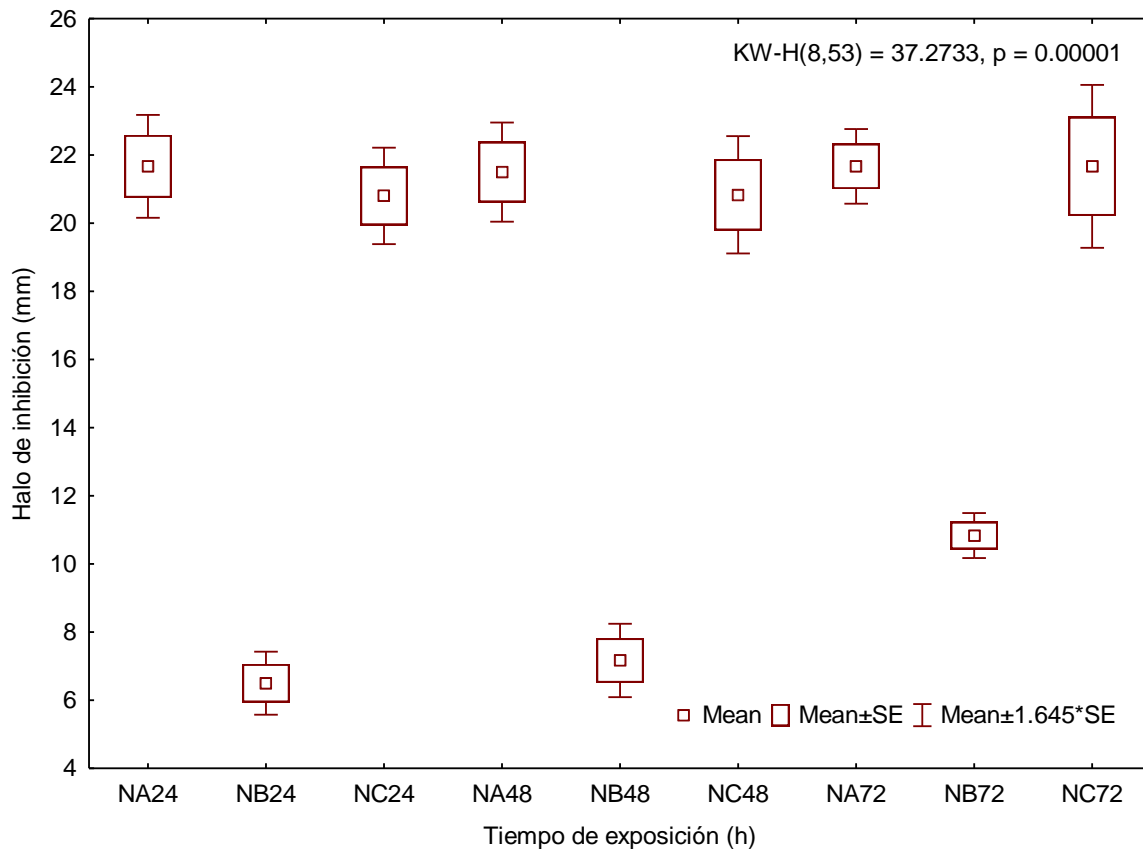


Figura 23. Efecto del extracto de nopal *Opuntia ficus indica* contra *A. hydrophila*. KW-H (Pruebas de Kruskal Wallis).

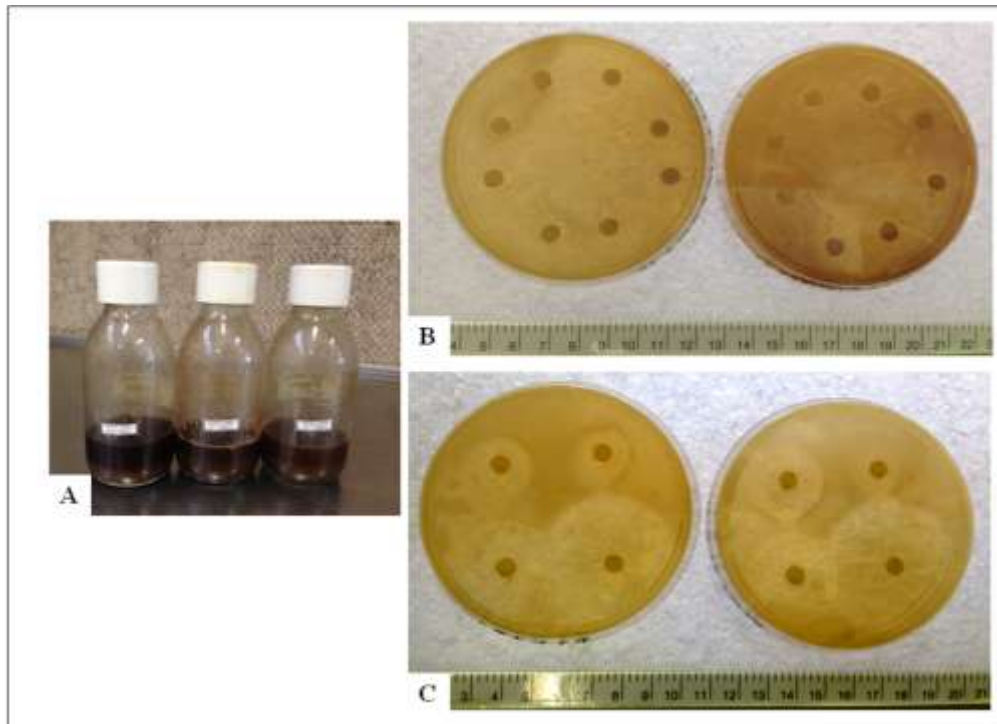


Figura 24. Frascos con extracto de orégano *L. berlandieri* y *B. subtilis* (A). Inhibición del *A. hydrophila*, al aplicar *Opuntia ficus* (B, C).

Para la evaluación del extracto de nopal *Opuntia ficus indica*, sábila *Aloe vera* y orégano *Lippia berlandieri* en combinación con el probiótico *Lactobacillus plantarum* contra el *A. hydrophila* a una concentración de 6.2×10^6 ; se emplearon las concentraciones de *L. plantarum* 2.8×10^2 , 2.0×10^2 y 1.0×10^3 , las cuales se representaron como A, B y C. Como resultado se mostró que el extracto de nopal y sábila en combinación con *L. plantarum* presentó inhibición contra el patógeno, en comparación con el extracto de orégano. Sin embargo, la combinación del probiótico con el orégano presentó inhibición en relación al tiempo de incubación, es decir, a las 72 h el halo de inhibición fue de 5.0 ± 0.1 mm (Figura 25, 26). Por lo tanto, no hubo diferencia significativa en relación a las horas de incubación del fermentado, pero sí se encontraron diferencias significativas entre cada tipo de fermentado, siendo sábila y nopal una excelente fuente sólida para el crecimiento de bacterias lácticas, lo cual coincide con lo encontrado por Araujo *et al.* (2005) y Pandey *et al.* (2001) quienes indicaron que el nopal en estado sólido es un fermentador capaz de activar el crecimiento de células microbianas por su contenido de fosfatos y potasio, lo cual lo hace una excelente alternativa que podría competir con otras fuentes de carbono. *L. plantarum* se utiliza en la alimentación de *O. niloticus*. Essa *et al.* (2010) señalaron

que el uso de esta bacteria incorporada a la dieta por bio-encapsulación, mejoró la composición bioquímica de la especie principalmente el contenido proteico, de acuerdo con lo reportado por Lara-Flores *et al.* (2010), Merrifield *et al.* (2009), Seenivasan *et al.* (2012) y Saad *et al.* (2009) el uso de bacterias y hongos, *L. acidophilus*, *L. sporogenes* y Biogen®, *Enterococcus faecium*, *Bacillus* spp y *S. cerevisiae* NIOFD019. *L. plantarum* es una bacteria común en diversos nichos ecológicos y tracto digestivo en humanos y otros mamíferos. Coincidiendo con este estudio, los resultados reportados por Chiu-Hsia *et al.* (2007) indicaron que cuando los camarones *L. vannamei* alimentados con dietas con *L. plantarum* a concentraciones de 10^7 y 10^{10} CFU (kg de dieta) durante 48 y 168 h promueven la actividad de la fenoloxidasa y la actividad de superóxido dismutasa, además eliminan a *Vibrio alginolyticus*, ésta última se relaciona por la modulación inmune y aumento de la capacidad inmune de *L. vannamei* y aumento de resistencia por la disminución significativa de hemocitos alimentados con *L. plantarum*. Comparando con Talpur *et al.* (2012) la mezcla de *L. plantarum*, *L. salovarius* y *L. rhamnosus* mejoró la supervivencia de la jaiba azul *P. pelagicus*. Kongnum y Hongpattarakere (2011) aislaron 200 bacterias ácido lácticas y determinaron que *L. plantarum* mantuvo un crecimiento exponencial de 5,29 a 9,47 log CFU ml leq^{-1} en pruebas *in vitro*. Por su parte, en pruebas *in vivo* evaluaron la adición de *L. plantarum* en la alimentación de *L. vannamei* obteniéndose diferencias significativas ($p < 0.05$) en relación a su crecimiento y supervivencia. Los resultados del estudio comprobaron la competencia por sitios de adhesión de la bacteria probiótica y la patógena. *L. plantarum* se puede considerar, de acuerdo con Viera *et al.* (2007), un excelente inmunoestimulante debido al aumento de la actividad contra *V. harveyi* en camarones *L. vannamei*. Por su parte, Pirarat *et al.* (2011) mencionaron que la aplicación de bacterias ácido lácticas de *Lactobacillus rhamnosus* GG en organismos de 30-50 g en *Oreochromis niloticus* permitió el crecimiento de vellosidades en todas las partes del intestino, principalmente en la parte proximal e intestino medio; además indicaron que la población de linfocitos intraepiteliales fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. Esta bacteria se caracteriza por ser un regulador del sistema inmune del intestino. Lo anterior se compara con Suchanit *et al.* (2010) quienes mencionan que el patógeno de *Aeromonas hydrophila* es desafiado con el uso de inmunoestimulantes, principalmente glucano (1%) y *Lactobacillus rhamnosus* (1×10^{10} CFU g^{-1}) ambos tratamientos tuvieron la capacidad de reducir el daño intestinal por la bacteria.

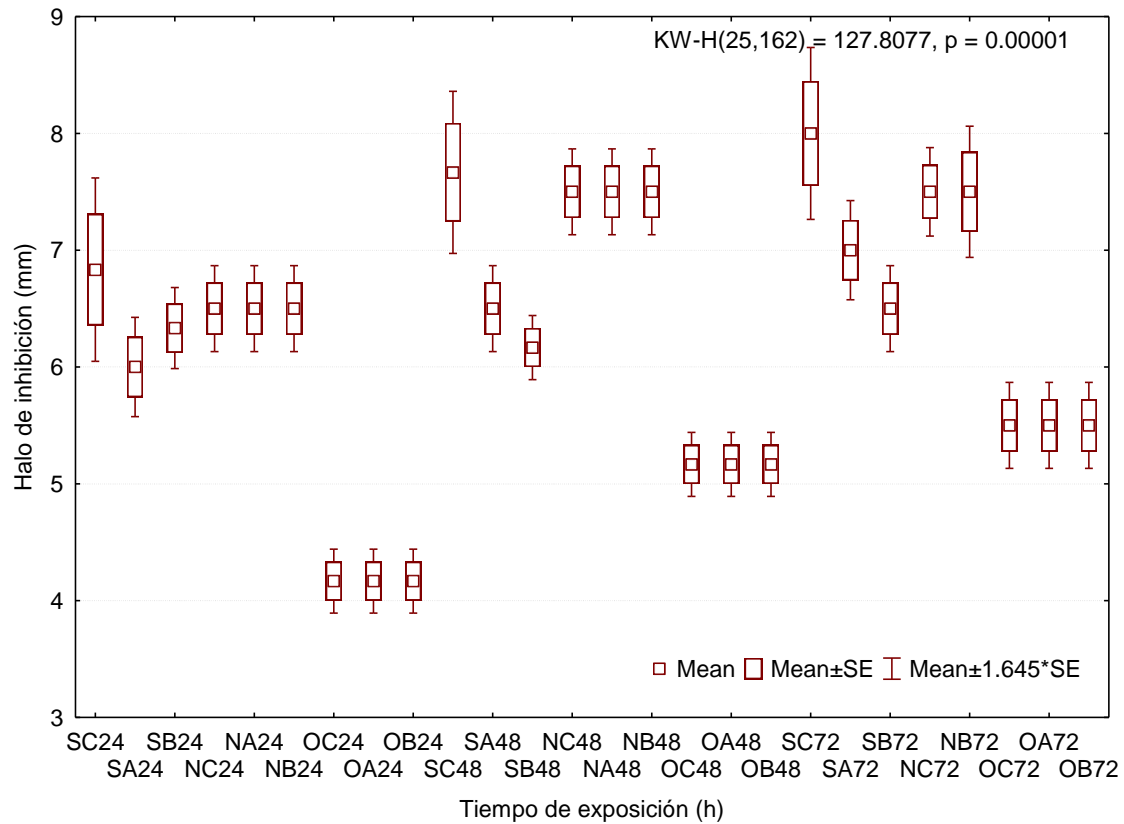


Figura 25. Efecto del extracto de nopal *O. ficus*, sábila *A. vera* y orégano *L. berlandieri* contra *A. hydrophila*. KW-H (Pruebas de Kruskal Wallis).

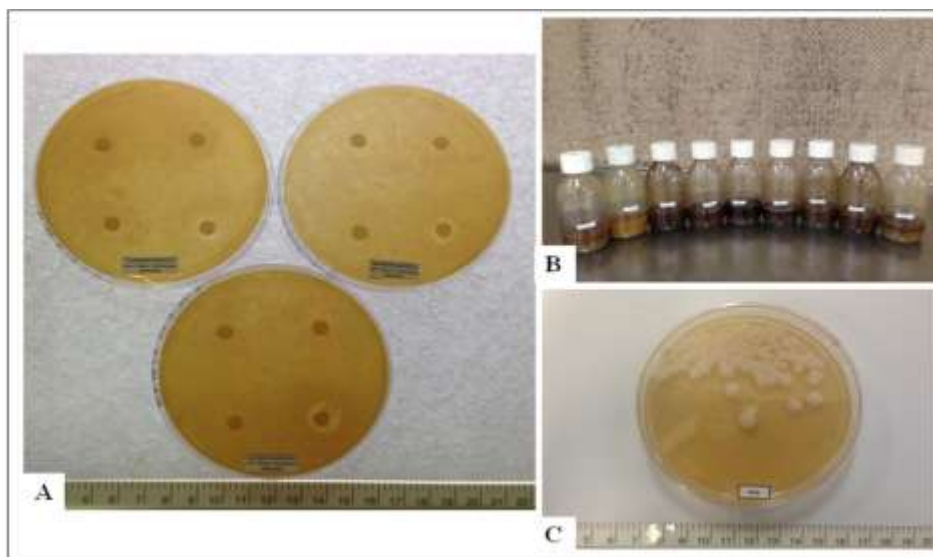


Figura 26. Inhibición de *A. hydrophila* (A). Frascos con extractos de orégano, nopal y sábila en combinación con *L. plantarum* (B). Crecimiento de colonias probióticas de maíz *L. plantarum* (C).

Cuadro 6. Relación de las combinaciones entre el probiótico, patógeno y extractos naturales.

Probiótico	Concentración Probiótico	Concentración <i>A. hydrophila</i>	Extracto	C	Resultado
Suero de leche <i>Enterococcus faecium</i>	9.0x10 ² UFC mL ⁻¹	2.0x10 ⁸ UFC mL ⁻¹	S/E	2	Inhibición de <i>A. hydrophila</i>
	3.5x10 ³ UFC mL ⁻¹				
Suero de leche <i>Enterococcus faecium</i>	9.0x10 ² UFC mL ⁻¹	2.0x10 ⁸ UFC mL ⁻¹	Orégano Sábila Nopal	6	Orégano y nopal excelente inhibidor.
	3.5x10 ³ UFC mL ⁻¹	2.0x10 ⁸ UFC mL ⁻¹			
Suero de leche <i>Lactobacillus acidophilus</i>	3.24x10 ³ UFC mL ⁻¹	1.28x10 ³ UFC mL ⁻¹	Orégano Sábila Nopal	12	Orégano
	1.0x10 ⁴ UFC mL ⁻¹	1.20x10 ⁴ UFC mL ⁻¹			
	32.4x10 ⁵ UFC mL ⁻¹	1.28x10 ³ UFC mL ⁻¹			
	1.0x10 ⁴ UFC mL ⁻¹	1.20x10 ⁴ UFC mL ⁻¹			
Pozol <i>Enterococcus faecium</i>	2.8x10 ² UFC mL ⁻¹	9.6x10 ² UFC mL ⁻¹	Orégano Sábila Nopal	9	Orégano y sábila
	2.0x10 ² UFC mL ⁻¹	9.6x10 ² UFC mL ⁻¹			
	1.0x10 ³ UFC mL ⁻¹	9.6x10 ² UFC mL ⁻¹			
Alfalfa <i>Bacillus subtilis</i>	1.2x10 ² UFC mL ⁻¹	6.2x10 ⁶ UFC mL ⁻¹	Orégano Sábila Nopal	9	Crecimiento lento, El nopal presentó inhibición contra <i>A. h.</i>
	2.0x10 ² UFC mL ⁻¹	6.2x10 ⁶ UFC mL ⁻¹			
	1.0x10 ³ UFC mL ⁻¹	6.2x10 ⁶ UFC mL ⁻¹			
Maíz <i>Lactobacillus plantarum</i>	2.8x10 ² UFC mL ⁻¹	6.2x10 ⁶ UFC mL ⁻¹	Orégano Sábila Nopal	9	Crecimiento lento para las tres combinaciones.
	2.0x10 ² UFC mL ⁻¹	6.2x10 ⁶ UFC mL ⁻¹			
	1.0x10 ³ UFC mL ⁻¹	6.2x10 ⁶ UFC mL ⁻¹			

C: Combinaciones. S/E: Sin extracto.

Las combinaciones fueron por duplicado y testigo.

7.6 Contrastación de hipótesis

Con base en los resultados anteriores, se concluye que no se encontraron evidencias suficientes para **RECHAZAR** la hipótesis. Los resultados demuestran que se encontró la presencia de diversos patógenos causantes del **50% de mortalidad** en tilapia, entre estos *A. hydrophila*. Asimismo, la aplicación *in vitro* de la combinación de extractos naturales (**orégano, nopal y sábila**) con probióticos de *E. faecium*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. subtilis*, a diferentes concentraciones y tiempo de exposición, **provocó la inhibición** de *A. hydrophila*, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$).

8. CONCLUSIONES

La aparición de enfermedades se debe principalmente a diversos factores que actúan individual o conjuntamente en un cultivo acuícola, por lo tanto, se considera necesaria la implementación de estrategias para el manejo óptimo en los cultivos, con el objetivo de alcanzar una producción sustentable bajo los programas de seguridad y buenas prácticas de manejo, así como también la alternativa de vacunación efectiva como tratamiento preventivo y correctivo, a partir de productos amigables para el cultivo y el ser humano. Lo anterior, con la finalidad de evitar pérdidas directas e indirectas, y asegurar la producción y el éxito de los cultivos de *Oreochromis niloticus*.

La importancia de este trabajo de investigación radica en que se aplicó y evaluó la fitoterapia o medicina tradicional en el sector productivo, principalmente en la actividad acuícola, como una alternativa para reducir o eliminar el uso excesivo de principios químicos por principios activos naturales de plantas con potencial farmacológico. Además de ocuparse como sustrato para el crecimiento de bacterias, es capaz de reaccionar efectivamente con organismos acuícolas de forma inofensiva para las especies en cultivo y para el consumidor final. En el presente estudio, se observó que la combinación de probióticos de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* con extractos de orégano y nopal, evitan el crecimiento de patógenos.

El uso de probióticos, en combinación con extractos de plantas, en ese caso plantas que han sido utilizadas para el sector pecuario y agrícola, es una excelente alternativa para eliminar o disminuir la presencia de bacterias patógenas en los sistemas de producción acuícola. Lo anterior permitirá obtener un producto sustentable con el ambiente. El nopal, orégano y la sábila son plantas que poseen características nutricionales efectivas para el ser humano, y por ende su aplicación en el sector agropecuario es una opción para mejorar la calidad del agua, disminuir la presencia de patógenos, así como mejora el tracto digestivo, lo cual permitirá la mejor absorción de los nutrientes del alimento, ocasionando de forma directa el crecimiento y la supervivencia del los organismos.

También, es interesante resaltar el valor comercial de los productos naturales empleados en el presente trabajo, los cuales se dirigen a productos que se cultivan y se producen en el país,

permitiendo el aporte económico en el sector agrícola, a partir de nuevas formas de aplicación y valor agregado a su producción.

Por el momento, la información sobre pérdidas por brotes de enfermedades en *O. niloticus* es nula, sin embargo, existen diversas enfermedades patógenas que se ofertan desde el momento de la eclosión del organismo hasta su edad adulta, lo anterior dependerá de las condiciones que favorezcan los brotes epidémicos y la respuesta inmune del organismo cuando se presenta una infección emergente, es por esta razón, que la mejor respuesta de defensa es mantener el equilibrio del patógeno, hospedero y el medio ambiente en los agroecosistemas acuícolas, con ayuda de grupos multidisciplinarios con un enfoque en las materias veterinarias, epidemiológicas y biológicas.

9. LITERATURA CITADA

- Abasali, H., Sudagar M. 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulant diets. *Agricultural Journal* 5: 163-172.
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A., Ismael, N. E. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a growth and immunity promoter for fry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 280: 185-189.
- Aguilar-Cristóbal, N., Rodríguez-Herrera, R., Saucedo-Pompa, S., Jasso-Cantú, D. 2004. "Fitoquímicos sobresalientes del semidesierto mexicano" de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología. Proyecto CONAFOR-CONACYT-2004-C01-13. ISBN 978-968-6628-760.
- Aguilar, B. G. y Peña, V.C. 2006. Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal (*Opuntia ficus indica*). *Revista Fitotecnica. Mexicana* 29:231-237.
- Aguilar, C. N., Rodríguez, H. R., Saucedo, P. S., Jasso, C. D. 2008. Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto Mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología. Ed. Path Design Saltillo, Coahuila, México. 579 p.
- Aguirre-Cárdenas, M., García-Delgado, P.; González-González, R.; Jofre- Garfias, A. L.; Legorreta-Siañez, A.V. y Buenrostro-Zagal, J. F. 2011. Desarrollo y evaluación de una película comestible obtenida del mucílago del nopal (*Opuntia ficus indica*) utilizada para reducir la tasa de respiración de nopal verdura. *In: VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Lima, Perú* 23 al 26 de octubre. 1-5. pp.
- Ahemad, M y Saghir, M. 2010. Plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* as influences by fungicides. *EurAsian Journal of Biosciencias* 4(11): 88-95.
- Ahilan, B., Shine, G., Santhanam, R. 2004. Influence of Probiotics on the Growth and Gut Microbial Load of Juvenile Goldfish (*Carassius auratus*). *Asian Fisheries Science* 17: 271-278.
- Al-Dohail, A.M., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Reserch* 40: 1642-1652.
- Al-Harbi, A. H. 2003. Feacal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* in Saudi Arabia. *Aquat. Res.* 34,517-524.
- Al-Harbi, A., N. Uddin. 2005. Bacterial diversity of tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250: 566-572.

- Al-Harbi, A., Uddin, M. N. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture* 229:37-44.
- Altieri, M. 1995. *Agroecology: the Science of Sustainable Agriculture*. Boulder: Westview Press.
- Anderson, D.P, Siwicki, A.K. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucano or chitosan by injection or immersion. *Progress of Fish Culturist* 56:258-261.
- Angulo-Carrera, A., Flores-Jaramillo, D.A., Tejeida de Camilo, J., Ocampo-Velázquez, R. 2005. Orégano: oro verde del semidesierto. En López, C., Chanfón, S., Segura, G. (ed.), *La riqueza de los bosques mexicanos más allá de la madera: experiencias de comunidades rurales*. SEMARNAT. México. 60-65 pp.
- Apún-Molina, J.P. 2007. Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivada en el laboratorio. Tesis de Maestría CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. 60 pp.
- Araújo, L. F., Nuñez, A., Perazzo, A., De Sousa, L., Da Silva, F. L. 2005. Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus - indica* Mill.) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. *Brazilian Archives Biology and Technology* 48:161-168.
- Ashley, P. J. 2007 *Fish welfare: Current issues in Aquaculture*. *Applied Animal Behaviour Science* 104: 199-235.
- Austin, B., Austin, D.A. 2007. *Aeromonadaceae Representatives (Motile Aeromonads) Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, 119-146.
- Ávila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M.G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G. V. 2008. Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-008-0085-7.
- Aymerich, T., Artigas, M. G., Garriga, M., Monfort, J. M., Hugas, M. 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal Applied Microbiology* 88:686-694.
- Balcázar, J. L., Blas, I.D., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114:173-186.
- Becht, G. 1974. Systems theory, the key to holism and reductionism. *Bioscience* 24(10): 579-596.
- Beneduzi, A., Peres, D., Beschoren Costa, P., Bodanese, M. H., Pereira, L.M. 2008. Genetic and phenotypic diversity of plantgrowth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology* 159:244-50.

- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S.G., Goñi, I. 2010. By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods for Humans Nutrition* 65:210-216.
- Bentalanffy, V. L. 1976. *Teoría General de los Sistemas*. Editorial Fondo de Cultura Económica. México.
- Bondad-Reantaso, G., Subasinghe, R.P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z and Shariff, M. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*. 132:249-272.
- Bravo, S., Dolz, H., Silva, M-T., Lagos, C., Millanao, A y Urbina, M. 2005. Informe Final. 2005. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura. Casilla 1327. Puerto Montt, Chile. Proyecto No. 2003-28.
- Bricknell, I., and Dalmo, R. A. 2005. The use of inmunoestimulants in fish larva Aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 457-472.
- Burr, S.E., Goldschmidt-Clermont, E., Kuhnert, P and Frey, J. 2012. Heterogeneity of *Aeromonas* populations in wild and farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal Fishes Disease* 35: 607-613.
- Cabello, F. C. 2003. Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. *Fundación Terram*. (17): 1-16 pp.
- Cabello, F. C. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: Consecuencias para la salud humana y animal. *Rev Méd Chile* 132: 1001-1006.
- Calvo, P., Reymundo, L., Zúñiga, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7(1,2):141-48.
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiológicas clínicas* 27(1):44-52.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., Cuca, L.E. 2008. Extractos Vegetales Utilizados como Biocontroladores con Énfasis en la Familia Piperaceae. Una revisión. *Revista de Agronomía Colombiana* 26(1): 97-106.
- Chang, C., Liu, W. 2000. An evaluation of two probiotic bacterial strain, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing Edwardsiellosis in cultures European ell, *Anguilla anguilla* L. *Journal of fish Diseases* 25: 311-315.
- Chiu-Hsia C., Yuan-Kuang, G., Chun-Hung, L., Tzu-Ming, P., Winton, C. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum* *Fish & Shellfish Immunology* 23: 364e377.

- Clavijo, A.M., Conroy, G., Conroy, D.A., Santander, J., Aponte, F. 2002. First report of *Edwardsiella tarda* from tilapias in Venezuela. Bull. Eur. Ass. Fish Pathology 22(4):280-282.
- Colquhoun, D., Duodu, S. 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organism. Veterinary Research 42:47.
- Conroy, G. 2014. Enfermedades de tilapia más frecuentes en America Latina y el Caribe. 9° Foro Internacional de Acuicultura. Word Aquaculture Society 2014.
- Contreras-Pinzón, M. E., Domínguez-Espinosa, R.M., González-Burgos, A. 2007. Proceso de biotransformación láctica del jugo de *Aloe vera*. Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ) 22(14):1-2.
- Conway, R.E. 1987. The propertier of agroecosystem. Agric. Systems. 24:95.
- Conway, R.G. 1985. Agroecosystem Analysis. Journal Agricultural Administration 20: 31-55.
- Dange, E., Bisrat, D., Viljoen, A., Van, W.B.E. 2000. Chemistry of Aloe Species. Curr Organic Chem 4:1055-1078.
- Davies, A. J. 1886. A Rickettsia-like organism from Dragonets, *Callionymus lyra* L. (Teleostei: Callionymidae) in Wales. Bull Eur Assoc. Fish Pathology 6:103-104.
- Dehasque, M., Assche, J.V y Devresse, B. 1999. Evaluación de los efectos de la administración oral de inmunoestimulantes en las enfermedades de especies para acuicultura. In. Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D. y Mendoza Alfaro, R. Editores. Avances en Nutrición acuícola III. Memorias del tercer simposio internacional de nutrición y tecnología de alimentos. 1999. 11-13 Noviembre, 1996. Monterrey, N. L., México ISBN 968-7808-62-4. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. México 403-422 pp.
- Dent, J.B., Blackie, M. 1979. Systems simulation in Agriculture. L.T.D. London. Applied Science Publisher. 180 pp.
- Dillon, J.L. 1976. The economics of systems research. Agricultural Systems 1:15-22.
- Doñate, C., Balasch, J.C., Callol, A., Bobe, J., Tort, L & MacKenzie, S. 2010. The effects of immunostimulation through dietary manipulation in the rainbow trout; evaluation of mucosal immunity. Marine biotechnology 12 (1) 88-99.
- Donta, S. T., Haddow, A.P. 1978. Cytotoxic activity of *Aeromonas hydrophila*. Infection Immune 21: 989-993.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A., Bercovier, H. 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. Veterinary Microbiology 43:33-40.
- EPA. (US. Environmental Protection Agency). 2000. Biopesticide registration action document: *Bacillus subtilis*. 10 p.
- Essa, M.A., EL-Serafy, S.S., El-Ezabi, M.M., Daboor, S.M., Esmael, N.A and Lal, S.P. 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes

- activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the Arabian Aquaculture Society 5(2): 51-56.
- Faktorovich, K.Z. 1969. Histological changes in the liver, kidneys, skin and brain of fish sick with red rot. In: K.A Faktorovich (Ed), infections Diseases of fish and their control, División of Fisheries research, Bureau os Sport Fisheries and Wildlife Washington, D.C. 83-101.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: contribución a la seguridad alimentaria y nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO. 2002. Estado mundial de la pesca y acuicultura. [En línea] URL: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s04.htm#k>. (Consulta 17.04.2017).
- FAO. 2008. World Review of Fisheries and Aquaculture. In: The State of the World Fisheries and Aquaculture-2008 (SOFIA). Roma, 2009. pp. 3-84: 58-65. [En línea] URL: <http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm>. (Consulta 17.02.2017)
- FAO. 2010. World Review of Fisheries and Aquaculture. In: The State of the World Fisheries and Aquaculture de la FAO. Roma. pp 197: 18-30. [En línea] URL: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>. (Consulta 17.02.2017)
- Felker, P., Paterson, A., Jenderek-Felker, M.M. 2006. Forage potential of *Opuntia* clones maintained by the USDA, National Plant Germoplasm System (NPGS) Collection. Crop Science 46:2161-2168.
- Figueiredo, H.P.C., Carneiro, D.O., Faria, F.C and Costa, G.M. 2006. *Streptococcus agalactiae* asociado a meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* no Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 58: 678-680.
- Flores-Quintana, C. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. Revista de Ictiología. 10 (1/2):57-78.
- Forbes, B. A., Sahm, D.F., Weissfeld, A. S. 2002. Diagnostic Microbiology. ED. Bailey & Scott's. 11th. ed. St. Louis, Missouri. Mosby.
- Fukuda, Y., Okamura, A., Nishiyama, M., Kawakami, H., Kamaishi, T., Yoshinga, T. 2002. Granulomatosis of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum* caused by an intracellular bacterium. Fish Pathology 37:119-124.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66:365-378.
- Gallardo-López, F. 2002. Los agroecosistemas de la Subprovincia Llanura Costera Veracruzana: Una propuesta para la caracterización y el análisis tipológico de la agricultura regional. Tesis de Doctorado en Agroecosistemas Tropicales, Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados.

- Gallardo-López, F., Riestra-Díaz, D., Aluja-Schunemann, A., y Martínez-Dávila, J.P. 2002. Factores que determinan la diversidad agrícola y los propósitos de producción en los agroecosistemas del municipio de Paso de Ovejas, Veracruz, México. *Agrociencia*, 36:495-502.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K. 2010. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: a review. *Isr. J. Aquacult. Bamidgheh* 62: 130–138.
- García, R. 2007. *Sistemas complejos. Conceptos, método y fundamentos epistemológicos de la investigación multidisciplinaria*. Ed. Gedisa, S.A. Buenos Aires. 200 pp.
- Gliesman, S. 2002. *Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Gliesman, S. R. 1990a. Agroecology. Researching the ecological basis for sustainable agriculture. Introduction. In: Gliessman, S.R. (ed). *Agroecology. Researching the ecological basis for sustainable agriculture*. Ecological Studies 78. Springer-Verlag. New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo and Hong. 3-29
- Gliesman, S. R. 1990b. Quantifying the agroecological component of sustainable agriculture: a goal. In: Gliessman, S. R. (ed). *Agroecology. Researching the ecological basis for sustainable agriculture*. Ecological Studies 78. Springer-Verlag. New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo and Hong Kong.: 366-370.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
- González-Rodríguez, C, T., López-Díaz, M., Gracia-López, M., Prieto and Otero, A. 1999. Bacterial microflora of wild trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Protection* 62(11): 1270–1277.
- Gracia-Valenzuela, M.H., Orozco-Medina, C., Molina-Maldonado, C. 2012. Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Hidrobiológica*, 22 (3): 201-206.
- Granados-Sánchez, D., Castañeda-Pérez, A.D. 2003. El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. México, D. F. 227 p.
- Harikrishnan, R and Balasundaram, C. 2005. Modern trends *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Reviews in Fisheries Science* 13:281-320.
- Hart, R. D. 1987. An ecological systems conceptual framework for agricultural research and development. *Readings in FSR and development*. USAID. 50-65pp.
- Hart, R. D. 1985. *Conceptos básicos sobre AES*. Agronómico tropical de investigación y enseñanza. 160 p.

- Hedrick, R. P. 1998. Relationships of the Host, Pathogen, and Environment: Implications for Disease of Cultured and Wild Fish Populations. *Journal of Aquatic Animal Health* 10:107-111.
- Hernandez, E., Figueroa, J., Iregui, C. 2009. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *Journal of Fish Diseases* 32: 247-252.
- Hernandez-Xolocotzi, E. (ed). 1977. Agroecosistemas de México. Contribuciones a la enseñanza, investigación y divulgación agrícola. Chapingo, México: Colegio de Postgraduados.
- Herrera-Sirias, C., Canales-Chamorro, F.J., Martínez-González, E. 2014. Elaboración de probiótico a base de suero de leche de vaca, para combatir infecciones de *Vibrios* sp., en camarones *Litopenaeus vannamei*, de forma experimental. *Revista Científica de la UNAN-León* 5 (2): 52-59.
- Herrscher, E. G. 2003. Pensamiento sistémico. 2a Ed. 267 pp.
- Hoshina, T., Sano, T., Morimoto, Y. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of Tokio University of Fish* 44: 57-58.
- Huicab-Pech, Z.G., Landeros-Sánchez, C., Castañeda-Chávez, M.R., Lango-Reynoso, F., López-Collado, C.J., Platas-Rosado, D.E. 2016. Current State of Bacteria Pathogenicity and their Relationship with Host and Environment in Tilapia *Oreochromis niloticus*. *J Aquac Res Development* 7: 428.
- Jeffery, K. R., Stone, D., Feist, S.W., Verner-Jeffreys, D. 2010. An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. In Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Disease of aquatic organisms* 91: 161-165.
- Johri, A. K., Paoletti, L.C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P.K., Grandi, G., Ruppulli, R. 2006. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nat. Revista Microbiología* 4: 932-942.
- Kamaishi, T., Miwa, S., Goto, E., Matsuyama, T. 2010. Mass mortality of giant abalone (*Haliotis gigantea*) caused by a *Francisella* sp. bacterium. *Diseases Aquatic Organisms* 89:145-154.
- Karakurt, H y Aslantas, R. 2010. Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGRR) strains on plant growth and leaf nutrient content of apple. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18(1): 101-110.
- Kasiri, M., Farahi, A., & Sudagar, M. 2011. Effects of supplemented diets by levamisole and *Echinacea purpurea* extract on growth and reproductive parameters in angelfish (*Pterophyllum scalare*). *AAFL Bioflux*, 4(1), 46-51.
- Kast, F. E and Rosenzweig, J.E. 1981. The modern view: a systems approach. In: *Open Systems Group*. (ed). *Systems behaviour*. 3rd. Edition. Open University Set Book. Chapman Publishing Limited. London.: 44-58.

- Khoo, L., Dennis, P.M., Lewbart, G.A. 1995. Rickettsia-like Organisms in the Blue- Eyed Plecostomus, Panaque Suttoni (Eigenmann and Eigenmann). *Journal Fishes Diseases* 18:157-163.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology* 88: 269-290.
- Kongnum, K., Hongpattarakere, T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology* 32:170e177.
- Kos, B., Suskovic, J., Beganovic, J., Gjuracic, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. 2008. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24:699-707.
- Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L and Olvera-Novoa, M.A. 2010. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 2: 93-101.
- Larsen, J.L., Jensen, N.J. 1977. An *Aeromonas* species implicated in ulcer-disease of the cod (*Gadus morhua*). *Nor disk Veterinaermedicin* 29: 199-211.
- Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology* 201(2):165-168.
- Le Moullac, G., Laborie, L.P., Saulnier, D., Goarant, C y Dehasque, M. 1998. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulans on juvenile shrimp. En: R.C. Cerecedo; B.M. Claudia; J. Pérez-Estrada, L.E. Suarez & M. D. Ricque (eds). *Avances de Nutrición Acuícola. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, La Paz, B. S. C, México 1-12.
- León, D. 2001. Evaluación de la metodología microbiológica y molecular para la detección de *Bacillus subtilis* en microcosmos de suelo. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. México, D.F.
- Li, Y., Cai, S.H. 2011. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on Tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Microbiology* 62:623-627.
- Lilley, D.M., Stillwell, R.J. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-748.
- Lilley, J. H., Hart, D., Richards, R.H., Roberts, R.J., Cerenius, L and Soderhall, K. 1997. Pan-Asian spread of single fungal clone results in large-scale fish kills. *Vet.Record* 140: 653-654.

- Liu, C.H., Chiu, C.H., Wang, S.W., Cheng, W. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunology* 33: 699-706.
- López-Pérez, G. 1994. Uso racional de inmunoestimulantes en la práctica médica. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría* Vol. XXIV 94: 41-42.
- Marcin, A., Lauková, A., Mati, R. 2006. Comparison of the effects of *Enterococcus faecium* and aromatic oils from sage and oregano on growth performance and diarrhoeal diseases of weaned pigs. *Biologia, Bratislava*. 61(6): 789-795.
- Mardones, J. M. y Ursua, N. 1994. *Filosofía de las Ciencias Humanas y Sociales Materiales para una Fundamentación Científica*. Edit. Fontamara, S. A. Barcelona España Ed. 5ta. Las Ciencias Humanas y Sociales. 256 pp.
- Martínez, M., Betancourt, J., Alonso, V. 1996. Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe Vera (Sábila). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1: 18-20.
- Martínez-Dávila, J.P. 2001. Documento interno. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. 18 pp.
- Martínez-Dávila, J.P., Gallardo-López, F., Bustillo-García, L.C., y Pérez-Vázquez, A. 2011. El agroecosistema, unidad de estudio y transformación de la diversidad agrícola. En *La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado*. Conabio, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología, A.C. México, D.F. 453-462 pp.
- Martínez-Dávila, J.P., Landeros-Sánchez, C y Pérez-Vázquez, A. 2004. El concepto de agroecosistema. Un enfoque de cadenas de producción-consumo. *Memorias del Primer Coloquio sobre Agroecosistemas y Sostenibilidad*. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Octubre 27.
- Mauel, M.J., Soto, E., Moralis, J.A., Hawke, J. 2007. A piscirickettsiosis-like Syndrome in Cultured Nile Tilapia in Latin America with *Francisella* spp. As the Pathogenic Agent. *Journal of aquatic animal health* 19:27-34.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S, J., Baker, T.M., Bogwald, J., Castex, M., Ringo, E. 2010. The current status an future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. 302:1:18.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. 2009. Probiotic application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microflora and related health criteria post antibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition* 16(5): 496-503.
- Metchnikoff, E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London: 161-183.

- Meyer, D. 2007. Introducción a la acuicultura. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 159 pp.
- Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., Figueiredo, H.C.P. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactidae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology* 136: 180–183.
- Molnár, K. and Csaba, G. 2005. Sanitary management in Hungarian aquaculture. *Veterinary Research Communications* 29(2):143-146.
- MSD Animal Health. 2011. Bacterial Disease in Warmwater Fish: New Strategies for Sustainable Control. Natal, Brazil. Held in conjunction with the WORLD AQUACULTURE SOCIETY CONFERENCE.
- Newman, S. 1999. A Review of the Use of Non Specific Immune-Stimulants to Reduce the Impact of the WSSV. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference October 28-30. Lynnwood, WA 98037.
- Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annual Rev. of Fish Diseases* 145-185 pp.
- Newman, S. G. 2012. Diagnóstico De Enfermedades De Acuicultura Es Trabajo De Detective. Global Aquaculture the advocate. The Global Magazine for Farmed Seafood. Volumen 15. Número 5.
- Nieto, T. P., Coreobada, M.J.R., Toranzo, A.E and J. L. 1985. Barja. Relation of water temperature to infection of *Salmo gairdneri* with motile *Aeromonas*. *Fish Pathology* 20:99-105.
- Ocampo, A. A., Camberos, O.L. 1999. Diagnóstico del Estrés en Peces. *Veterinaria México*. 30(4).
- Oliveira, M. A. 2001. Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. *Química Nova* 24:307-310.
- O'sullivan, G. C. 2001. Probiotics. *British journal of surgery*, 88(2): 161-162.
- Ottem, K. F., Nylund, A., Karlsbackk, E., Friis-Møller, A., Krossoy, B & Knappskog, D. 2007. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; *Francisella*); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Archives of Microbiology* 188: 547-550.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Kamaishi, T. 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen *et al.* (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem *et al.* (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *Journal Applied Microbiology* 106:1231-1243.

- Palumbo, S., Abeya, C., and Stelma, G. 1992. *Aeromonas hydrophila* group. In: Compendium of methods for the microbiological examination of food, pp. 497–515 (C. Vanderzant and F. Splittstoesser, Eds.). Washington: Asian Pacific American Heritage Association.
- Pandey, A., Sangsurasak, P and Krieger, N. 1999. Scale-up for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 35:167-178.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.R and Nigam, P. 2001. Solid - state fermentation in Biotechnology: Fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech Publishers. Inc. Mitchell, D. A.
- Pardilla-Mata, D. 2011. Estudio de protocolos de comunicación bacterianos: conjugación y quorum sensing. Laboratorio de inteligencia artificial. Universidad Politécnica de Madrid. 69 pp.
- Paredes-Aguilar, M. C., Gastélum-Franco, M.G., Silva-Vázquez, R., Nevárez-Moorillon, V.G. 2007. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30 (3): 261-267.
- Park, K.H., Choi, S. 2014. Effects of *Prunella vulgaris* (Labiatae) extract with specific and non-specific immune responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Science and Technology* 56: 1-7.
- Park, S. B., Aoki, T and Jung, T.S. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Veterinary Research* 43:67.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the Other Half of the Antibiotic Story. *Animal Nutritional Health*, 29, 48.
- Pathiratne, A., Widanapathirana, G.S and Chandrarkanthi, W.H.S. 1994. Association of *Aeromonas hydrophila* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) in freshwater fish in Sri Lanka. *Journal of Applied Ichthyology* 10: 204-208
- Penagos, G., Barato, P., Iregui, C. 2009. Sistema immune y vacunación de peces. *Acta biológica Colombiana* 14(1): 3-24.
- Peraza-Gómez, V. 2008. Uso de plantas medicinales, bacterias ácido lácticas y levaduras con potencial probiótico para combatir la enfermedad de la mancha blanca en *Litopeneus vannamei*, cultivado en el laboratorio.
- Pérez-Tamayo, R. 2008. ¿Existe el método científico?: Historia y Realidad. Fondo De Cultura Económica USA. 301 pp.
- Pérez-Vázquez, A. 1998. El concepto de agroecosistema: definiciones y enfoques. Serie Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados-Campus Veracruz. 11 p.
- Plumb, J. A., Shoemaker, C. A (Eds.). 1999. *Fish Diseases and Disorders*. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2nd edition. . Wallingford, CABI International.

- Pretto-Giordano, L., Eckehard-Müller, E., De Freitas, J.C., Gomes da Silva, V. 2010. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. Brazilian archives of biology and technology 53:87-92.
- Prieto, A., Ocampo, A.A., Fernández, A., Pérez, M.B. 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potenciales de uso en Cuba y México. *Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas, Junio. Universidad Nacional Autónoma de México* 8: 38-49.
- Punitha, S. M. J., Babu, M.M., Sivaram, V., Shankar, V.S., Dhas, S.A., Mahesh, T.C., Immanuel, G., Citarasu, T. 2008. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 16:511-523.
- Qi, Z., Zhang, Z.H., Boon, N., Bossier, P. 2009. Probiotics in aquaculture of China-Current state, problems and prospect. *Aquaculture*. 290:15:21.
- Ramakrishnan, V.C., Concepta Goveas, L., Prakash, M., Halami, P.M., Narayan, B. Optimization of conditions for probiotic curd formulation by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 with probiotic properties using response surface methodology. *Journal Food Science Technology* 51(11):3050-3060.
- Rangel, S., Hernández, M., Silva, R., Ruelas, X., López, R. 2008. Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) como antimicrobiano contra patógenos alimenticios. *RESPYN Edición Especial* 1.
- Real Academia Española.1992. Diccionario de la Lengua Española. Ed. Espasa Calpe, 21ª ed. 1481 pp.
- Reva, O.N., Smirnov, V.V., Petterson, B., Priest, F.G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov. isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 2002;52:101-7.
- Robertson, P. A. W., Down, C. O., Burrells, C., Williams, P & Austin, B. 2000. Uso Carnobacterium sp. As probiotic for Atlantic salmon (*Salmon salar* L) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum) *Aquaculture* 185:235:243.
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J. 2009. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Science* 57: 609-617.
- Rojas, M. M., Tejera, B., Larrea, J.A., Heydrich, M. 2008. Caracterización de cepas del género *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa*). 4to Encuentro Internacional del Arroz, La Habana.

- Rolfe, R.D. 2000. The Role of Probiotic Cultures in the control of Gastrointestinal Health. Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health. The Journal of Nutrition. 396S- 402S.
- Rosnay, J. D. 1975. Le microscope, vers une vision globale. Seuil, Paris. 295 pp.
- Rubio-Limonta, M., Cabrera-Campo, A., Silveira-Coffigny, R., Yaraina-Aguilera, S. 2010. Variabilidad bacteriana en *Oreochromis* sp durante las estaciones de lluvia y seca, cultivadas en ambiente dulceacuícola en diferentes regiones de Cuba. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504, 11(7):11.
- Ruiz, R., Oregui, L.M. 2001. El enfoque sistémico en el análisis de la producción animal: revisión bibliográfica. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 16 (1).
- Ruiz-Rosado, O. 1995. Agroecosistema: el término, concepto y su definición bajo el enfoque agroecológico y sistémico. In: Loera, et al., (eds). Agroecología y Desarrollo Sustentable. Segundo Seminario Internacional de Agroecología. Chapingo. Mex. 29-31 marzo. 103-113.
- Saad, S. A., Habashy, M. M and Sharshar, M. K. 2009. Growth response of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), to diets having different levels of Biogen®. World Applied Sciences Journal 6: 550-556.
- Saavedra, M. 2006. Texto de Asignatura Producción Agropecuaria y Acuícola. Carrera Ingeniería Industrial. Departamento de Tecnología y Arquitectura. Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente. Universidad Centroamericana. Managua, Nicaragua. Marzo, 2006.
- Sáenz, C., Berger, H., Corrales, G.J., Galletti, L., García, C.V., Higuera, I., Mondragón, C., Rodríguez, F.A., Sepúlveda, E., Varnero, M.T. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO Paper 162, Rome, Italy. 165 pp.
- Salvador, R., Zanoló, R., Cericato, L. 2011. The impact of *Streptococcus* on tilapia in Brazil and efficacy of AquaVac® Strep Safor managing the disease under controlled conditions. Bacterial Disease in Warmwater Fish: New Strategies for Sustainable Control. MSD. Global Aquatic animal health 7-10.
- Sankar, G., Elavarasi, A., Sakkaravarthi, K., Ramamoorthy, K. 2011. Biochemical changes and growth performance of Black Tiger shrimp larvae after using *Ricinus communis* extract as a feed additive. International Journal of PharmTech Research 3: 201-208.
- Santoyo, S. S., Cavero, L. J., Ibáñez, E., Señorans, F.J., Reglero, G. 2006. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of optimal extraction parameters. Journal of Food Protection 69:369-375.
- Sato, K and Sudo, S. 1999. Small-scale solid-state fermentation. In: Demain, A. L. and Davies, J. E. (Eds.). Manual of industrial microbiology and biotechnology 2 ed. 61-79 pp.

- Scheinvar, L. 1999. Biosistemática de los xoconostles mexicanos y su potencial económico. Proceedings of the VIII National Congress and IV International Congress on the Understanding and Utilization of Cactus Pear. San Luis Potosí, México.
- Schreck, C., Maule, A. G. 2001. Are the endocrine and immune systems really the same thing? In: Goos, H.J.T., Rastogi, R.K., Vaudry, H., Pierantoni, R. (Eds.), Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity. Proceedings of the 14th International Congress of Comparative Endocrinology, Sorrento, Italy. Monduzzi Editore, Bologna. 351-357 pp.
- Seenivasan, C., Bhavan, P.S., Radhakrishnan, S and Shanthi, R. 2012. Enrichment of *Artemia nauplii* with *Lactobacillus sporogenes* for enhancing the survival, growth and levels of biochemical constituents in the post-larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Turki. Journal Fishes Science 12: 23-3.
- SENASICA. 2003. Manual de buenas prácticas de manufactura en el procesamiento primario de productos acuícolas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Guaymas en Aseguramiento de Calidad y Aprovechamiento Sustentable de Recursos Naturales y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA. 96 pp.
- Serrano, D. M. E., López, L. M., Sainz, E. T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas 37: 58-68.
- Shao, J., Liu, J and Xiang, L. 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes *in vitro*. Aquaculture 229: 11–23.
- Sharma, G y Thakur, M. 2008. Evaluation of different strawberry cultivars for yield and quality characters in himachal Pradesh. Agricultural Science Digest 28(3): 213-215.
- SIAP-SAGARPA. 2007. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera– Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuarios Estadísticos. www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comanuar.html (last accessed 19 August 2007).
- Silva, V. R. 2005. El orégano (*Lippia berlandierin Schauer*): Una alternativa agroindustrial para las zonas áridas y semiáridas de México. In: Orégano: Aprovechamiento, Cultivo e Industrialización en México. F Gómez, R Almeida, M Béjar, G V Nevárez, M A Ruiz (eds). 2a Reunión Nacional sobre Orégano. Salaces, Chihuahua, México, 25 y 26 de febrero del 2005. Coord. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, UACH. 1-10 pp.
- Silva-Vázquez, R., M. G. Gastélum-Franco., J. V. Torres-Muñoz., G. V. Nevárez-Moorillón. 2008. Las especies de orégano en México. En C. N. Aguilar (ed.), Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto Mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología. 136-153 pp.
- Sirimanapong, W., Adams, A., Ooi, E. L., Green, D. M., Nguyen, D. K., Craig, L., Browdy, C. L., Collet, B., Thompson, K. D. 2015. The effects of feeding immunostimulant β -glucan on

- the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. *Fish & Shellfish Immunology* 45: 357-366.
- Siwicki, A.K., Morand, M., Terech-Majevska, E., Niemczuk, W., Kazun, K., Glabsky, E. 1998. Influence of immunostimulant on the effectiveness of vaccines in fish: in vitro and in vivo study. *Journal of Applied Ichthyology* 14:225e7.
- Small, B.C., Bilodeau, A. L. 2005. Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *General and Comparative Endocrinology* 142: 256-262.
- Snieszko, S. F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.* 6:197-208.
- Snieszko, S. F. 1975. History and present status of fish diseases. *Journal Wildlife Disease* 11:446-459.
- Soto, E., Fernandez, D., Hawke, J. P. 2009. Attenuation of the Fish Pathogen *Francisella* sp. by Mutation of the *iglC** Gene. *Journal Aquatic Animal Health* 21:140-149.
- Soto, E., Hawke, J. P., Fernández, D., Morales, J. A. 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal Fisheries Disease* 32:713-722.
- Soto-Rodríguez, S.A., Cabanillas-Ramos, J., Alcaraz, U., Gómez-Gil, B., Romalde, J. L. 2013. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *Journal of Applied Microbiology* 115: 654-662.
- Suchanit, N., Kuniyoshi, F., Masato, E., Masashi, M., Takayuki, K. 2010. Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a probiotic bacterium, on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral *Aeromonas* challenges. *Fish Science* 76:833-840.
- Talpur, A.D., Memon, A. J., Khan, M. I., Ikhwanuddin, M., Danish, M. M., Abol-Munafi, A. B. 2012. Inhibition of pathogens by lactic acid bacteria and application as water additive multi isolates in early stages larviculture of *P. pelagicus* (Linnaeus, 1758). *Journal Animal Plant Science* 22: 54-64.
- Tannock, G.W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: Mackie, R.I., Witte, B.A., Isaacson, R.E. Eds., *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York. 434-465 pp.
- Terblanché, F. C., Kornelius, G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) a literature review. *Journal of Essential Oil Research* 8: 471-485.
- Toche, P. P. 2012. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes* 23: 446-457.

- Torres-Ponce1, R. L., Morales-Corral, D., Ballinas-Casarrubias, M. L y Nevárez-Moorillón, G. V. 2015. El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5): 1129-1142.
- Toyo, M., Vargas, N., Navas, P., Navas, S., Quintero, M., Leal, L., Riera, G., Barreto, G., Izquierdo, N. 2016. *Aloe vera* como suplemento nutricional para caprinos. *Revista Argentina de Producción Animal* 28(1): 23-26.
- Tripathi, P., Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetable. *Postharvest Biology and Technology* 32: 235-245.
- Trivedi P., Kumar, B., Pandey, A., Palni, L. M. S. 2007. Plant Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C, editors. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization* Springer. 291-9 p.
- Van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture* 446:88-96.
- Vanderberg, P., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products, and interference with microbial growth. *FEMS Microbiological Review*. 2: 221-238.
- Vaseeharan, B., Thaya, R. 2014. Medical plant dereivates as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture int* 22:1079-1091.
- Velázquez, E., Rojas, M., Lorite, M.J., Rivas, R., Zurdo-Piñeiro, J. L., Heydrich, M 2008. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology* 48:118-24.
- Venkat, H. K., Shau, N. P & Jain, K. J. 2004. Effect on feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35: 501-507.
- Ventura, M. T., Grizzel, J.M 1988. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in Channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) *Journal Fishes Diseases* 11, 397-407.
- Vijayakumaran, M. 2001. Probiotics in aquaculture. Central Marine Fisheries Research Institute, Chennai. 600 006.
- Vilaboa-Arroniz, J., Díaz-Rivera, P., Ruiz-Rosado, O., Platas-Rosado, D.E., González-Muñoz, S., Juárez-Lagunes, F 2009. Caracterización socioeconómica y tecnológica de los agroecosistemas con bovinos de doble propósito de la región del Papaloapan, Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10 (1): 53-62.

- Villas-Boas, S. G. and Esposito, E. 2000. Bioconversão do bagaço de maçã; enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. *Revista de Biotecnologia* 38-42.
- Waller, G.R., Mangialico, S., Ritchey, C. R. A. 1978. Chemical investigation of *Aloe barbadensis miller*. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 58: 69-76.
- Wedemeyer, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Edited by G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, and C.B. Schreck. Cambridge University Press, Cambridge. 35-71 pp.
- Whitman, K. A., MacNair, N. G. 2004. *Finfish and Shellfish. Bacteriology Manual Techniques and Procedures*. Iowa State Press. A Blackwell publishing Compan. 258 pp.
- Who, 2008. Traditional Medicine>> fact sheet number 134. Geneva, World Health Organization. [En linea] URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>. (Consulta 17.07.16)
- Woo, P. T. K., Bruno, D. W. 2010. Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections. In *Edwardsiella septicaemias*. 2nd edition. Edited by Evans JJ, Klesius PH, Plumb JA, Shoemaker CA. Wallingford: CABI International 512–534.
- Woolhouse, M. E. J & Dye, C. 2001. Preface. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London series B, Biological Sciences* 356: 981-982.
- Yahia, E. M. and Mondragon, C. 2011. Nutritional components and antioxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Reserarch International* 44:2311-2318.
- Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *Internatl. Jornal of Food Microbiology* 111:6-11.
- Yardimci, B., Aydin, Y. 2011. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 58:47-54.
- Ye, X., Li, J., Lu, M., Deng, G., Jiang, X., Tian, Y., Quan, Y., Jian, Q. 2011. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science* 77:623-632.