



Comprobación *in vivo* de la capacidad antibacterial de *Oedogonium capillare* contra *Vibrio fluvialis* en pez Dorado *Carassius auratus*

In vivo assessment of antibacterial capacity of *Oedogonium capillare* against *Vibrio fluvialis* in Golden fish *Carassius auratus*

Roxana López Simeón* Pilar Negrete Redondo* Jorge Romero Jarero**

Abstract

The indiscriminate use of antibiotics for the control of bacterial infections in cultures of aquatic organisms, administered in a systemic way, has provoked the presence of R plasmids in bacterial strains of high risk for aquaculture; therefore, it is important to study new natural alternatives not only to prevent bacterial infections, but to prevent the use of antibiotics. *Oedogonium capillare* alga presented, in previous *in vitro* studies, the capacity to inhibit the growth of different bacterial species of ichthyopathogenic importance. The objective of the present study is to prove *in vivo* the antibacterial capacity of the alga against infections caused by the pathogen *Vibrio fluvialis* in *Carassius auratus* Golden fish. The activity of the hexanic extract of *O. capillare* alga was proved from the start of the treatment's administration through three different channels: intramuscular, food and baths, after fishes were experimentally inoculated with *V. fluvialis*. The use of the extract by these channels was not effective; therefore, different ways of treatments were tested by administering them before and after the infection was experimentally provoked. Fish treated with additional dry alga in feed before and after being infected, surpassed the infection in 80% of cases. Fish treated with alcoholic extract of *O. capillare* registered higher than 80% of survival. Significant differences were obtained in relation to the control group and the hexanic extract by intramuscular and feed channels. The significant differences between treatments were proved by analysis of multiple comparisons of Kruskal Wallis.

Key words: ANTIBACTERIAL, *OEDOGONIUM CAPILLARE*, AQUACULTURE, *CARASSIUS AURATUS*, NATURAL EXTRACTS, CONTROL, INFECTIONS, *VIBRIO FLUVIALIS*.

Resumen

El uso de antibióticos de forma indiscriminada para el control de infecciones de origen bacteriano en cultivos de organismos acuáticos, administrados de forma sistemática, ha provocado la presencia de plásmidos-R en cepas bacterianas de alto riesgo para la acuicultura, por lo que es importante estudiar nuevas alternativas naturales no solamente para prevenir las infecciones bacterianas, también para evitar el uso de antibióticos. El alga *Oedogonium capillare* presentó, en estudios previos *in vitro*, la capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes especies de bacterias de importancia ictiopatógena. El objetivo del presente estudio es probar *in vivo* la capacidad del alga como antibacteriana contra infecciones provocadas por el patógeno *Vibrio fluvialis* en pez Dorado *Carassius auratus*. Se comprobó la actividad del extracto hexánico del alga *O. capillare* a partir de la administración del tratamiento a través de tres diferentes vías: intramuscular, alimento y baños, después de haberse inoculado experimentalmente a los peces con *V. fluvialis*. El uso del extracto por estas vías no fue efectivo, por lo que se probaron diferentes formas de tratamientos que se administraron antes y después de ser provocada experimentalmente la infección. Los peces tratados con el alga seca adicionada en el alimento antes y después de ser infectado, superaron la infección en 80% de los casos. Los peces tratados con el extracto alcohólico del *O. capillare* registraron sobrevivencia mayor a 80%. Se obtuvieron diferencias significativas en relación con el grupo testigo y con el extracto hexánico vía intramuscular y alimento. Las diferencias significativas entre los tratamientos se comprobaron mediante el análisis de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis.

Palabras clave: ANTIBACTERIAL, *OEDOGONIUM CAPILLARE*, ACUICULTURA, *CARASSIUS AURATUS*, EXTRACTOS NATURALES, TESTIGO, INFECCIONES, *VIBRIO FLUVIALIS*.

Recibido el 19 de mayo de 2006 y aceptado el 11 de enero de 2007.

*Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente, Canal Nacional 1100, Col. Villa Quietud, 04950, México, D. F.

**Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introduction

Infectious diseases constitute an important factor that considerably limits the productivity and commercial potential in aquaculture enterprises.¹ The infections caused by bacteria in aquaculture farms cause high mortality,² originating serious economic losses, especially to the rural groups that cultivate them.

In *Carassius auratus* fish different bacterial infections have been registered, such as hemorrhagic septicemia caused by *Pseudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio parahaemolyticus*.³ Some pathogens that form part of the microbiot of fish may also be harmful for humans, as in the case of *Vibrio cholerae*.⁴

To prevent these infections, aquaculturists indiscriminately apply antibiotics like oxitetracycline, tetracycline, chloramphenicol and kanamycin, in great quantities, either in ponds or incorporating it to the food, using it routinely as growth factor.⁵⁻⁶

Sulfonamides, penicillins and aminoglycoside constitute the group of antibiotics of greater use in aquaculture. In this group, antibiotics like streptomycin, kanamycin, gentamicin and tetracycline are found.⁷

In aquaculture, treatments with antibiotics may be applied in water by means of baths, combined with food, and when the organisms are of great value for the farm, as in the case of reproductive specimens, individual treatment can be administered by intramuscular doses. For each infection that the culture presents in an aquaculture farm an adequate analysis should be done, identifying the pathogen so that later a specific antibiotic, dose and via of administration will be applied,⁷ with the aim of not provoking resistance in the bacterial strains that conform bacterial flora of the cultured fish in the farm, thus counteract with greater ease epizootic diseases.

Nevertheless, in practice, aquaculturists do not have these precautions; therefore, antibiotics are indiscriminately used, causing bacterial cells to develop resistance to them through plasmids that confer the capacity to resist the toxic effects of antibiotics.⁸

In addition to the aforementioned, the antibiotics of chemical origin used in fish cultures are mixed with food, that when dispersing in the water they incorporate directly into the environment and produce high levels of environmental pollution, since once dissolved in water they rarely degrade.

The presence of plasmids-R and antibiotics in cultured fish for human consumption, imply public health problems by affecting their consumers, due to the inadequate assimilation and long permanence of antibiotics in the muscular pack of fish and for the slow absorption of antibiotics, such as oxitetracycline,

Introducción

Las enfermedades infecciosas constituyen un factor importante que limita considerablemente el potencial productivo y comercial de las empresas acuícolas.¹ Las infecciones causadas por bacterias en granjas acuícolas provocan alta mortalidad,² lo que origina graves pérdidas económicas, sobre todo a los grupos rurales que las cultivan.

En peces *Carassius auratus* se han registrado diferentes infecciones bacterianas, como la septicemia hemorrágica causada por *Pseudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio parahaemolyticus*.³ Algunos patógenos que forman parte de la microbiota de los peces pueden también ser nocivos para el humano, como es el caso de *Vibrio cholerae*.⁴

Para prevenir estas infecciones, los acuicultores aplican de manera indiscriminada antibióticos, como la oxitetraciclina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina, en grandes cantidades, ya sea en los estanques o incorporado al alimento, utilizándolos rutinariamente como factor de crecimiento.⁵⁻⁶

Las sulfas, las penicilinas y los aminoglicósidos constituyen el grupo de antibióticos de mayor uso en la acuicultura. En este grupo se encuentran antibióticos como estreptomycin, kanamicina, gentamicina y tetraciclinas.⁷

En la acuicultura, los tratamientos con antibióticos se pueden aplicar ya sea en el agua, por medio de baños, combinados con el alimento, y cuando los organismos son de alto valor para la granja, como pueden ser los reproductores, se les puede suministrar tratamiento individual mediante dosis aplicadas intramuscularmente. Para cada infección que presente el cultivo en una granja acuícola se debe llevar a cabo un análisis adecuado, identificando el patógeno para posteriormente especificar el antibiótico que se va a aplicar, la dosis y la vía de administración,⁷ con el fin de no provocar resistencia en las cepas bacterianas que conforman la flora bacteriana de los peces en cultivo en la granja, y así contrarrestar con mayor facilidad las epizootias.

Sin embargo, en la práctica, los acuicultores no tienen estos cuidados, por lo que los antibióticos son utilizados indiscriminadamente, provocando que las células bacterianas desarrollen resistencia a ellos a través de plásmidos que confieren capacidad de resistir los efectos tóxicos de los antibióticos.⁸

Aunado a esto, los antibióticos de origen químico utilizados en los cultivos de peces se suministran mezclados con el alimento, el cual al dispersarse en el agua se incorpora directamente al ambiente y produce altos niveles de contaminación ambiental, ya que disueltos en agua difícilmente se degradan.

through the fish intestine,⁹ since aquaculturists, by not waiting the statutory time for fish detoxification, sell the product for human consumption before time.¹⁰

The rise of selective environment increasingly aggressive for bacteria, like hospitals, industry and agricultural activities, where great quantities of antimicrobials are used for prevention and treatment of infections, have increased the capacity and frequency incorporating resistant genes in bacteria. Likewise, the increasingly degraded sanitary quality in communities establishes routes of dissemination for the resistant microorganisms.¹¹

Consequently, it is necessary to search for new natural alternatives not only to prevent bacterial infections, but also to avoid the use of antibiotics and, as a consequence, the proliferation of plasmids responsible of resistance to antibiotics.¹²

Recently, medicinal plants are used which include great variety of algae from fresh water as well as from marine environments.¹³

It has been demonstrated that marine algae of different species possess a highly bactericidal effect against *Alteromonas macleodii*, *A. rubra*, *A. undina*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* spp, *Pseudomonas* spp and *Vibrio* spp.¹²

Other extracts obtained from algae have demonstrated a powerful effect over bacterial growth and survival, as well as antimicrobial properties against pathogens of aquatic organisms; in this way, Immanuel *et al.*¹⁴ have proved the antibiotic capacity of *Sargassum wightii* and *Ulva lactuca* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp; this last the same as green marine algae: *Sphaerococcus coronopifolus*, *Enteromorpha linza*, *Cladophora coelothrix*, *Oodium tomesitosum*; brown algae like *Colopomenia sinuosa*, *Padina pavonica*; red algae: *Gelidium* sp, *Laurencia obtusa*, *Polisiphonia* sp, *Hyphenia museoformis* and *Galaxaura rugosa*, also have antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The fresh water green algae: *Spirogyra* sp, *Chara* and *Cladophora*, registered activity against *Escherichia coli*, human enteropathogenic.¹⁵⁻¹⁶

On the other hand, Wijffels *et al.*¹⁷ report that in different species of *Laurencia majuscula* and *L. obtusa*, it has been observed a powerful activity against human pathogen bacteria as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* sp.

Abutbul *et al.*¹⁸ used the rosemary plant (*Rossmarinus officinalis*) to inhibit *Streptococcus iniae* inoculated in tilapia. These authors obtained a bacteriostatic effect which inhibited its growth, besides demonstrated the potential that an alternative treatment can have based on plants. Abutbul *et al.*¹⁹ evaluated the antibacterial capacity of 104 desert plants and found that *Hammada scoparia* inhibited *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus*; *Streptococcus iniae*, fish pathogen bacteria, was

La presencia de plásmidos-R y antibióticos en los peces cultivados para consumo humano, implica problemas de salud pública al afectar a sus consumidores, debido a la inadecuada asimilación y larga permanencia de los antibióticos en el paquete muscular de los peces y por la lenta absorción de los antibióticos, como la oxitetraciclina, a través del intestino de los peces,⁹ ya que los acuicultores, al no esperar el tiempo reglamentario de desintoxicación de los peces, venden el producto para consumo humano antes de tiempo.¹⁰

El surgimiento de ambientes selectivos cada vez más agresivos para las bacterias, como hospitales, industrias y actividades agropecuarias como la acuicultura, donde se utiliza gran cantidad de antimicrobiales como prevención y tratamiento de infecciones, han aumentado la capacidad y frecuencia en la incorporación de genes resistentes en las bacterias. Asimismo, la cada vez más degradada calidad sanitaria en las comunidades establece rutas de diseminación de los microorganismos resistentes.¹¹

Por lo anterior, es necesario buscar nuevas alternativas naturales no sólo para prevenir las infecciones bacterianas, también para evitar el uso de antibióticos y, como consecuencia, la proliferación de plásmidos que son responsables de la resistencia a antibióticos.¹²

Actualmente se emplean plantas medicinales que incluyen gran variedad de algas tanto de agua dulce como de ambientes marinos.¹³

Se ha demostrado que las algas marinas de diferentes especies poseen alto efecto bactericida contra *Alteromonas macleodii*, *A. rubra*, *A. undina*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* spp, *Pseudomonas* spp y *Vibrio* spp.¹²

Otros extractos obtenidos de algas han demostrado potente efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia bacteriana, así como propiedades antimicrobianas contra patógenos de organismos acuáticos; de esta forma, Immanuel *et al.*¹⁴ han comprobado la capacidad antibiótica de *Sargassum wightii* y *Ulva lactuca* contra *Vibrio parahaemolyticus* en camarón; esta última al igual que las algas verdes marinas: *Sphaerococcus coronopifolus*, *Enteromorpha linza*, *Cladophora coelothrix*, *Oodium tomesitosum*; algas cafés como *Colopomenia sinuosa*, *Padina pavonica*; las algas rojas: *Gelidium* sp, *Laurencia obtusa*, *Polisiphonia* sp, *Hyphenia museoformis* y *Galaxaura rugosa*, también poseen actividad antimicrobial contra *Staphylococcus aureus*. Las algas verdes, dulce-acuícolas: *Spirogyra* sp, *Chara* y *Cladophora*, registraron actividad contra *Escherichia coli*, enteropatógeno de humanos.¹⁵⁻¹⁶

Por otro lado, Wijffels *et al.*¹⁷ informan que en diferentes especies de *Laurencia majuscula* y *L. obtusa*, se ha observado potente actividad contra bacterias patógenas de humanos como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp.

Abutbul *et al.*¹⁸ utilizaron la planta del romero

inhibited by *Ochradenus baccatus* and by *Raseada stenostachya*.

Antibacterial properties have been detected from superior plants such as thyme (*Thymus vulgaris*), rosemary (*Rossmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis*), lemon balm (*Melissa officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*), Yarrow (*Achillea millefolium*), clove (*Syzygium aromaticum*), granate (*Punica granatum*), jambolan (*Syzygium cumini*), guayaba (*Psidium guajaba*),²⁰ as well as the activity of the raw extract that contained red pepper (*Capsicum frutescens*) lemon (*Citrus limon*) and pear (*Opuntia vulgaris*).²¹

The alga *Oedogonium capillare* belongs to the Oedogoniaceae (*Chlorophycophyta*) family,²³⁻²⁴ which is easily found in Mexico, it is planctonic and benthonic, common in fresh water,²⁵ usually favourable for aquariums if maintained in moderate quantity. Many fish and invertebrates feed from it.²⁶

Negrete *et al.*²⁷ proved the *in vitro* capacity of the extract obtained from fresh water green algae, *Oedogonium capillare*, to inhibit growth of 23 different bacteria, pathogen to humans as well as of ictiopathogenic importance, belonging to the Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae and Vibrionaceae family; obtained high coefficients of correlation between the performance of the algae extract and antibiotics like kanamycin, tetracycline and chloramphenicol.

Based on the aforementioned, the present study has the objective to prove *in vivo* the capacity of *Oedogonium capillare* as antibacterial against bacterial infections originated by *Vibrio fluvialis* pathogen in *Carassius auratus* Golden fish.

Material and methods

The specimens of *O. capillare* were collected in ponds for frog culture, in the Center of Biological and Aquatic Research, in Xochimilco, Mexico City. Dead leaves and organic waste were removed from the water surface before doing the sampling. When algae showed massive growth, they were extracted with a spoon-shape net, and vigorous specimens were manually selected taking into account size, structure, purity and color. The algae were identified in the laboratory of Phycology of the Metropolitan-Xochimilco Autonomous University, based on the descriptions of Gauthier-Lievre,²² Hirn²³ and Tiffany and Britton.²⁴

Forty five kg of algae humid weight were harvested. They were washed under constant fresh water flow, removing in this way all foreign matter. Material was observed with a dissection microscope to determine and verify its health state and complete cleanliness. Samples were dried in the dark at 18°C to avoid deg-

(*Rossmarinus officinalis*) para inhibir al *Streptococcus iniae* inoculado en tilapia. Estos autores obtuvieron un efecto bacteriostático que inhibió su crecimiento, además demostraron el potencial que puede tener un tratamiento alternativo con base en plantas. Abutbul *et al.*¹⁹ evaluaron la capacidad antibacterial de 104 plantas desérticas y encontraron que *Hammada scoparia* inhibió a *Aeromonas hydrophila* y a *Vibrio alginolyticus*; *Streptococcus iniae*, bacteria patógena de peces, fue inhibida por *Ochradenus baccatus* y por *Raseada stenostachya*.

Se han detectado propiedades antibacterianas de plantas superiores como el tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rossmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*), bálsamo de limón (*Melissa officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), milenrama (*Achillea millefolium*), clavo (*Syzygium aromaticum*), granada (*Punica granatum*), jambolan (*Syzygium cumini*) y guayaba (*Psidium guajaba*),²⁰ así como la actividad del extracto crudo que contenía pimienta roja (*Capsicum frutescens*), limón (*Citrus limon*) y pera (*Opuntia vulgaris*).²¹

El alga *Oedogonium capillare* pertenece a la familia Oedogoniaceae (*Chlorophycophyta*),²²⁻²⁴ que se encuentra fácilmente en México, es planctónica y bentónica, común en cuerpos de agua dulce,²⁵ suele ser benéfica para los acuarios si se mantiene en cantidad moderada. Muchos peces e invertebrados se alimentan de ella.²⁶

Negrete *et al.*²⁷ comprobaron *in vitro* la capacidad del extracto que se obtuvo a partir del alga verde dulceacuícola, *Oedogonium capillare*, para inhibir el crecimiento de 23 diferentes bacterias, tanto patógenas de humanos como de importancia ictiopatogénica, pertenecientes a las familias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae y Vibrionaceae; obtuvieron altos coeficientes de correlación entre la forma de actuar del extracto del alga y los antibióticos kanamicina, tetraciclina y cloranfenicol.

Con base en lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo probar *in vivo*, la capacidad del alga *Oedogonium capillare* como antibacterial contra infecciones bacterianas provocadas por el patógeno *Vibrio fluvialis* en pez Dorado *Carassius auratus*.

Material y métodos

Los ejemplares de *O. capillare* fueron recolectados de estanques de cultivo de ranas, en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuáticas, en Xochimilco, ciudad de México. Se removieron la hojarasca y los desechos orgánicos de la superficie del agua antes de efectuar el muestreo. Cuando las algas presentaron crecimiento masivo, se extrajeron con red de cuchara, y los ejemplares más vigorosos se seleccionaron manualmente tomando en cuenta tamaño, estructura, pureza y

radation of pigments by the effect of sunlight, and to avoid the loss of its chemical properties.

Algae were homogenized with an electric homogenizer.* The product obtained (2 kg) was subject to two consecutive extractions with 1 L of hexane, at reflux temperature for 5 h. The first extraction concentrated in a vacuum rotary evaporator** and 150 g of raw extract were finally obtained, and used to perform the preliminary tests of its antibiotic activity. The second extraction was performed using a chromatographic column of silica gel (230-400) and ethylic chloroform ether (4:1 v/v) as eluent; from there, six fractions for the microbiological analysis were obtained.

Simultaneously, 1 kg more of *O. capillare* algae was collected and processed in the same way. These algae were submitted to alcoholic extraction, fresh and clean alga was placed in 1 L amber colored jars, 500 g of algae were added to the jars, 500 mL of ethanol and 250 mL of distilled water, they were closed and placed in a fresh dark place. The prepared jars were let to sit for one month agitating them every third day, after standing the jars for one month, components were filtered to obtain fine extract.²⁷

To carry out the tests *in vivo* 100 healthy *Carassius auratus* fish were acquired in a farm from Morelos, Mexico, which did not show injuries or signs of infection, and manifested no abnormal behavior for the species, with a total length between 10 and 15 cm. The fish were subjected to a period of acclimatization and observation, for which they were placed in a tub 1 m in diameter for fish culture, eight days before being inoculated. The fish that showed signs, injuries or abnormal behavior (gasping, irregular swimming, exophthalmia, anorexia, scalding or abdominal inflammation) were substituted by healthy fish.²⁸

From the isolated and identified strains during the *in vitro* phase of the experiment,²⁷ the strain *Vibrio fluvialis* was selected to induce the infection in the *C. auratus* fish. A concentration of 10^4 cfu/mL was used as ineffective dose (ID₅₀), only to produce general signs of bacterial infection.²⁹

To prepare the inoculum, brain-hart agar (BHA) was extracted from the plates, with a bacteriological handle calibrated at 3 mm in diameter, three times the handle with *V. fluvialis* strain, they were seeded in vials with 50 mL of brain-hart infusion broth (BHI) and were incubated in bain-marie with agitation at 14 000 g at room temperature, during 24 h. Afterwards, the inoculums were diluted to a tenth from 10^7 and up to 10^3 ; finally, they were seeded in duplicate on agar plates of BHI to determine the viability of the inoculum and the infective dose (quantity of units forming the colony per milliliter of inoculum administered to the fish) and, in this way, obtain the different concentrations of inoculum.³⁰

color. Las algas fueron identificadas en el laboratorio de Ficología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, basándose en las descripciones de Gauthier-Lievre,²² Hirn²³ y Tiffany y Britton.²⁴

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

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

Simultáneamente se recolectó 1 kg más de alga *O. capillare*, que se procesó de la misma manera. Estas algas se sometieron a extracción alcohólica, se colocó el alga fresca y limpia en frascos color ámbar de 1 L, a los frascos se les agregó 500 g de alga, 500 mL de etanol y 250 mL de agua destilada, se cerraron y se colocaron en un lugar fresco y sin luz. Los frascos ya preparados se dejaron reposar durante un mes agitando los cada tercer día, al mes de reposo los componentes de los frascos se filtraron para obtener el extracto fino.²⁷

Para efectuar las pruebas *in vivo* se adquirieron 100 peces *Carassius auratus* sanos, en una granja de Morelos, México, los cuales no presentaban signo o lesión de infección, ni manifestaban comportamiento anormal para la especie, con longitud total entre 10 y 15 cm. Los peces se sometieron a periodo de aclimatación y observación, para lo cual se colocaron en una tina de 1 m de diámetro para cultivo de peces, ocho días antes de ser inoculados. Los peces que presentaron signos, lesiones o comportamiento anormal (boqueo, nado irregular, exoftalmia, anorexia, desca-mación o inflamación abdominal) se sustituyeron por peces sanos.²⁸

De las cepas aisladas e identificadas durante la fase *in vitro* del experimento,²⁷ se seleccionó la cepa *Vibrio fluvialis* para inducir la infección en los peces *C. auratus*. Se utilizó concentración de 10^4 ufc/mL como

*VIRTIX, Estados Unidos de América.

**Buchi, Mod R-11417, Estados Unidos de América.

With fish previously subjected to observation, ten aquariums were implemented with ten fish each.

The inoculum was administered intramuscularly on the dorsal region of the fish, previously disinfected with alcohol. Both, experimental aquariums as well as control aquariums were kept in the same environmental conditions than the ones registered in the culture ponds: 22°C, pH 7 and 5 mg/mL nitrates and nitrites.

In the first aquarium, (control group), fish were inoculated with 1 mL of saline sterile solution at 0.8%, for each 100 g of fish weight,³¹ with the aim to reproduce the experimental impact on the fish of this group and register the stress provoked by the injection.³²

In the second aquarium, that was registered as control, fish were inoculated with only 1 mL of 10⁴ cfu/mL of *V. fluvialis* for each 100 g of fish, but no treatment was administered.

In the first phase of the experiment, a first group of three experimental aquariums (aquariums 3, 4 and 5) that were also inoculated with the same dose of *V. fluvialis* from the control group was implemented.

At the moment that inoculated fish manifested clinical signs of bacteriosis, each experimental portions were submitted to different administration routes with the hexagenic extract of *O. capillare*, for one week.

Fish in aquarium 3 were administered hexanic extract of *O. capillare* treatment added to the food. The food was prepared mixing 3 mL of hexanic extract from algae in 1 000 g of commercial food. Small grumps were formed which were left to dry at room temperature. Once dried, they were fed to the fish.

The fish already inoculated with the established dose of *V. fluvialis* from aquarium 4 were treated with hexanic extract from *O. capillare* alga via intramuscular, dosed in a proportion of 4 mL of extract for each 100 g of fish weight.⁷ When fish started to manifest signs of infection, insulin syringes were prepared with alga extract and applied on the fish's dorsal region previously disinfected with alcohol. Later, fish's reactions to the treatment were registered, every day for a week.

Five mL of hexanic extract of *O. capillare* were daily added for four days to the water (40 L) of pilot aquarium 5. Fish from this aquarium were kept in observation during eight days.

The negative response of the fish to hexanic extract of *O. capillare* in pilot tests of the first phase, demonstrated that it was needed to design and test new ways of treatment with *O. capillare*; therefore, in this research a second phase was implemented.

The development of the second phase of the *in vivo* experiment was done in two different moments: the first (part 1) was done applying treatments before

dosis infectiva (D50I), para producir únicamente signos generales de infección bacteriana.²⁹

Para preparar el inóculo se extrajo de las placas de agar cerebro corazón (BHA), con un asa bacteriológica calibrada a 3 mm de diámetro, tres veces el asa con la cepa *V. fluvialis*, se sembraron en viales con 50 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) y se incubaron en baño María con agitación a 14 000 g a temperatura ambiente, durante 24 h. Posteriormente, los inóculos se diluyeron a la décima desde 10⁷ y hasta 10³, finalmente se sembraron por duplicado en placas de agar de BHI para determinar la viabilidad del inóculo y la dosis infectiva (cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro de inóculo administrado a los peces) y así obtener las diferentes concentraciones de inóculos.³⁰

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

El inóculo se aplicó intramuscularmente sobre la región dorsal de los peces, previamente desinfectada con alcohol. Tanto los acuarios experimentales como el acuario testigo se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que las que se registraron en los estanques de cultivo: 22°C, pH 7 y 5 mg/mL nitratos y nitritos.

En un primer acuario (grupo testigo), los peces fueron inoculados con 1 mL de solución salina estéril a 0.8%, por cada 100 g de peso del pez,³¹ con el propósito de reproducir el impacto experimental sobre los peces de este grupo y registrar el estrés provocado por la inyección.³²

En el segundo acuario, que se registró como testigo, sólo se inoculó a los peces con 1 mL de 10⁴ ufc/mL de *V. fluvialis* por cada 100 g de pez, pero no se les administró ningún tratamiento.

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

En el momento en que los peces inoculados manifestaron el cuadro clínico de bacteriosis, cada uno de los lotes experimentales se sometieron a diferentes vías de administración con el extracto hexánico del alga *O. capillare*, durante una semana.

A los peces del acuario 3 se les administró el tratamiento del extracto hexánico de *O. capillare* adicionado al alimento. El alimento se preparó mezclando 3 mL del extracto hexánico del alga en 1 000 g de alimento comercial. Se formaron pequeños grumos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Ya secos se proporcionaron como alimento a los peces.

Los peces ya inoculados con la dosis establecida con *V. fluvialis* del acuario 4 se trataron con el extracto hexánico del alga *O. capillare* vía intramuscular, dosifi-

inoculating fish and the second (part 2) was developed with fish that were treated after being experimentally infected.

To the 10 fish of aquarium 6, seven days after being inoculated with 10^4 cfu/mL of *V. fluvialis*, food was administered prepared with dried and grounded *O. capillare* alga (without extraction). For the food preparation 100 g of dried and grinded alga were weighed and 100 g of commercial food for fish, both ingredients were mixed until a uniform preparation was obtained. Ten mL of agar were added to the mixture and combined until a paste was obtained, that was extended and let to dry for 72 hours in dry heat stove at 40°C. The dry food was grinded and administered to fish twice a day.

The treatment used with the ten fish from the experimental aquarium 7 consisted in introducing in the aquariums 50 g of *O. capillare* alga, alive and clean, seven days before the fish were inoculated with 10^4 cfu/mL of *V. fluvialis*.

In aquarium 8, treatment to the same quantity of *C. auratus* fish was applied as soon as they showed signs of bacteriosis after inoculum of 10^4 cfu/mL of *V. fluvialis*; for this treatment, prepared food with dried and grinded *O. capillare* (without extraction) was used. The food was administered twice a day during seven days.

Treatment in experimental aquarium 9 consisted in placing inside the aquarium, 50 g of live and clean alga when fish presented signs of infection after being inoculated with 10^4 cfu/mL of *V. fluvialis*.

In the last experimental aquarium 10, treatment was administered in the food with alcoholic extract of *O. capillare* included, which was incorporated to the fish commercial food by the method of alcohol evaporation, described by Marañón and Maya-Peña.³³ A hundred g of dry food were mixed with 100 mL of alga alcoholic extract, alcohol was left to evaporate so that the extract would incorporate to the treatment, and started to be administered the next day of the inoculum, when fish presented signs of infection, twice a day during seven days.

From that moment, changes in behavior, signs and injuries caused by the infection that the individual showed, in the control group as well as in the experimental were registered.

Afterwards, Kruskal Wallis one-way variance analysis by ranks was applied, to evaluate if there was significant difference among all treatments, including the control group. Later, a multiple comparison of the obtained means of Wilcoxon's rank sum was performed, based on the following formula:

$$R_n - R_m \geq Z\sqrt{(N(N+1)/12) * (1/N_n + 1/N_m)}$$

cado en proporción de 4 mL de extracto por cada 100 g de peso del pez.⁷ Se prepararon jeringas de insulina cargadas con el extracto del alga y se aplicó sobre la región dorsal del pez previamente desinfectada con alcohol, cuando los peces empezaron a manifestar signos de infección. Posteriormente se registraron las reacciones que presentaban los peces al tratamiento, todos los días durante una semana.

En el agua (40 L) del acuario piloto 5 se adicionaron 5 mL de extracto hexánico de *O. capillare* diariamente durante cuatro días. Los peces de este acuario se mantuvieron en observación durante ocho días.

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

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

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

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

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

El tratamiento en el acuario experimental 9 consistió en colocar dentro del acuario, 50 g de alga viva y limpia cuando los peces presentaron signos de infección después de ser inoculados con 10^4 ufc/mL de *V. fluvialis*.

En el último acuario experimental 10, se administró el tratamiento en el alimento con el extracto alcohólico de *O. capillare* integrado, el cual se incorporó al

Results

Control group fish showed general signs of bacteriosis, provoked by experimental stress: skin edema, bristly fins, anorexia, nervous behavior. At 24 h of being inoculated, *C. auratus* fish recovered the initial health state.

The concentration of 10^4 cfu/mL of *V. fluvialis* allowed to induce the bacterial infection at general level with the following signs and lesions: abnormal gasping, darkening of the skin, excessive mucosity, irregular swimming, bulky belly, anorexia, loss of appetite, peeling and fin hemorrhage in the *C. auratus*.

In aquarium 2, control group, at 24 h of inoculating all *C. auratus* fish, they presented general signs of bacterial infection. By not applying treatment, the infection progressed in a lapse of 72 h until the death of 80% of the aquarium fish, with presence of the following signs: opaque skin, peeling, fin and tail hemorrhage, exophthalmia. Dark gills, bulky belly, anorexia, abnormal behavior, erratic swimming, gasping and mucosity, the remaining 20% recovered its original health state (Table 1).

In phase 1, fish from aquarium 3 presented general signs of bacterial infection 24 h after being inoculated: peeling, fin and tail hemorrhage, exophthalmia, bulky belly, anorexia, abnormal behavior, erratic swimming and mucosity (Table 1).

Fish in aquarium 4 presented signs of infection 24 h after being inoculated. Treatment was administered immediately after symptoms' manifestation. These fish suffered very violent reactions, like protuberance on the injection area and temporal loss of motor functions; therefore, the bacterial infection was not overcome. Similar conditions to control group were present (Table 1).

In aquarium 5, fish inoculated presented general signs of bacteriosis after 24 h. Within the next 36 h, the clinical profile of this group aggravated, presenting gill, fin and tail hemorrhage; furthermore, in some cases fish lost their appetite, presented exophthalmia and bulky belly. After receiving baths with hexanic extract for four days, the signs of infection disappeared in 80% of the fish, recovering their original health state (Table 1).

In part 1 of the second phase, the injuries and signs that the aquarium 6 fish presented, after being inoculated, disappeared at 72 h. Twenty percent of the fish did not overcome the infection (Table 1).

In aquarium 7, where live *O. capillare* alga was introduced seven days before inoculating the fish, initially, the reaction of the individuals was of stress; nevertheless, after 24 h they started feeding on it. When being inoculated with the established dose

alimento comercial para peces por el método de evaporación de alcohol, descrito por Marañón y Maya-Peña.³³ Se mezclaron 100 g de alimento seco con 100 mL del extracto alcohólico del alga, se dejó evaporar el alcohol para que el extracto se incorporara al tratamiento, y se empezó a administrar al día siguiente del inóculo, cuando los peces presentaron signos de infección, dos veces al día durante siete días.

A partir de ese momento se registraron los cambios de comportamiento, los signos y lesiones causados por la infección que mostraban los individuos, tanto del grupo testigo como de los experimentales.

Posteriormente se aplicó una prueba estadística de una vía de la varianza por rangos de Kruskal Wallis, para evaluar si existía diferencia significativa entre todos los tratamientos, incluyendo el grupo testigo. Después se realizó una comparación múltiple de las medias obtenidas de la suma de rangos de Wilcoxon, con base en la siguiente fórmula:

$$R_n - R_m \geq Z \sqrt{(N(N+1)/12) * (1/N_n + 1/N_m)}$$

Resultados

Los peces del grupo testigo presentaron signos generales de bacteriosis, provocados por el estrés experimental: edema en la piel, aletas erizadas, anorexia, comportamiento nervioso. A las 24 h de haber sido inoculados, los peces *C. auratus* recuperaron el estado inicial de salud.

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

En el acuario 2, grupo testigo, a las 24 h de ser inoculados todos los peces *C. auratus*, se presentaron signos generales de infección bacteriana. Al no aplicarse tratamiento, la infección progresó en un lapso de 72 h hasta la muerte de 80% de los peces del acuario, con presencia de los siguientes signos: piel opaca, descamación, hemorragia en aletas y cola, exoftalmia, branquias oscuras, vientre abultado, anorexia, comportamiento anormal, nado errático, boqueo y mucosidad, el 20% restante recuperó el estado inicial de salud (Cuadro 1).

En la fase 1, los peces del acuario 3 presentaron signos generales de infección bacteriana 24 h después de ser inoculados: descamación, hemorragia en aletas y cola, exoftalmia, vientre abultado, anorexia, comportamiento anormal, nado errático y mucosidad (Cuadro 1).

Los peces del acuario 4 presentaron signos de

of the problem bacteria, they presented signs of the infectious disease and only three of the ten fish survived in a period of 72 h (Table 1).

In part 2 of the second phase, all fish were treated after being experimentally infected with the dose of *V. fluvialis* previously established.

In aquarium 8, the general signs of infection appeared 24 h after the fish were inoculated. The applied treatment was efficient in 70% of the fish, at 72 h of initiating the treatment (Table 1).

When the fish of aquarium 9 manifested general signs of infection, live alga was added. In this case, although fish consumed the alga, 50% of them did not react to the treatment and died (Table 1).

Finally, fish from aquarium 10, after manifesting signs of infection at 24 h of inoculation, they overcame the infection four days after the treatment, surviving 90% of them (Table 1).

To perform the corresponding statistical analysis

infección 24 h después de haber sido inoculados. Se suministró el tratamiento inmediatamente después de la manifestación de los signos. Estos peces sufrieron reacciones muy violentas, como protuberancias en el área de la inyección y descontrol temporal en las funciones motrices; por lo tanto, la infección bacteriana no fue superada. Se presentaron condiciones similares a las del grupo testigo (Cuadro 1).

En el acuario 5, los peces ya inoculados presentaron signos generales de bacteriosis a las 24 h. Dentro de las siguientes 36 h, el cuadro clínico de este grupo se agravó, presentando hemorragia en las branquias, aletas y cola, además de que en algunos casos los peces perdieron el apetito, presentaron exoftalmia y vientre abultado. Después de recibir los baños con el extracto hexánico durante cuatro días, los signos de infección desaparecieron en 80% de los peces, que recuperaron su estado de salud inicial (Cuadro 1).

Cuadro 1

PORCENTAJE DE SIGNOS Y LESIONES DE PECES *Carasiuss auratus* INOCULADOS CON 10^4 ufc/mL Y

TRATADOS CON *O. capillare* EN SUS DISTINTAS FORMAS

PERCENTAGE OF SIGNS AND LESIONS IN *Carasiuss auratus* FISH INOCULATED WITH 10^4 cfu/mL

AND TREATED WITH *O. capillare* IN ITS DIVERSE WAYS

Characteristics	Sign or lesion	Control	3	4	5	6	7	8	9	10
Color	Opaque	100	60	100	0	0	70	30	30	0
Skin	Protuberance	0	0	100	0	0	0	0	0	0
Scales	Bristled	20	30	100	20	80	30	70	50	80
Scales	Peeling	80	70	0	80	20	70	30	50	20
Fins and tail	Eroded	40	40	10	70	0	80	20	70	40
Fins and tail	Hemorrhage	60	60	90	30	10	20	20	30	10
Mouth	Gasping	100	0	100	20	20	20	20	0	0
Gills	Dark	40	0	0	0	0	40	0	20	10
Gills	Hemorrhage	60	60	40	20	20	20	20	20	10
Eyes	Exophthalmia	100	100	100	100	20	70	40	100	20
Body	Bulky bellied	100	100	100	40	0	100	20	100	20
Apetite	Anorexia	100	70	80	30	20	20	0	20	20
Behavior	Nervious	10	70	0	100	80	100	70	100	90
Behavior	Abnormal	90	30	100	0	20	0	30	0	10
Swim	Slow	0	20	0	0	10	0	20	0	10
Swim	Erratic	100	80	50	60	20	100	30	100	20
Secrecions	Mucosity	90	100	100	70	40	100	20	50	10
Survival	Dead	80	80	80	20	20	70	30	50	10

Aquarium 3: Hexanic ext. *O. capillare* food via; Aquarium 4: Hexanic ext. *O. capillare* intramuscular via; Aquarium 5: Hexanic ext *O. capillare* baths via; Aquarium 6: dried *O. capillare* before the inoculation; Aquarium 7: live *O. capillare* before the inoculation; Aquarium 8 dried *O. capillare* after the inoculation; Aquarium 9: live *O. capillare* after the inoculation, Aquarium 10: Alcoholic extract with *O. capillare*.

to the *in vivo* tests, arbitrary values were allocated for each one of the signs and injuries presented. Thus, with the arbitrary values proposed, the numeric conversion of the signs and injuries registered per treatment at 72 h that *C. auratus* fish were inoculated with 10^4 cfu/mL of *V. fluvialis* was done.

When performing the quantitative transformation it was observed that differences exist between treatments; nevertheless, it was required to apply a statistical test to prove if there are really significant differences between the nine treatments,

Because the obtained values do not have normal distribution, a non parametric statistical analysis was instrumented, based on a Kruskal Wallis one-way variance analysis by ranks and was applied to the obtained data of the Wilcoxon rank sum test (Table 2).

The Kruskal Wallis analysis shows that there are significant differences between treatments by obtaining a $Pr > \text{Chi-square} < 0.0001$ (Table 2), accepting the H_0 which mentions that at least one of the treatments is different. Nevertheless, it is still unknown between which treatments difference exists; therefore, a multiple comparison was done between treatments (Table 3).

For the multiple comparison it is necessary to obtain the subtraction of each one of the possible comparisons and, at the same time, compare it with the critical value of each one of them (Table 4). The multiple comparison analysis of Kruskal Wallis showed that a significant difference exists between the control and the hexanic extract of *O. capillare* administered baths via; between the control and dried *O. capillare* administered food via before inoculum; between control and dried *O. capillare* administered food via after the inoculum and between control and alcoholic extract of *O. capillare* administered food via (Table 4).

This same analysis shows that significant differences exist between the hexanic extract of *O. capillare* administered food via and dried *O. capillare* administered food via before inoculum, and the first with the alcoholic extract of *O. capillare* administered food via (Tables 2 and 4).

Finally, the statistical analysis showed that significant differences exist between the hexanic extract of *O. capillare* administered intramuscularly and the hexanic extract of *O. capillare* administered bath via; between the hexanic extract of *O. capillare* administered intramuscularly and dried *O. capillare* administered food via before inoculum; between the hexanic extract of *O. capillare* administered intramuscularly and dried *O. capillare* administered food via after the inoculum; between the hexanic extract of *O. capillare* administered intramuscularly and the alcoholic extract of *O. capillare* administered food via (Tables 2 and 4).

En la parte 1 de la segunda fase, las lesiones y los signos que presentaron los peces del acuario 6, después de ser inoculados, desaparecieron a las 72 h. En 20% de los peces no se superó la infección (Cuadro 1).

En el acuario 7, en donde se introdujo el alga *O. capillare* viva siete días antes de inocular a los peces, inicialmente la reacción de los individuos fue de estrés; sin embargo, a las 24 h comenzaron a alimentarse de ella. Al ser inoculados con la dosis establecida de la bacteria problema, presentaron los signos de enfermedad infecciosa y sólo sobrevivieron tres de los diez peces en un periodo de 72 h (Cuadro 1).

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

En el acuario 8, los signos generales de infección aparecieron 24 h después de haber sido inoculados los peces. El tratamiento aplicado tuvo efectividad en 70% de los peces, a las 72 h de iniciado el tratamiento (Cuadro 1).

Cuando los peces del acuario 9 manifestaron signos generales de infección, se agregó el alga viva. En este caso, aunque los peces consumieron el alga, 50% de ellos no reaccionaron al tratamiento y murieron (Cuadro 1).

Por último, los peces del acuario 10, después de manifestar signos de infección a las 24 h de la inoculación, superaron la infección cuatro días después del tratamiento, sobreviviendo 90% de ellos (Cuadro 1).

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

Al efectuar la transformación cuantitativa se observó que existen diferencias entre los tratamientos; sin embargo, se requirió aplicar una prueba estadística para comprobar si realmente existen diferencias significativas entre los nueve tratamientos.

Debido a que los valores obtenidos no tienen distribución normal, se instrumentó un análisis estadístico no paramétrico, basado en el análisis de una vía de la varianza por rangos de Kruskal Wallis y se aplicó a los datos obtenidos la prueba de Wilcoxon de suma de rangos (Cuadro 2).

El análisis de Kruskal Wallis muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos al obtener una $Pr > \text{Ji-cuadrada} < 0.0001$ (Cuadro 2), aceptando la H_0 que menciona que al menos uno de los tratamientos es diferente. Sin embargo, aún no se sabe entre cuáles tratamientos existe diferencia, por

No significant differences were found in any of the other comparisons between treatments.

Discussion

The presence of general signs of bacterial infection²⁸ in the fish of the control group was owed to the mechanical shock which implied the injection with saline sterile solution. It may be considered that this infection signs in such individuals, that disappeared in 72 h, were originated by the defense decrease of fish, due to experimental stress,⁷ in presence of bacteria that belong to the normal flora of fish.

In tests performed with *C. auratus* fish using hexanic extract of *O. capillare*, results obtained in the

lo que se realizó una comparación múltiple entre tratamientos (Cuadro 3).

Para la comparación múltiple es necesario obtener la resta de cada una de las posibles comparaciones y, a su vez, cotejarla con el valor crítico para cada una de ellas (Cuadro 4). El análisis de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis mostró que existe diferencia significativa entre el testigo y el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía baños; entre el testigo y el *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo; entre el testigo y el *O. capillare* seco administrado vía alimento después del inóculo y entre el testigo y el extracto alcohólico de *O. capillare* administrado vía alimento (Cuadro 4).

Este mismo análisis demuestra que existen dife-

Cuadro 2

SUMA DE RANGOS DE WILCOXON PARA LOS TRATAMIENTOS
WILCOXON RANK SUM FOR TREATEMENTS

<i>Treatment</i>	<i>N</i>	<i>Sum of ranks</i>	<i>Expected value as NH</i>	<i>Standard deviation as NH</i>	<i>Mean</i>
Control	10	773.50	455.0	77.609413	77.350
Hexanic Food	10	597.50	455.0	77.609413	59.750
Hexanic (intr.)	10	752.50	455.0	77.609413	75.250
Hexanic (Bth)	10	386.50	455.0	77.609413	38.650
Dried alga (BT)	10	205.00	455.0	77.609413	20.500
Live alga (BT)	10	483.00	455.0	77.609413	48.300
Dried alga (AT)	10	273.00	455.0	77.609413	27.300
Live alga (AT)	10	426.00	455.0	77.609413	42.600
Alcoholic food	10	198.00	455.0	77.609413	19.800

NH: Null hypothesis.
Intr.: Intramuscular
Bth : Baths

BT: Before treatment
AT: After treatment

Cuadro 3

ANÁLISIS DE UNA VÍA DE LA VARIANZA POR RANGOS DE KRUSKAL WALLIS
KRUSKAL WALLIS ONE-WAY VARIANCE ANALYSIS BY RANKS

<i>Kruskal Wallis test</i>	
Chi-square	55.8203
Freedom degrees	8
Pr > Chi-square	< .0001

food and intramuscular via were negative, since in the first case fish rejected the food and in the second presented violent reactions during the administration of the treatment. The administration of hexanic extract in baths was the most effective, with significant difference between antibacterial activity of this administration via in comparison to the intramuscular administration ($36.60 \geq 36.1069$) and with the control ($38.70 \geq 36.1069$). The required costs of this type of treatment in great proportion ponds, would be very high due to the great quantity of necessary extract. Taking into consideration that production cost of hexanic extract of *O. capillare* is higher than commercial antibiotics, the first one would not be acquired or utilized by aquaculturists.

Dried *O. capillare* added in the food, had greater effectiveness than hexanic extract, which ratifies the antibacterial capacity of this alga; according to Abutbul *et al.*,¹⁸ who, while utilizing ethyl-acetate extract of grinded, dried leaves of *Rossmarinus officinalis* and added to the food, obtain greater effectiveness on the leaves than on the extract.

The treatment that affected before the inoculum, as well as the administered after the inoculum of dried *O. capillare* added to the food, showed significant differences when applying the Kruskal Wallis multiple comparison analysis, with respect to the control group; also, both treatments showed significance when compared with the treatment of hexanic extract administered intramuscularly; nevertheless, only the previous treatment to the inoculum showed significant differences when comparing it to the treatment with hexanic extract administered food via ($39.25 \geq 36.1069$), what shows that dried *O. capillare* added to the food worked better before experimentally generating the infection caused by *V. fluvialis* than after it.

The treatments in which live *O. capillare* alga was submerged in aquariums before and after the inoculum, were considered non viable, since fish did not overcome the infection. Practically, the behavior of both groups during the hole experiment was similar to the control group, since the existence of significant differences between treatments was not statistically shown.

One of the treatments that had greater effectiveness against *V. fluvialis* was the alcoholic extract of alga, administered with the food, with 90% of survival, confirming the results of the tests *in vitro*, since this was the extract which registered inhibition halos of greater diameter after the hexanic extract of *O. capillare*. This extract was mainly active with strains of Vibrionaceae family.²⁷

The Kruskal Wallis multiple comparisons show that greater difference exist from the control with alcoholic extract ($57.55 \geq 36.1069$) than with other, which

rencias significativas entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía alimento y *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo, y del primero con el extracto alcohólico de *O. capillare* administrado vía alimento (Cuadros 2 y 4).

Por último, el análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía baños; entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo; entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el *O. capillare* seco administrado vía alimento después del inóculo; entre el extracto hexánico de *O. capillare* administrado vía intramuscular y el extracto alcohólico de *O. capillare* administrado vía alimento (Cuadros 2 y 4).

No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las otras comparaciones entre tratamientos.

Discusión

La presencia de signos generales de infección bacteriana²⁸ en los peces del grupo testigo se debió al choque mecánico que implicó la inyección con solución salina estéril. Se puede considerar que estos signos de infección en tales individuos, que desaparecieron en 72 h, fueron originados por la disminución de defensas de los peces, debida al estrés experimental,⁷ en presencia de bacterias que forman parte de la flora normal de los peces.

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

El *O. capillare* seco adicionado en el alimento, tuvo mayor efectividad que el extracto hexánico, lo que ratifica la capacidad antibacteriana de esta alga; concordando con Abutbul *et al.*,¹⁸ quienes al utilizar el

Cuadro 4

ANÁLISIS DE KRUSKAL WALLIS ENTRE TRATAMIENTO
KRUSKAL WALLIS ANALYSIS BETWEEN TREATMENT

<i>Treatment</i>	<i>Kruskal Wallis</i>	<i>Significance</i>
A2-A3	$17.60 \geq 36.1069$	Non significant
A2-A4	$02.10 \geq 36.1069$	Non significant
A2-A5	$38.70 \geq 36.1069$	Significant
A2-A6	$56.85 \geq 36.1069$	Significant
A2-A7	$29.05 \geq 36.1069$	Non significant
A2-A8	$50.05 \geq 36.1069$	Significant
A2-A9	$34.75 \geq 36.1069$	Non significant
A2-A10	$57.55 \geq 36.1069$	Significant
A3-A4	$-15.50 \geq 36.1069$	Non significant
A3-A5	$21.10 \geq 36.1069$	Non significant
A3-A6	$39.25 \geq 36.1069$	Significant
A3-A7	$11.45 \geq 36.1069$	Non significant
A3-A8	$32.45 \geq 36.1069$	Non significant
A3-A9	$17.15 \geq 36.1069$	Non significant
A3-A10	$39.95 \geq 36.1069$	Significant
A4-A5	$36.60 \geq 36.1069$	Significant
A4-A6	$54.75 \geq 36.1069$	Significant
A4-A7	$26.95 \geq 36.1069$	Non significant
A4-A8	$47.95 \geq 36.1069$	Significant
A4-A9	$32.65 \geq 36.1069$	Non significant
A4-A10	$55.45 \geq 36.1069$	Significant
A5-A6	$18.15 \geq 36.1069$	Non significant
A5-A7	$-9.65 \geq 36.1069$	Non significant
A5-A8	$11.35 \geq 36.1069$	Non significant
A5-A9	$-3.95 \geq 36.1069$	Non significant
A5-A10	$18.85 \geq 36.1069$	Non significant
A6-A7	$-27.80 \geq 36.1069$	Non significant
A6-A8	$-6.80 \geq 36.1069$	Non significant
A6-A9	$-22.10 \geq 36.1069$	Non significant
A6-A10	$00.70 \geq 36.1069$	Non significant
A7-A8	$21.00 \geq 36.1069$	Non significant
A7-A9	$05.70 \geq 36.1069$	Non significant
A7-A10	$28.50 \geq 36.1069$	Non significant
A8-A9	$-15.30 \geq 36.1069$	Non significant
A8-A10	$07.50 \geq 36.1069$	Non significant
A9-A10	$22.80 \geq 36.1069$	Non significant

indicates greater effectiveness of this treatment.

When comparing the alcoholic extract with the hexanic extract administered food via (39.95 $\geq$ 36.1069) it was observed that the difference was greater than the produced by the dried *O. capillare* administered food via before the inoculum, compared to the hexanic extract administered food via (39.25 $\geq$ 36.1069).

The group of fish treated with the alcoholic extract (55.45 $\geq$ 36.1069) presented greater difference, comparatively with the registered in the fish treated with hexanic extract administered intramuscularly.

For the aforementioned, it can be said that the most effective treatments against *V. fluvialis* were the ones used in aquariums 6 and 10. These treatments (dried alga incorporated in the food before the inoculum and alcoholic extract added to the food) are the more viable for aquacultures, since the preparation of the alcoholic extract as well as the food, is simple, practical and economical. Its effectiveness can be proved based on the statistical analysis, in which both treatments show significant differences when comparing them with the control and with the hexanic extract applied food via or intramuscularly.

Between the two aforementioned treatments there is no significant difference, even the mean are similar; therefore, it can not be said that a treatment is better than the other, since both are effective for the control of bacterial infections provoked by *V. fluvialis*.

It is important to mention that by proving the capacity of *O. capillare*, two principal functions of this alga as a treatment arise: one prophylactic, based in dried grounded alga added to the food, and another of therapeutic order based on the treatment of the alcoholic extract added to the food.

Until the capacity of bacteria to generate resistant plasmids to *O. capillare* is proven, its use can not be recommended as prophylactic, but it can be used as therapy. The treatment of the alcoholic extraction added in the food is specifically recommended as control of provoked infections by bacteria of the *Vibrio* genus.

It is necessary to instrument a pilot study to prevent and controlled bacterial infections in aquaculture farms, due to its low cost of production, since any of these centers can have at their disposal a pond for the production of *O. capillare* alga.

Referencias

1. Torreola J J. Aspectos generales de la patología infecciosa. Patología en acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura Madrid: Ed. CATCYT, 1988.
2. Roberts R J. Patología de los peces. Madrid: Ed. Mundiprensa, 1981.
3. Lee J V, Shread P, Furniss A L, Bryant T N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym.

extracto de etil-acetato de las hojas de *Rossmarinus officinalis* secas, molidas y adicionadas en el alimento, obtienen mayor efectividad en las hojas que en el extracto.

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

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

Uno de los tratamientos que tuvo mayor efectividad en contra de *V. fluvialis* fue el extracto alcohólico del alga, administrado junto con el alimento, con 90% de sobrevivencia, confirmando los resultados de las pruebas *in vitro*, ya que éste fue el extracto que registró halos de inhibición de mayor diámetro después del extracto hexánico de *O. capillare*. Este extracto tuvo actividad principalmente con las cepas de la familia Vibrionaceae.²⁷

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

Al comparar el extracto alcohólico con el extracto hexánico administrado vía alimento (39.95 $\geq$ 36.1069) se observó que la diferencia fue mayor que la producida por el *O. capillare* seco administrado vía alimento antes del inóculo, comparada con el extracto hexánico administrado vía alimento (39.25 $\geq$ 36.1069).

El grupo de peces tratados con el extracto alcohólico (55.45 $\geq$ 36.1069) presentó mayor diferencia, comparativamente con la registrada en los peces tratados con extracto hexánico administrado vía intramuscular.

Por lo anterior, se puede decir que los tratamientos más efectivos en contra de *V. fluvialis* fueron los utilizados en los acuarios 6 y 10. Estos tratamientos

- Group F Vibrios Ef6). J Appl Bacteriol 1981; 50: 73-94.
4. Lamothe R. Importancia de la parasitología en el desarrollo de la acuicultura. México (DF): Instituto de Biología UNAM, 1991.
 5. Romero J J, Salas T A. Estudio de frecuencia de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aislados en ambientes marinos. V Congreso Nacional de Biotecnología. 1993 abril 27; Puerto Vallarta (Jalisco) México. Puerto Vallarta (Jalisco) México: Sociedad Mexicana de Biotecnología, 1993;3: 3-4.
 6. Madigan T M, Martinko M J, Parker J. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice Hall, 2000.
 7. Brown L. Acuicultura para veterinarios: Producción y clínica de peces. Zaragoza España: Ed. Acribia S A, 2000.
 8. Davis J. Interspecific gene transfer in nature and in the laboratory . Fate of engineered microorganisms in the environment. Recent advances in microbial ecology. Proceeding of the 5th International Symposium of Microbial Ecology; 1990 August 29; Kioto (Japan). Kioto (Japan): Japanese Society of Microbiology, 1990:122-125.
 9. Miranda C D, Zemelman R. Bacterial Resistance to Oxytetracycline in Chilean Salmon Farming. Aquaculture 2002;212: 31-47.
 10. Álvarez T P, Ramírez C, Orbe A. Desarrollo de la Acuicultura en México y perspectiva de la acuicultura rural. FAO-UTC: Taller Acuicultura Rural en Pequeña Escala. México (DF): Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT), 1999.
 11. Mirelles P F, Mirelles A, Gomes M C, Dias V, Brum P R, Almeida E *et al*. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. Braz J Microbiol 2002;33: 287-293.
 12. Austin B, Billaud A C. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of *Planococcus* recovered from sea water. J Fish Dis 1990; 13 :553-556.
 13. Lima F J, Carvalho A F, Freitas S M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. Braz J Microbiol 2002; 33 : 311-31.
 14. Immanuel G, Vincylbai V C, Sivaram V, Palavesam A, Marian M P. Effect butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture 2004; 236: 553-556.
 15. Mesmar M N, Abussaud M. The antibiotic activity of some aquatic plants and algal extracts. Jordan Qatar University. Sci J 1991; 11:155-160.
 16. Samira Etahiri, Bultel-Ponce V, Caux C, Guyot M. New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. J Natural Prod 2001; 64:1024-1027.
 17. Wijffels R H, Barbosa M, Janssen M, Wessels H S *et al*. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). Biomol Eng 2003; 20: 255-259.
 18. Abutbul S, Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Zilberg D. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp). Aquaculture 2004; 238: 97-105.
- (alga seca incorporada en el alimento antes del inóculo y extracto alcohólico adicionado al alimento) son los más viables para los acuicultores, ya que la preparación, tanto del extracto alcohólico como de los alimentos, es sencilla, práctica y económica. Se puede comprobar su efectividad con base en el análisis estadístico, en el que ambos tratamientos muestran diferencias significativas al compararlos con el testigo y con el de extracto hexánico aplicado vía alimento e intramuscular.
- Entre los dos tratamientos antes mencionados no existe diferencia significativa, incluso las medias son similares, por lo que no se puede afirmar que un tratamiento sea mejor que el otro, ya que ambos son eficaces para el control de infecciones bacterianas provocadas por *V. fluvialis*.
- Es importante mencionar que al probar la capacidad de *O. capillare*, surgen dos funciones principales de esta alga como tratamiento: una profiláctica, basada en el alga seca molida y adicionada al alimento, y la otra de orden terapéutico con base en el tratamiento del extracto alcohólico adicionado al alimento.
- Hasta no comprobarse la capacidad de las bacterias para generar plásmidos resistentes al *O. capillare*, no se recomienda su uso como profilaxis, pero sí de forma terapéutica. Se recomienda específicamente el tratamiento de la extracción alcohólica adicionada en el alimento como control de infecciones provocadas por bacterias del género *Vibrio*.
- Es necesario instrumentar el estudio piloto para prevenir y controlar infecciones bacterianas en granjas acuícolas, debido a sus bajos costos de producción, ya que cualquiera de estos centros puede disponer de un estanque para la producción del alga *O. capillare*.
-
19. Abutbul S, Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Ofir R, Zilberg D. Screening of desert plants for use against bacterial pathogen fish. Isr J Aquaculture-Bamidgheh; 2005; 57(2): 71-80.
 20. Nascimento G F, J Locatelli C P, Freitas S L G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals. Bra J Microbiol 2002; 33 (4) :311-314.
 21. Mtambo M M, Mushi E J, Kinabo L D B, Maeda-Machangú A, Mwamengle G L M, Yongolo M G S *et al*. Evaluation of the efficacy of the crude extracts of *Cap-sicum frutescens*, *Citrus limon* and *Opuntia vulgaris* against Newcastle disease in domestic fowl in Tanzania. J Ethnopharmacol 2002; (68): 55-61.
 22. Gauthier-Lievre L. Oedogoniaceae Africaines. 2nd ed. Berlin, Germany: J. Cramer. 1963.
 23. Hirn K T. Monographie der Oedogoniaceen. New York: J. Cramer, Wihildon & Wesley, 1960.
 24. Tiffany L H, Britton M E. The algae of Illinois. 2nd ed. Chicago: The University of Chicago, 1952.
 25. Smith M G. Manual of phycology an introduction to the algae and their biology. New York: The Ronald Press Company, 1992.

26. Martínez E B. Nuevos medicamentos y su aplicación en microdosis. México (DF): Ed. Herbal, 1998.
27. Negrete R P, Romero J J, Arredondo, López S R, Figueroa G. Análisis *in vitro* de la actividad antibacterial *Oedogonium capillare* contra bacterias patógenas de peces. Vet Mex 2006;37:209-221.
28. Roberts R J. Introduction fish. In: Inglis W, Roberts R J, Bromage R N, editors. Bacterial diseases of fish. London: London Academic Press,1993: 1-20.
29. Negrete R P, Romero J J, Arredondo F J. Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) para producir infección en pez Dorado (*Carassius auratus*). Vet Méx 2004; 35:31-43.
30. APHA. Standard methods for examination of water and wastewater. Washington D C:American Public Health, 1992;583-589.
31. Michael C. Development of bacteria in fish water during a standarized experimental infection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida*. Microbial diseases of fish. England, London: Ed. Roberts R J, 1982; 45-55.
32. Negrete R P, Romero J J. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio* con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. Rev Hidrobiológica 1998; 8: 1-10.
33. Marañón H S, Maya-Peña P E. Efectos de pH sobre la proporción de sexos, el crecimiento y la sobrevivencia del guppy *Poecilia reticulata* Peters 1859. Rev Hidrobiológica 1999;8:125-132.