

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**



**“RESPUESTA PRODUCTIVA, HEMATOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DEL  
SÁBALO COLA ROJA (*Brycon amazonicus*) POR LA INCLUSIÓN DE ACEITE  
ESENCIAL DE *Origanum vulgare*”**

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO**

**CARLA FABIOLA ESPINOZA ORTIZ**

**LIMA – PERÚ**

**2022**

---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art.24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

## Document Information

---

<b>Analyzed document</b>	Tesis Pregrado - Carla Fabiola Espinoza Ortiz FINAL PARA SUSTENTACIÓN (1).docx (D143023668)
<b>Submitted</b>	8/17/2022 10:59:00 PM
<b>Submitted by</b>	julio gonzales
<b>Submitter email</b>	jugofe@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	0%
<b>Analysis address</b>	jugofe.unalm@analysis.urkund.com

## Sources included in the report

---

### Entire Document

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

PESADO

SOLUCIONES EN ASPERSORES

INCORPORACIÓN

SECADO

ENVASADO

ROTULADO

ALMACENAMIENTO

"RESPUESTA PRODUCTIVA, HEMATOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DEL SÁBALO COLA ROJA (*Brycon amazonicus*) POR LA INCLUSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare*"

Presentado por:

CARLA FABIOLA ESPINOZA ORTIZ

TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO

Lima – Perú 2022 UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

"RESPUESTA PRODUCTIVA, HEMATOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DEL SÁBALO COLA ROJA (*Brycon amazonicus*) POR LA INCLUSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare*"

Presentado por:

CARLA FABIOLA ESPINOZA ORTIZ

Sustentado y aprobado por el siguiente jurado evaluador:

Mg. Sc. Jessie Marina Vargas Cárdenas Presidente

Mg. Sc. Elsa Victoria Vega Galarza Dra. Verónica Sierralta Chichizola Miembro Miembro

Dr. Blgo. Julio Gonzales Fernández Mg. Christian Jesús Fernández Méndez Asesor Co - Asesor

DEDICATORIA

A mi abuelito Ernesto, que en paz descanse, siempre me entregó un amor puro y sincero. A mi abuelita Pilar, por todo el amor y comprensión. A mis padres, Cesar y Elizabeth, y mi hermano Jair, por la compañía y motivación en cada uno de los pasos que doy. A mis tios, que siempre me quisieron como hermana menor, sus sabios consejos me sirvieron de guía para seguir mi camino. A mi compañero, amigo y confidente Luis Antonio; si no fuera por él, hubiera perdido la calma.

AGRADECIMIENTOS Agradecerle a Dios, porque a pesar de las circunstancias y adversidades, me mantuvo fuerte y decidida.

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LAMOLINA

## FACULTAD DE PESQUERÍA

### “RESPUESTA PRODUCTIVA, HEMATOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DEL SÁBALO COLA ROJA (*Brycon amazonicus*) POR LA INCLUSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare*”

**Presentado por:**

**CARLA FABIOLA ESPINOZA ORTIZ**

**Sustentado y aprobado por el siguiente jurado evaluador:**

---

**Dra. Jessie Marina Vargas Cárdenas**  
**Presidente**

---

**Mg. Sc. Elsa Victoria Vega Galarza**  
**Miembro**

---

**Dra. Verónica Sierralta Chichizola**  
**Miembro**

---

**Dr. Blgo. Julio Gonzales Fernández**  
**Asesor**

---

**Mg. Christian Jesús Fernández Méndez**  
**Co - Asesor**

## DEDICATORIA

*A mi abuelito Ernesto, que en paz descansa, siempre me entregó un amor puro y sincero. A mi abuelita Pilar, por todo el amor y comprensión. A mis padres, Cesar y Elizabeth, y mi hermano Jair, por la compañía y motivación en cada uno de los pasos que doy. A mis tíos, que siempre me quisieron como hermana menor, sus sabios consejos me sirvieron de guía para seguir mi camino. A mi compañero, amigo y confidente Luis Antonio; si no fuera por él, hubiera perdido la calma.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecerle a Dios, porque a pesar de las circunstancias y adversidades, me mantuvo fuerte y decidida.

A los miembros del jurado Mg. Sc. Jessie Marina Vargas Cárdenas, Mg. Sc. Elsa Victoria Vega Galarza y Blga. Verónica Sierralta Chichizola, por siempre darme su apoyo en todacircunstancia.

A mis asesores: Dr. Blgo. Julio Gonzales Fernández, desde que inicie la carrera, me motivo a continuar con ímpetu y dedicación; Mg. Christian Jesús Fernández Méndez, por su paciencia y apoyo incondicional.

Al personal del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), por siempre darme la mano desinteresadamente, alentándome y ensañándome muchas técnicas en el desarrollo de la tesis.

A mi mejor amiga, Paola Espinoza, por ser quien me apoyo incondicional desde los últimos años de la universidad y seguir apoyándome hoy en día.

## FINANCIAMIENTO

*Esta tesis ha sido financiada por el Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE. A través de su unidad ejecutora ProCiencia, con contrato N° 116-2018-FONDECYT-BM-IADT-SE en el marco del proyecto de investigación “Mejoramiento de la productividad y resistencia a bacterias en el cultivo de sábalo *Brycon amazonicus* mediante el uso de aceites esenciales como inmunoestimulantes en el departamento de Loreto” ejecutado por el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP).*

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	6
FINANCIAMIENTO .....	7
ÍNDICE GENERAL .....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS .....	14
ÍNDICE DE ANEXOS .....	15
RESUMEN .....	16
ABSTRACT .....	17
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISION DE LITERATURA .....	3
2.1. <i>Acuicultura en la Amazonía Peruana</i> .....	3
2.2.1. <i>Morfología</i> .....	4
2.2.2. <i>Alimentación</i> .....	5
2.2.3. <i>Sistemas de cultivo</i> .....	7
2.3. <i>Producción de sábalo en el Perú</i> .....	9
2.4. <i>Sistema inmune</i> .....	9
2.5. <i>Hematología en peces</i> .....	10
2.5.1. <i>Eritrograma</i> .....	11
2.5.2. <i>Leucograma</i> .....	11
2.5.3. <i>Plasma sanguíneo</i> .....	12
2.6. <i>Problemática del uso de antimicrobianos</i> .....	12
2.7. <i>Enfermedades bacterianas</i> .....	13
2.8.2. <i>Clasificación taxonómica</i> .....	14
2.8.3. <i>Signos clínicos</i> .....	14

2.8.4.	<i>Prevención y profilaxis empleada</i> .....	15
2.9.	<i>Inmunoestimulantes</i> .....	15
2.9.1.	<i>Aditivos inmunoestimulantes</i> .....	16
2.10.	<i>Aceites esenciales</i> .....	16
2.10.1.	<i>Uso de aceites esenciales en la acuicultura</i> .....	17
2.11.1.	<i>Características generales del orégano</i> .....	18
2.11.2.	<i>Clasificación taxonómica</i> .....	18
2.11.3.	<i>Aceite esencial del orégano</i> .....	19
III.	<b>METODOLOGÍA</b> .....	20
3.1.	<i>Lugar y duración</i> .....	20
3.2.	<i>Animales de experimentación</i> .....	21
3.3.	<i>Instalaciones</i> .....	21
3.5.	<i>Alimentación</i> .....	21
3.5.1.	<i>Elaboración de soluciones de aceite esencial</i> .....	22
3.5.2.	<i>Inclusión del aceite esencial en el alimento</i> .....	22
3.6.	<i>Diseño experimental</i> .....	23
3.7.	<i>Monitoreo de calidad de agua</i> .....	24
3.8.	<i>Determinación de los parámetros productivos</i> .....	26
3.8.1.	<i>Biomasa</i> .....	26
3.8.2.	<i>Ganancia de Peso Total (GPT)</i> .....	26
3.8.3.	<i>Ganancia de Peso Diario (GPD)</i> .....	26
3.8.4.	<i>Consumo de Alimento Diario (CAD)</i> .....	27
3.8.5.	<i>Índice de Conversión Alimenticia Aparente (ICAA)</i> .....	27
3.8.6.	<i>Tasa de Crecimiento Específico (TCE)</i> .....	27
3.8.7.	<i>Tasa de Crecimiento Relativo (TCR)</i> .....	28
3.8.8.	<i>Factor de Condición (K)</i> .....	28



3.8.9.	<i>Coeficientes de Variación de Peso (CVP)</i> .....	28
3.8.10.	<i>Sobrevivencia (S)</i> .....	28
3.8.11.	<i>Índices morfofisiológicos</i> .....	28
3.8.11.1.	<i>Índice Hepatosomático (IHS)</i> .....	29
3.8.11.2.	<i>Índice Viscerosomático (IVS)</i> .....	29
3.8.11.3.	<i>Índice de Grasa Visceral (IGV)</i> .....	29
3.9.	<i>Evaluación de parámetros fisiológicos</i> .....	29
3.9.1.	<i>Parámetros hematológicos</i> .....	30
3.9.1.1.	<i>Número de Eritrocitos (Eri)</i> .....	30
3.9.1.2.	<i>Porcentaje de Hematocrito (% Ht)</i> .....	31
3.9.1.3.	<i>Concentración de hemoglobina</i> .....	32
3.9.1.4.	<i>Índices hematimétricos</i> .....	33
-	<i>Volumen Corpuscular Medio (VCM)</i> .....	33
-	<i>Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)</i> .....	33
-	<i>Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)</i> .....	34
3.9.1.5.	<i>Número de leucocitos (Leu)</i> .....	34
3.9.2.	<i>Parámetros inmunológicos</i> .....	35
3.9.2.2.	<i>Plasma sanguíneo</i> .....	35
-	<i>Procedimientos de los ensayos bioquímicos</i> .....	36
3.10.	<i>Determinación de los parámetros proximales del músculo de los peces</i> .....	37
3.10.1.	<i>Humedad (HU)</i> .....	37
3.10.2.	<i>Extracto Etéreo o grasa (EE)</i> .....	37
3.10.3.	<i>Proteína Bruta (PB)</i> .....	37
3.10.4.	<i>Cenizas o Material Mineral (MM)</i> .....	38
3.11.	<i>Dosis Letal media (LD50)</i> .....	38
3.12.1.	<i>Soluciones bacterianas</i> .....	39

3.13.	<i>Procesamiento y análisis de datos</i> .....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	40
4.1.	<i>Calidad de agua</i> .....	40
4.2.	<i>Evaluación de la alimentación en el desempeño productivo y parámetros fisiológicos</i> .....	41
4.2.2.	<i>Análisis fisiológicos</i> .....	44
4.2.2.2.	<i>Parámetros inmunológicos</i> .....	46
4.2.3.	<i>Análisis de la composición proximal</i> .....	47
4.3.	<i>Desafío bacteriano</i> .....	49
4.3.1.1.	<i>Parámetros hematológicos</i> .....	49
4.3.1.2.	<i>Parámetros inmunológicos</i> .....	50
V.	CONCLUSIONES.....	53
VI.	RECOMENDACIONES .....	54
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
VIII.	ANEXOS .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Requerimiento de proteína/energía digestible en género <i>Brycon</i> .....	6
Tabla 2: Requerimientos nutricionales para alevino de la especie <i>Brycon Siebenthalae</i> .....	7
Tabla 3: Parámetros físico – químicos del agua para el cultivo de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> .....	8
Tabla 4: Ficha técnica para el cultivo de yamú <i>Brycon amazonicus</i> .....	8
Tabla 5: Comportamiento normal de los parámetros hematológicos del género <i>Brycon</i> ....	11
Tabla 6: Clasificación taxonómica de la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	14
Tabla 7: Clasificación taxonómica del orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	18
Tabla 8: Características físico – químicas del AE de orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	19
Tabla 9: Composición proximal de la dieta comercial utilizada en la experimentación .....	22
Tabla 10: Cantidades de AE de orégano, alcohol etílico de 96° y alimento balanceado para la preparación del alimento suplementado .....	22
Tabla 11: Nomenclatura utilizada para los tratamientos por dosis de aceite esencial .....	24
Tabla 12: Parámetros de calidad de agua .....	25
Tabla 13: Ficha técnica de Espectrofotómetro UV – Visible GENESYS 6 (Serie 335908) .....	32
Tabla 14: Análisis de los ensayos bioquímicos .....	36
Tabla 15: Parámetros de calidad de agua registrados durante el proceso de experimentación durante 42 días .....	40
Tabla 16: Parámetros productivos de juveniles de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> suplementados con aceite esencial de orégano <i>Origanum vulgare</i> en una dieta comercial durante 35 días .....	42
Tabla 17: Parámetros hematológicos de juveniles de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> suplementados con aceite esencial de orégano <i>Origanum vulgare</i> en una dieta comercial durante 35 días .....	45
Tabla 18: Parámetros inmunológicos de juveniles de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> suplementados con aceite esencial de orégano <i>Origanum vulgare</i> en una dieta comercial durante 35 días .....	46
Tabla 19: Composición proximal del músculo de juveniles de sábalo cola roja <i>Brycon</i>	

<i>amazonicus</i> suplementados con aceite esencial de orégano <i>Origanum vulgare</i> en una dieta comercial durante 35 días .....	48
Tabla 20: Supervivencia y parámetros hematológicos de juveniles de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> después de 7 días del desafío bacteriano con <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	49
Tabla 21: Parámetros inmunológicos de juveniles de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> .....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Juvenil de sábalo cola roja – <i>Brycon amazonicus</i> .....	4
Figura 2: Cosecha de sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> procedentes de la actividad acuícola en el año 2020 (PRODUCE, 2020). .....	9
Figura 3: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) – Iquitos (Perú). ...	20
Figura 4: Flujograma de proceso de inclusión de aceite esencial al alimento balanceado comercial. Elaboración propia. ....	23
Figura 5: Distribución de tratamientos y tanques al azar, en la zona de experimentación..	24
Figura 6: Conteo de eritrocitos en Cámara Neubauer – Métodos para el análisis hematológico en peces (Ranzani-Paiva <i>et al.</i> , 2013).....	30
Figura 7: Lectura de hematocrito en tubos capilares - Métodos para el análisis hematológico en peces (Ranzani-Paiva <i>et al.</i> , 2013).....	31
Figura 8: Pipeta Thomma para dilución de sangre, empleada para el conteo de leucocitos - Métodos para el análisis hematológico en peces (Ranzani-Paiva <i>et al.</i> , 2013). .....	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Preparación de anestésico: Eugenol (AE de clavo de olor). .....	75
Anexo 2: Evaluación de tiempo de inducción y recuperación del anestésico Tricaína en sábalo cola roja <i>Brycon amazonicus</i> . (Determinación de dosis óptima) .....	80
Anexo 3: Tanques de concreto, utilizados en el trabajo de investigación .....	83
Anexo 4: Filtros mecánicos utilizados en cada uno de los tanques experimentales.....	83
Anexo 5: Tapas de madera y malla para cada uno de los tanques experimentales.....	84
Anexo 6: Aceite esencial de orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	84
Anexo 7: Preparación del alimento balanceado – inclusión de AE de orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	85
Anexo 8: Procedimiento para el análisis de calidad de agua durante la experimentación. .	86
Anexo 9: Toma de muestras de sangre del zona peritoneal.....	87
Anexo 10: Procedimiento para los ensayos bioquímicos del plasma sanguíneo.....	88
Anexo 11: Procedimiento para la determinación del LD50 de la cepa de <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	89
Anexo 12: Instrucciones para la activación de la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 35654™) KWIKSTIK plus. ....	96
Anexo 13: Diferenciación y recuento de leucocitos en muestras de sangre.....	97
Anexo 14: Signos clínicos externos de la enfermedad, registrados luego del desafío bacteriano.....	98
Anexo 15: Signos clínicos internos de la enfermedad, registrados luego del desafío bacteriano.....	99

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos del aceite esencial (AE) de orégano *Origanum vulgare* como suplemento alimenticio en la dieta de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* sobre el desempeño productivo, estado de salud del pez y resistencia a la enfermedad septicémica producida por *Aeromonas hydrophila*. Los peces, con un peso y talla promedio inicial de  $156.4 \text{ g} \pm 18.4$  y  $21.9 \text{ cm} \pm 0.8$  respectivamente, fueron distribuidos de manera aleatoria en doce tanques de concreto (10 peces por tanque). Alimentados con una dieta comercial suplementada con 0%, 0.5%, 1.0% y 1.5% de aceite esencial de orégano durante 35 días. Al final de la experimentación, se obtuvo en la dieta control (0%) una mejor aceptación del alimento balanceado, además un mejor factor de condición, por ende los índices viscerosomático y de grasa visceral fueron más altos. Al mismo tiempo, la dosis más alta (1.5%) fue significativamente mayor respecto al porcentaje de hematocrito y concentración de hemoglobina, sin embargo el recuento de linfocitos fue mayor en la dosis más baja (0.5%). Se presentaron diferencias significativas en la acumulación de proteína en el músculo, presentando la dosis 0.5%, la más alta concentración en comparación a la dosis 1.5%. Todos los grupos suplementados con AE de orégano *Origanum vulgare* mostraron una sobrevivencia reducida después del desafío bacteriano con *A. hydrophila* en comparación con el grupo control, en mayor proporción las dosis de 0.5% y 1.5%. Estos resultados indicaron que el uso de AE de orégano *Origanum vulgare* podría mejorar los parámetros hematológicos en el cultivo de sábalo cola roja *Brycon amazonicus*, en menores dosis y tiempos experimentales más prolongados.

**Palabras clave:** suplemento alimenticio, desempeño productivo, parámetros hematológicos, sistema inmune, *Aeromonas hydrophila*.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effects of the essential oil (EO) of oregano *Origanum vulgare* as a dietary supplement in the feeding of juvenile red-tailed shad *Brycon amazonicus* on the productive performance, health status of the fish and resistance to the septicemic disease produced by *Aeromonas hydrophila*. The fish, with an initial average weight and length of  $156.4 \text{ g} \pm 18.4 \text{ cm}$  and  $21.9 \pm 0.8$  respectively, were randomly distributed in concrete tanks (10 fish per tank). They were fed a commercial diet supplemented with 0%, 0.5%, 1.0%, and 1.5% oregano essential oil for 35 days. At the end of the experimentation, a better acceptance of the balanced feed in the control diet (0%) was obtained, in addition to a better condition factor, therefore the viscerosomatic and visceral fat indices were higher. At the same time, the highest dose (1.5%) was significantly higher with respect to hematocrit percentage and hemoglobin concentration, however, the lymphocyte count was higher at the lowest dose (0.5%). Significant differences were shown in muscle protein accumulation, with the 0.5% dose having the highest concentration compared to the 1.5% dose. All groups supplemented with EO of oregano *Origanum vulgare* showed reduced survival after bacterial challenge with *A. hydrophila* compared to the control group, in greater proportion doses of 0.5% and 1.5%. These results indicated that the use of EO from oregano *Origanum vulgare* could improve hematological parameters in the culture of red-tailed shad *Brycon amazonicus*, in lower doses and longer experimental times.

**Keywords:** food supplement, productive performance, hematological parameters, immune system, *Aeromonas hydrophila*.



## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que se encuentra en constante desarrollo, hoy en día la tendencia actual promueve la incorporación de prácticas más sostenibles y ecológicas, para que se vea reflejado en la calidad de los productos del sector. A pesar de que esta actividad es dominada a nivel mundial por países asiáticos, se ha ido incrementando de manera gradual en países de las Américas (FAO, 2020). La Amazonía peruana cuenta con una amplia gama de especies piscícolas con alto potencial para el cultivo (Alcántara, 1991), como por ejemplo el *Brycon amazonicus*, que ha adquirido mayor interés debido a los atributos asociados a su desempeño productivo en cautiverio como su excelente aceptación de alimento balanceado, rápido crecimiento y adaptabilidad (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006).

En el cultivo de *Brycon amazonicus* se ha registrado problemas principalmente por la aplicación de malas técnicas en el manejo y transporte, ya que es una especie muy susceptible al estrés (Inoue *et al.*, 2005). Esto provoca alteraciones en el equilibrio osmótico, inmunológico y fisiológico del pez (Hori *et al.*, 2008); y promueve la proliferación de enfermedades bacterianas principalmente por agentes patógenos, que permite el uso de sustancias químicas en los sistemas de cultivo, como antibióticos, que causan impactos negativos en el medio ambiente así como también en la salud del animal (Reverter *et al.*, 2014), además se ha registrado que el uso deliberado de estos compuestos favorece a la resistencia en algunos microorganismos (Syahidah *et al.*, 2015).

La búsqueda de nuevas estrategias nutricionales se centra en disminuir el uso de antibióticos u otros compuestos químicos, empleados para contrarrestar las enfermedades en el sistema de cultivo, la finalidad es reemplazarlos por sustancias amigables con el medio ambiente, y que, a su vez, sirvan como promotores fisiológicos para mejorar la respuesta inmunológica y crecimiento del pez (Sutuli *et al.*, 2017). Una opción hoy en día, son los compuestos fitogénicos, en sus diferentes presentaciones como sólidos, secos, o aceites esenciales (Encarnaçao, 2016). La inclusión de aceites esenciales en las dietas de los peces ha registrado

un buen resultado ya que mejora el rendimiento animal en aspectos nutricionales, mejora el apetito, y además actúan como agentes antimicrobianos, antiinflamatorios y antioxidantes (Chakraborty *et al.*, 2014). El orégano, *Origanum vulgare*, fue introducido al Perú por los españoles en el siglo XV, desde entonces se ha producido todo el año y en mayor cantidad al sur del país, principalmente en la zona de Tacna (Chirinos *et al.*, 2009). Su gran adaptabilidad ha propiciado que se produzca en suelos de todo tipo y además que pueda soportar temperaturas bajas (Klauer, 2009). El uso del aceite esencial de orégano, *Origanum vulgare*, ha demostrado tener buenos resultados en la producción acuícola (Shafaghat, 2011), como mejorar el crecimiento y la composición corporal de los peces (De Moraes *et al.*, 2014).

El objetivo del presente trabajo fue, evaluar el efecto del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare*, incluido en la dieta balanceada del sábalo *Brycon amazonicus* sobre el rendimiento productivo, hematológico y sistema inmune.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Acuicultura en la Amazonía Peruana

La acuicultura se desarrolla en la Amazonía peruana, y presenta una gran posibilidad de crecimiento económico en el sector acuícola, tanto para la población como para el comercio (Berger, 2020). Esto no solo promueve a la seguridad alimentaria, sino que las familias tengan un sustento económico para poder vivir. Los métodos empleados en esta actividad vienen sufriendo cambios, con la finalidad de que resulten ser más eficientes y contribuir a alcanzar las metas de la acuicultura Amazónica (Nakagawa, 2017)

Una gran cantidad de especies de agua dulce son explotadas en este sector amazónico del país, por presentar características como la calidad de su carne, rápido crecimiento, rusticidad, etc. El cultivo intensivo de estas especies presenta aun algunas deficiencias por la falta de infraestructura adecuada, lo que desencadena problemas sanitarios, ya sean por estrés, manipulación y/o manejo (Alcántara, 1991). Además, los conocimientos en aspectos fisiológicos de las especies constituyen la línea base del desarrollo de dietas alimenticias que puedan incluir nuevos insumos más eficientes.

### 2.2. Sábalo cola roja - *Brycon amazonicus*

El género *Brycon* comprende un grupo de 43 especies, las que se destacan por su elevado potencial zootécnico dentro del orden de *Characiformes*; en ella se encuentra el *Brycon amazonicus* (Fig. 1), anteriormente llamado también *Brycon cephalus* y ser una sinonimia actualmente. La distribución de esta especie se encuentra en el norte de Sudamérica, en las cuencas del Río Amazonas y Río Orinoco; generalmente en zonas fangosas y tierras bajas. En

la cuenca del Río Amazonas, desde la región media superior – Pucallpa hasta el Río Ucayali, al este de Perú; además en la cuenca del Orinoco, se encuentra desde la zona mediana (Lima, 2017).



Figura 1: Juvenil de sábalo cola roja – *Brycon amazonicus*

El cultivo de esta especie se da desde hace más de dos décadas, y se sigue investigando sobre las técnicas del cultivo ya que es una especie que tiene una alta rentabilidad. Las condiciones de cultivo son similares a las usadas por otras especies nativas como gamitana (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2000).

### 2.2.1. Morfología

Presenta un cuerpo alargado y comprimido, su cabeza es pequeña, ancha y convexa de perfil. Tiene una boca alargada, con dientes maxilares superiores tricúspides y además dientes más pequeños en el maxilar inferior (Howes, 1982). Esta especie se distingue de las demás de su género, por la posición del quinto hueso infraorbital más alto que ancho y además presenta una coloración ligeramente dorada en los lados y oscura en el dorso, presenta varias franjas estrechas y longitudinales a lo largo de las superficies dorso laterales del cuerpo, puede medir hasta 1 metro y llegar a 8 kilos (Lima, 2017), y en cautiverio puede alcanzar hasta 2 kilos en un año.

Son considerados alevinos y juveniles, los peces menores de un año (Arias, 1996), con un peso promedio menor a 1000 g en la especie de *Brycon amazonicus* (FONDEPES, 2017). Son adultos, a partir de los dos años de edad en donde los rasgos reproductivos físicos son

visibles tanto en machos como hembras, tales como secreción de semen y el abultamiento del vientre, respectivamente (Burgos, 2018).

### **2.2.2. Alimentación**

Esta especie tiene hábitos alimenticios omnívoros en el medio natural, es considerada como una especie oportunista, de fácil adaptación e incluso puede soportar la ausencia de alimento por periodos prolongados (Carvalho, 2001). Principalmente se alimenta de frutas y semillas durante la temporada en la que se registran inundaciones (Lima, 2017; Goulding, 1980), también consume con frecuencia hojas y flores de plantas superiores, cuya cantidad depende de la disponibilidad y estación climática y en sus primeros estadios de crecimiento pueden filtrar organismos y algas que crecen en el agua (Salinas, 2000). Sin embargo, en el caso del cultivo en cautiverio, se suministra dietas balanceadas con bajos niveles de proteína (López *et al.*, 2004).

Es indispensable conocer los requerimientos nutricionales de la especie, ya que esto permite que se desarrolle de manera óptima en los sistemas de cultivo controlados. Varios trabajos de investigación coinciden en que la relación entre los nutrientes dentro de una dieta balanceada permiten que la especie pueda expresar su máximo potencial de crecimiento, lo cual se traduce a un mejor beneficio para el productor (López *et al.*, 2004). Se ha registrado que una dieta semipurificada con porcentaje de proteína de 21% y 3.2 Kcal/g de energía digestible, evidencia una mejor performance respecto al crecimiento en esta especie (Salinas, 2000). Según, Cyrino (1986), la sustitución parcial o total de fuentes de proteína animal por insumos de origen vegetal en dietas isoprotéicas de 35% de proteína bruta e isocalóricas de 3200 Kcal ED/kg, registran un crecimiento semejante, es decir, independiente de la fuente proteica. Existen varios estudios, en donde se registran los requerimientos de proteína bruta para el género *Brycon*, que han registrado un óptimo crecimiento (Tabla 1).

Tabla 1: Requerimiento de proteína/energía digestible en género Brycon

Especie	Peso (g)	Requerimiento		Referencia
		Proteína bruta (%)	Energía digestible (kcal/g)	
<i>Brycon siebenthalae</i> .	9.0 – 21.0	22.5	3.2	López <i>et al.</i> , 2004
<i>Brycon orbignyanus</i>	5.25 ± 0.14	30.0	3.26	Borba, 2006
<i>Brycon henni</i>	1.0 - 7.0	26	-	Aguirre & Muñoz, 2015
<i>Brycon cephalus</i>	23.2 ± 0.4	28	3.9	Uchôa, 2004
<i>Brycon erythropterum</i>	10.0 - 33.7	33	3.3	Taboada, 2021
<i>Brycon erythropterum</i>	3.7 ± 0.10	35.92	3.7	Calderón, 2019
<i>Brycon cephalus</i>	2.3 ± 0.1	35.1	-	Gomes, 2000
<i>Brycon orbignyanus</i>	8.4 ± 0.09	29	3.0	Sá & Fracalossi, 2002

Fuente: Elaboración propia.

El sábalo de cola roja, al ser una especie de aguas cálidas puede usar como fuente de energía altos niveles de carbohidratos en las dietas balanceadas suministradas (NRC, 1993). Una de las principales fuentes de carbohidratos en las dietas es el almidón, este proviene de cereales como el maíz, arroz, etc., teniendo en cuenta de que el sábalo cola roja los hábitos alimenticios de la especie, el contenido de carbohidratos en la dieta es alto. Estudios con especies como el pacú sugieren un nivel de 46% de carbohidratos y 4% de lípidos (Abimorad *et al.*, 2008) y en cachama negra un 38% (Günther *et al.*, 1997), presentan mejores resultados respecto al crecimiento y desempeño productivo, respectivamente.

Los niveles de fibra observados en las dietas de *Brycon cephalus*, no resultaron influir en la performance de la especie, sin embargo, el porcentaje de proteína mejoró el crecimiento y desarrollo de la especie, de tal manera que a mayor porcentaje de proteína, mejores fueron los índices zootécnicos (Pereira, 1995). Por otro lado, dietas con 9% de fibra, resultaron disminuir los niveles de grasa en el carne, sin afectar el desempeño productivo de la especie (Zaniboni - Filho *et al.*, 2006).

Santamaría (2014), sugiere que los requerimientos nutricionales en la etapa de alevinaje del *Brycon Siebenthalae* (Tabla 2) presentan mayores niveles proteicos en etapas más jóvenes, de tal manera que a lo largo del desarrollo de la especie este requerimiento va disminuyendo.

Tabla 2: Requerimientos nutricionales para alevino de la especie *Brycon Siebenthalae*

Requerimientos nutricionales	Valores
Proteína bruta	25 – 30 %
Relación de proteína y energía	15.1 cal/g PB
Fibra	8 %
Grasa	8 %

Fuente: Santamaría, 2014. Elaboración propia.

### 2.2.3. Sistemas de cultivo

Los parámetros propuestos para el monocultivo de la especie son: densidad de siembra de 1-1,5 individuos/m<sup>2</sup>, alimentación con raciones comerciales para peces o mezclas de granos que contengan 22-30% de proteína bruta y suplementación alternativa con hojas y frutos (Arias, 2006). En el caso de policultivos con especies como *Colossoma macropomum* y *Prochilodus mariae*, el rendimiento mejora hasta un 20% tanto para la especie principal como para las acompañantes (Arias & Murillo, 2000). Por otro lado, las raciones diarias de alimentos se establecen con el 3% de la biomasa, con frecuencia de dos veces al día. Bajo estas condiciones de cultivo las conversiones alimenticias se encuentran entre 1.5 y 2, en un tiempo de cultivo de 4 a 6 meses, cosechando animales de 100 a 600 gr. (Bernal & Cala, 1997).

Respecto a la calidad de agua, en un medio natural, esta especie requiere de aguas cálidas dentro del rango de 26°C a 30°C, éstas deben contener oxígeno disuelto entre 4-7 mg/l, pH entre 6-7 y dureza de 15-45 mg/l de CaCO<sub>3</sub>. En ambientes controlados la especie soporta aguas cálidas con un rango de temperatura de 23°C a 31°C, con dureza de hasta 80 mg/l de CaCO<sub>3</sub> y pH no mayor a 7 (Arias, 2006).

Según FONDEPES (2017), se recomiendan los valores de los parámetros físicos y químicos para el óptimo cultivo del sábalo cola roja *Brycon amazonicus* (Tabla 3).

Tabla 3: Parámetros físico – químicos del agua para el cultivo de sábalo cola roja *Brycon amazonicus*

Parámetros de calidad de agua		Unidades	Rango
Parámetros físicos	Temperatura	°C	26-31
	Transparencia	mm	> 250
	Pluviosidad	cm	30-60
Parámetros químicos	Oxígeno disuelto	mg/l	> 3.0
	pH	unidades	6.0 – 8.0
	Amonio (NH <sub>4</sub> )	mg/l	< 0.02

Fuente: FONDEPES (2017). Elaboración propia.

Asimismo, contar con una ficha técnica para el cultivo de sábalo cola roja (yamú) *Brycon amazonicus* (Tabla 4), sirven como base para evitar complicaciones a lo largo de su desarrollo. Cualquier cambio en los parámetros, tanto físicos como químicos, pueden provocar alteraciones fisiológicas que conllevan a la disminución o pérdidas en la producción (Fernández *et al.*, 2010).

Tabla 4: Ficha técnica para el cultivo de yamú *Brycon amazonicus*

Parámetros de calidad de agua		Unidades	Rango
Parámetros físicos	Temperatura	°C	24 – 30
	Dureza	mg/l	60 – 150
	pH	unidades	6.5 – 8.5
Parámetros químicos	Oxígeno disuelto	mg/l	5 – 7
	Amonio	mg/l	0 - 1
	Amoniaco	mg/l	0.1 – 0.2
	Nitrito	mg/l	0 – 0.05

Fuente: AguaVerde Acuicultura (2011).



### 2.3. Producción de sábalo en el Perú

El desarrollo de la producción de sábalo cola roja en el Perú se sitúa principalmente en las regiones de Loreto, Piura y San Martín; en donde se cultiva de manera semi intensiva en estanque de tierra, en la mayoría de estos de manera muy rústica. En el 2020, se registró el mayor volumen de cosecha para esta especie en el mes de abril (Fig. 2), sin embargo, durante el resto de meses no se registró un gran rango de oscilación, variando entre 30 y 40 TM (PRODUCE, 2020).

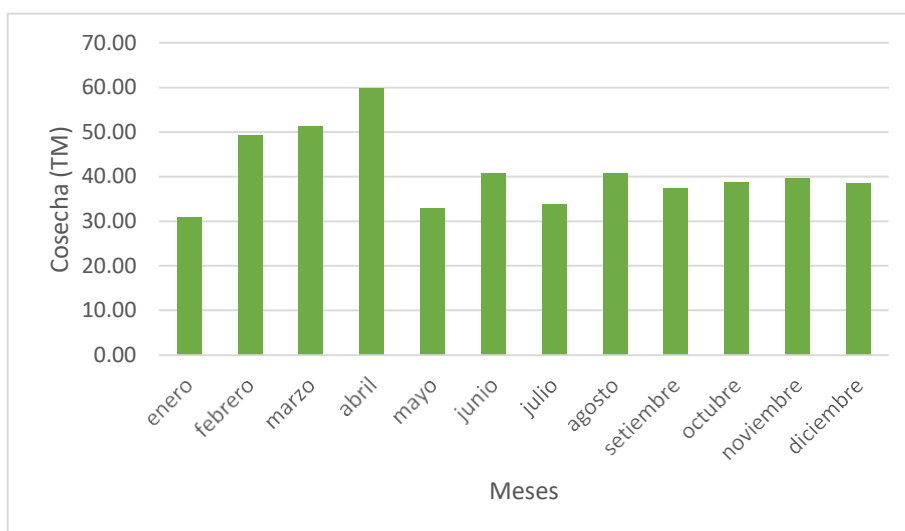


Figura 2: Cosecha de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* procedentes de la actividad acuícola en el año 2020 (PRODUCE, 2020).

### 2.4. Sistema inmune

El sistema inmunológico de los peces permite mantener las funciones mínimas vitales para que el individuo pueda desarrollarse con normalidad en el medio acuático. Por ello es importante mantener un buen estado de salud en los peces, ya que ante cualquier circunstancia este podría verse afectado por factores internos y externos tales como la edad y estado sanitario del pez, y los agentes del medio acuático; respectivamente. El efecto de la alteración de estos, se ve reflejado en la secreción de hormonas principalmente corticosteroides, del tipo glucocorticoides en donde se encuentra el cortisol (Olabuenaga, 2000)

El manejo sanitario en medio natural o controlado está relacionado a los parámetros ambientales (la temperatura, materia orgánica, etc.), por lo que los agentes patógenos o sustancias infecciosas producen alteraciones en la sangre de los organismos. El sistema de defensa de los peces, se encuentra estrechamente relacionado con la abundancia de leucocitos en la sangre, incluyendo linfocitos B y T, granulocitos, macrófagos y trombocitos; por lo que es importante conocer la fórmula leucocitaria de la sangre de los peces (Wahli, 2002).

## **2.5. Hematología en peces**

La hematología clínica en la investigación animal resulta indispensable, ya que consiste en establecer parámetros hematológicos para condiciones normales y anormales, por lo que deberían ser considerados como métodos de diagnóstico de rutina en el cultivo de peces (Tavares-Días, 2010).

En peces, como otros vertebrados, la sangre es portadora de diversos tipos de células como eritrocitos, leucocitos, monocitos, etc., que reflejan el estado fisiológico específico de un organismo en un momento dado. Es decir, la proporción y cantidad de estas células en la sangre están relacionadas al estadio funcional de los peces (Iwashita *et al.*, 2015). En condiciones de estrés, enfermedades o falta de alimento, puede causar una variación en el patrón característico del pez, en cuanto al recuento de las principales células (Tavares-Días, 2004).

Estos parámetros, al ser tan variables por factores intra e interespecíficos, como el sexo, la edad, estadio sexual, genética, hábitos alimenticios, etc. (Gonzales, 2019), resulta muy complejo establecer un patrón de comportamiento o fluctuación de ellos. Sin embargo, se han registrado similitudes en especies del género *Brycon* (Tabla 5) de la misma localidad de distribución (Oliveira *et al.*, 2015).

Tabla 5: Comportamiento normal de los parámetros hematológicos del género *Brycon*

Etapa de vida	Especie	Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /μL)	Hb (g/dL)	Hct(%)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Referencias
Juvenil	<i>Brycon Amazonicus</i>	1.27 ± 0.99	6.6 ± 0.6	28.0 ± 3.3	220.0 ± 16.4	24.0 ± 16.4	Tavares- Días <i>et al</i> , 2008.
Adulto	<i>Brycon amazonicus</i>	2.9 ± 0.6	20.1 ± 3.3	53.4 ± 4.9	194.5 ± 54.5	37.8 ± 4.9	Gonzales, 2019.
Juvenil	<i>Brycon cephalus</i>	2.915 ± 0.41	10.9 ± 1.2	39.0 ± 8.7	134.8 ± 24.3	28.8 ± 4.5	Tavares- Días, 1999.
Juvenil	<i>Brycon siebenthalae</i>	3.8 ± 0.6	13.7 ± 2.6	45.0 ± 4.2	122.3 ± 15.3	30.6 ± 5.6	Arias <i>et al.</i> , 2003.

Hb: Hemoglobina, Hct: Hematocito, VCM: Volumen Corpuscular Medio, CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media. Elaboración Propia.

### 2.5.1. Eritrograma

Consiste en la realización del conteo de eritrocitos, determinación del hematocrito, tasa de hemoglobina y el cálculo de los índices hematimétricos como el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Los eritrocitos son las células más abundantes en la sangre de los seres vivos, su principal función es el transporte de oxígeno en los órganos respiratorios (Ranzani-Paiva *et al.*, 2008).

### 2.5.2. Leucograma

Consiste en conteo relativo y absoluto de los diferentes tipos de leucocitos como por ejemplo linfocitos, monocitos, neutrófilos, heterófilos, basófilos y eusínófilos, además de los trombocitos presentes en la sangre. Estas células se encuentran involucradas en el sistema inmune de los peces (Fernández *et al.*, 2016), y pueden formar centros melanomacrifágicos en los tejidos de los teleósteos que se encuentran relacionados estado fisiológico o patológico, la edad, el estrés y la contaminación ambiental (Lima, 2018).

Los linfocitos son las principales células responsables de la respuesta inmune específica del pez, son los encargados de producir anticuerpos, además, tienen capacidad citolítica ante la presencia de cualquier agente infeccioso (Campbell & Murru, 1990). Los monocitos son macrófagos en los tejidos por naturaleza (Rozas *et al.*, 2015), son capaces de ingerir y digerir sustancias extrañas, así como restos celulares de la respuesta inflamatoria u otros procesos (Enane *et al.*, 1993). Los neutrófilos y heterófilos son responsables de la respuesta inflamatoria aguda es decir se encuentran en tejidos inflamados (Fernández, 2016), la diferencia entre estos es que los heterófilos no presentan capacidad de fagocitaria de microorganismos (Rozas *et al.*, 2015). La presencia de basófilos en la sangre de peces aún es material de estudio y controversia, pero se encuentra relacionado a procesos de fagocitosis de microorganismos y reacciones alérgicas o inflamatorias (Rozas *et al.*, 2015), se pueden confundir con facilidad con los eusinófilos ya que presentan la misma función (Fernández *et al.*, 2016). Finalmente los trombocitos, son células multifuncionales relacionadas con la liberación de sustancias eicosanoides, que contribuyen a la reducción de procesos inflamatorios agudos (Jagadeeswaran *et al.*, 1999), también se encuentran presentes en procesos de coagulación sanguínea y fagocitaria (Doolittle & Surgenor, 1962).

### **2.5.3. Plasma sanguíneo**

El plasma está compuesto de 90% agua, el 7% son proteínas como globulinas y albuminas, y el 3% son diversos tipos de electrolitos como potasio, calcio, fosfato, etc. y metabolitos, hormonas, etc. La identificación de estos compuestos es importante como indicadores de estrés en peces (Sánchez *et al.*, 2017).

### **2.6. Problemática del uso de antimicrobianos**

El uso de antibióticos en los sistemas de producción intensivos aumenta la susceptibilidad de alterar la calidad de agua, o peor aún promover cambios en el funcionamiento dietético apropiado (Mog *et al.*, 2020). El metabolismo de los peces no absorbe por completo este tipo de medicamento, por lo que una parte de este se excreta al medio como heces u orina (Griboff *et al.*, 2020). Además, el uso indiscriminado de este tipo de compuestos como agentes de prevención a enfermedades desencadena la resistencia a los mismos (Guidi *et al.*, 2017).

Gran parte del sector acuícola mundial no cuenta con regulaciones sobre la aplicación de antibióticos, lo cual lo hace aún más alarmante respecto a prevalecer una producción sostenible ambientalmente (Hedberg *et al.*, 2018). Estudios previos demuestran que el uso excesivo de los antibióticos acumulan residuos de sustancias químicas en los tejidos de los peces, estos al llegar al consumidor generan daños perjudiciales en la flora intestinal de los seres humanos, además podrían afectar la efectividad ante enfermedades y generar resistencia en los mismos peces (O'Neill, 2015).

## **2.7. Enfermedades bacterianas**

El desarrollo de la acuicultura en condiciones naturales y controladas, desencadena una serie de problemas como la aparición de enfermedades, principalmente bacterianas por organismos patógenos en el medio (Penagos, 2009). La producción intensiva, impacta con mayor frecuencia el equilibrio ambiente-patógeno-hospedero, por lo que permite que las enfermedades se expresen y generen la muerte de los individuos (Georgiadis *et al.*, 2001). Diversos estudios son destinados a la búsqueda de soluciones que minimizan la presencia de enfermedades a causa de estos patógenos, lo que permite que los peces se desarrollen en sistemas de cultivo inocuos, tanto para ellos mismos como para los consumidores (FAO, 2006).

Los patógenos bacterianos más importantes son los gram negativos, como especies del género *Aeromonas* (*Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophila*), de la familia *Vibrionaceae* (*Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii*) y dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (*Yersinia ruckeri* y *Edwardsiella ictaluri*). Estos se producen generalmente en agua de temperaturas cálidas, en estaciones de primavera y verano (Munro, 1982).

## **2.8. *Aeromonas hydrophila***

### **2.8.1. Descripción de la bacteria *Aeromonas hydrophila***

Las bacterias del género *Aeromonas*, se encuentran frecuentemente en el medio acuático (ríos, lagos, lagunas y mar), en algunas especies de peces y también en mamíferos, reptiles,

anfibios y aves, generando enfermedades. Se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo a la temperatura óptima de su crecimiento y capacidad de movilidad; el primer grupo está formado por especies mesófilas de 35°C a 37°C, siendo la más frecuente *Aeromonas hydrophila* (Janda & Abbot, 2010) y el segundo grupo está formado por especies psicrófilas cuya temperatura óptima es de 15°C a 20°C (Vergara, 2008). Por otro lado, la proliferación de estas bacterias depende bastante de diversos factores como la estación del año, oxígeno disponible, materia orgánica, cloro, pH y salinidad (Ribeiro *et al.*, 2016; Harikrishnan *et al.*, 2009).

### 2.8.2. Clasificación taxonómica

Tabla 6: Clasificación taxonómica de la bacteria *Aeromonas hydrophila*

Clasificación taxonómica	
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Aeromonadales</i>
Familia	<i>Aeromonadaceae</i>
Género	<i>Aeromonas</i>
Especie	<i>Aeromonas hydrophila</i>

Fuente: Popoff & Veron *et al.*, 1976.

### 2.8.3. Signos clínicos

El vehículo de transmisión para enfermedades zoonóticas por la bacteria *Aeromonas hydrophila* son los alimentos, los cuales provocan infecciones gastrointestinales. Se han registrado estos problemas en el consumo de camarones y ostras. El poder patógeno y el grado de virulencia de esta bacteria se relaciona con factores externos como la calidad del agua, dureza, temperatura, lesiones de los peces lo cual se traduce en una manifestación clínica de la enfermedad (Roberts, 2001).

Meik (2011), considera que esta bacteria se relaciona con muchas patologías en peces de interés en acuicultura, como por ejemplo la *A. salmonicida* es la causante de la furunculosis en diversos peces, la *A. hydrophila* y *A. jandaei* son causantes de la aeromoniasis, entre otras enfermedades que son causantes de infecciones cutáneas, diseminadas y enteropatógenas, especialmente cuando el sistema inmunológico se encuentra afectado; siendo la más común la *Aeromonas hydrophila* (Janda & Abbott, 2010).

La enfermedad por este patógeno se manifiesta al observar a los peces letárgicos, provocando una disminución en el consumo de alimento y por ende, una elevada mortalidad. Las úlceras hemorrágicas en la piel, con mayor abundancia en la zona periorcular; los edemas en el cuerpo, descamación y despigmentación, son algunos signos clínicos que generan cuadros septicémicos (Zepeda – Velázquez, 2015). Además, se produce putrefacción de las aletas y cola, lo comúnmente llamado como una septicemia hemorrágica, la cual se caracteriza por presentar lesiones externas como la caída de escamas, abscesos e hinchazón de abdomen, acumulación de líquido ascético en la cavidad peritoneal, anemia, aumento de tamaño del riñón e hígado, y hemorragia en las branquias y ano (Roberts, 2001).

#### **2.8.4. Prevención y profilaxis empleada**

El proceso de prevención frente a este patógeno es la eliminación de los peces moribundos, posterior a ello se debe estabilizar los parámetros del agua para que no afecte a los sobrevivientes. No se recomienda la utilización de antibióticos cuando la presencia de este patógeno no se presente manera severa, sin embargo en situaciones en donde se presenten altas mortalidades y pérdida del consumo de alimentos, es recomendado aplicar sulfonamidas potenciadas (Zepeda-Velázquez, 2015).

Para el caso de la *Aeromonas hydrophila* se ha registrado el uso de aceites esenciales derivados de plantas medicinales como *Gracilaria folifera* y *Sargassum longifolium*, *Cassia alata*, *Psidium guajava*, *Callophyllum inphyllum*, *Phyllanthus acidus* y *Ocimum sanctum*, con resultados satisfactorios en peces y camarones (Janda & Abbott, 2010).

#### **2.9. Inmunoestimulantes**

Los inmunoestimulantes, son sustancias de origen natural o sintético que contribuyen a mejorar el sistema inmune de cualquier individuo (Thepot *et al.*, 2021), suelen ser utilizados para el control de enfermedades, ya que mejoran el estado fisiológico de los peces e incrementan su resistencia frente a agentes patógenos (Vásquez-Piñeros, 2012). Esto resulta una alternativa interesante frente a la utilización de fármacos, productos químicos y antibióticos (Harikrishnan *et al.*, 2010). Los más utilizados dentro de la industria acuícola

son los  $\beta$ -glucanos, los lipopolisacáridos, prebióticos y probióticos (Encarnação, 2016).

### **2.9.1. Aditivos inmunoestimulantes**

Los aditivos alimenticios que son utilizados en las dietas balanceadas de los peces son muy diversos como prebióticos, probióticos y otros tipos de inmunoestimulantes, contribuyen a mejorar la disponibilidad de ciertos nutrientes o eliminar ciertos antinutrientes (Encarnação, 2016). Los prebióticos son polisacáridos complejos que se encargan de estimular el crecimiento de bacterias en el tracto digestivo de los peces que resultan ser beneficiosas, de tal manera que al ser reconocidos por las células epiteliales generan una respuesta inmunitaria (Vallejos-Vidal *et al.*, 2016). Por otro lado, los probióticos, son bacterias vivas que colonizan los conductos gastrointestinales, lo cual también produce una respuesta inmune (Dawood & Koshio, 2016). Últimamente se ha tomado interés en los extractos herbales, ya que estos demuestran mejorar y proteger la inmunidad innata de los peces frente a diversos patógenos, como *Aeromonas hydrophila* (Harikrishnan & Balasundaram, 2005).

### **2.10. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales (AE) son sustancias que poseen una mezcla de varios componentes, los cuales presentan características aromáticas, volátiles y de alta densidad (oleosos); que se encuentran prácticamente en todos los vegetales (Tellez, 2017). Se pueden extraer de distintas partes del vegetal, como; raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Duke, 2002), por el metabolismo secundario de las plantas, lo cual no se relaciona directamente con los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, formación de carbohidratos; estos últimos encargados del metabolismo primario (Flores, 2010). Presentan un gran potencial dentro de los sistemas acuícolas, debido al efecto benéfico reportado en los peces, como promotores del crecimiento, inmunomoduladores, antiparasitarios, antimicrobianos, antibacterianos, anestésicos y estimulantes del apetito (Reverter *et al.*, 2014). Los aceites esenciales están conformados por una compleja variedad de metabolitos secundarios como son los terpenos y fenilpropenos (Vásquez., 2012). Los terpenos son los compuestos que tienen cinco unidades de carbonos llamados isoprenos (Tellez, 2017), estos le confieren las características organolépticas a los AE como el aroma y sabor, una de las propiedades más sobresalientes de los terpenos es la facilidad de producir diversos compuestos a partir de un sustrato simple como el fenil-di-fosfato (Dudareva *et al.*, 2006),



además, se pueden clasificar como monoterpeno, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos; y terpenos en forma de alcoholes, cetonas, lactosas y ésteres (Acevedo *et al.*, 2013; Govindarajan *et al.*, 2016).

Los principales componentes activos de los aceites esenciales son el carvacol, timol,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno, sabineno,  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -terpineno, linalol y eugenol, dependiendo de la planta y pueden llegar hasta en un 85% del total (Silva & Fernandes, 2010). Generalmente se le atribuye la mayor actividad antimicrobiana al carvacol o timol en especies de *Thymus* y *Origanum* (Faleiro *et al.*, 2003). Sin embargo la composición química varía dependiendo de la región geográfica y cosecha (Tellez, 2017).

Se ha determinado que los aceites esenciales presentan un mejor efecto en bacterias gram (+) que gram (-), por la composición de la membrana de estas, pero el carvacol, eugenol y timol son capaces de desintegrar la membrana de algunas bacterias gram (-) como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* lo cual se relaciona con el carácter hidrofóbico de los aceites esenciales que permite perturbar la estructura de la membrana y por ende su permeabilidad, logrando la fuga de iones y de otros contenido celulares vitales; lo cual produce la muerte de dichas bacterias (Abdollahzadeh *et al.*, 2014).

### **2.10.1. Uso de aceites esenciales en la acuicultura**

El principal uso de los aceites esenciales, y que ha llevado a promover más la investigación, es que sirven como antisépticos e inmunoestimulantes para el cultivo de animales. Dentro de la acuicultura, presentan una serie de efectos beneficiosos para la nutrición y salud animal, trabajando como promotores alternativos a los antibióticos e incrementando el crecimiento y rendimiento productivo de los animales (Sutili *et al.*, 2017). Otros efectos como la estimulación del apetito, inmunomoduladores, antioxidantes, antibacteriales y anestésicos han sido demostrado en estudios previos por distintos autores, lo cual registra efectos biológicos significativos (De Oliveira *et al.*, 2016).

Se ha estudiado que durante las primeras etapas de los peces, la colonización del tracto gastrointestinal y el desarrollo del sistema inmunológico se encuentra influenciado por factores endógenos, lo cual produce cambios en la comunidad bacteriana y puede afectar

directamente al sistema inmunológico innato y otras funciones metabólicas por lo que los aceites esenciales han apoyado positivamente a contrarrestar este proceso (Rombout *et al.*, 2011).

## 2.11. Orégano - *Origanum vulgare*

### 2.11.1. Características generales del orégano

El orégano, *Origanum vulgare*, se desarrolla muy bien en varios tipos de suelos que se encuentren a una altura comprendida entre 2850 a 3400 m.s.n.m., sin embargo también se ha encontrado a nivel del mar (Tellez, 2017).

Esta especie presenta una gran variabilidad influenciada por el medio en el que se desarrolla y por las épocas del año. Por lo general presenta tallos de hasta 80 cm, que son rectos, pilosos y aromáticos las hojas son ovales, pecioladas, dentadas, o enteras; las flores son rosadas, violáceas o blancas (Klauer, 2009). En algunos casos sirven como potencial alimento para animales en herbazales secos (Wenk, 2003).

### 2.11.2. Clasificación taxonómica

Tabla 7: Clasificación taxonómica del orégano *Origanum vulgare*

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Lamiidae</i>
Superorden	<i>Lamianea</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Origanum</i>
Especie	<i>Origanum vulgare</i>
Nombre común	Orégano

Fuente: (Ietswaart, 1980).

### 2.11.3. Aceite esencial del orégano

El aceite esencial del orégano presenta una gran cantidad de propiedades como antimicrobiano, antiparasitario, antioxidante, actividad estrogénica e insecticida; sin embargo, la más resaltante es su capacidad antioxidante (Flores, 2010), que juega un papel importante introducido en la dieta de peces para la prevención de enfermedades producidas por bacterias como por ejemplo *E. coli* (Burt, 2007).

Este aceite es usado con frecuencia, ya que hay registro en investigaciones científicas que demuestran que el orégano – *Origanum vulgare* presenta una capacidad antioxidante, antifúngica, antibacterial, analgésica, etc. (Duke, 2002).

La actividad antibacteriana del orégano se ha demostrado en algunas especies de bacterias del género *Bacillus*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Enterobacter* (Alves de Azeredo *et al.*, 2010). Sin embargo, también se destaca el efecto biocida en las especies del género *Candida* (Brum *et al.*, 2017). La composición del AE de orégano es principalmente carvacrol y timol, además de menores proporciones de: cimeno, terpineno, canfeno, borneol y linalol, entre otros; éstos compuestos brindan las principales características físico – químicas al AE, como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8: Características físico – químicas del AE de orégano *Origanum vulgare*

Parámetros organolépticos		Valores
Físicos	Color	Ligeramente amarillo
	Olor	Aromático a orégano
	Solubilidad en alcohol etílico	Soluble a tres volúmenes de alcohol
	Punto de congelación	16.3 °C
Químicos	Densidad relativa a 20°	0.982 g/ml
	Índice de refracción a 20°	1.554
	Desviación polarmétrica a 20°	1.18

Fuente: Empresa Inv. Arcadius E.I.R.L.

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. Lugar y duración

El trabajo experimental se realizó en el Centro de Investigación y Promoción Popular – CENDIPP y los análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Bromatología y Fisiología - AQUAREC, ambos centros se encuentran dentro de las instalaciones del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP (Fig. 3) a la altura del kilómetro 4.5 de la carretera Iquitos - Nauta, perteneciente al distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Región Loreto. La evaluación tuvo un periodo experimental de 42 días, entre los meses de mayo a julio del 2020.

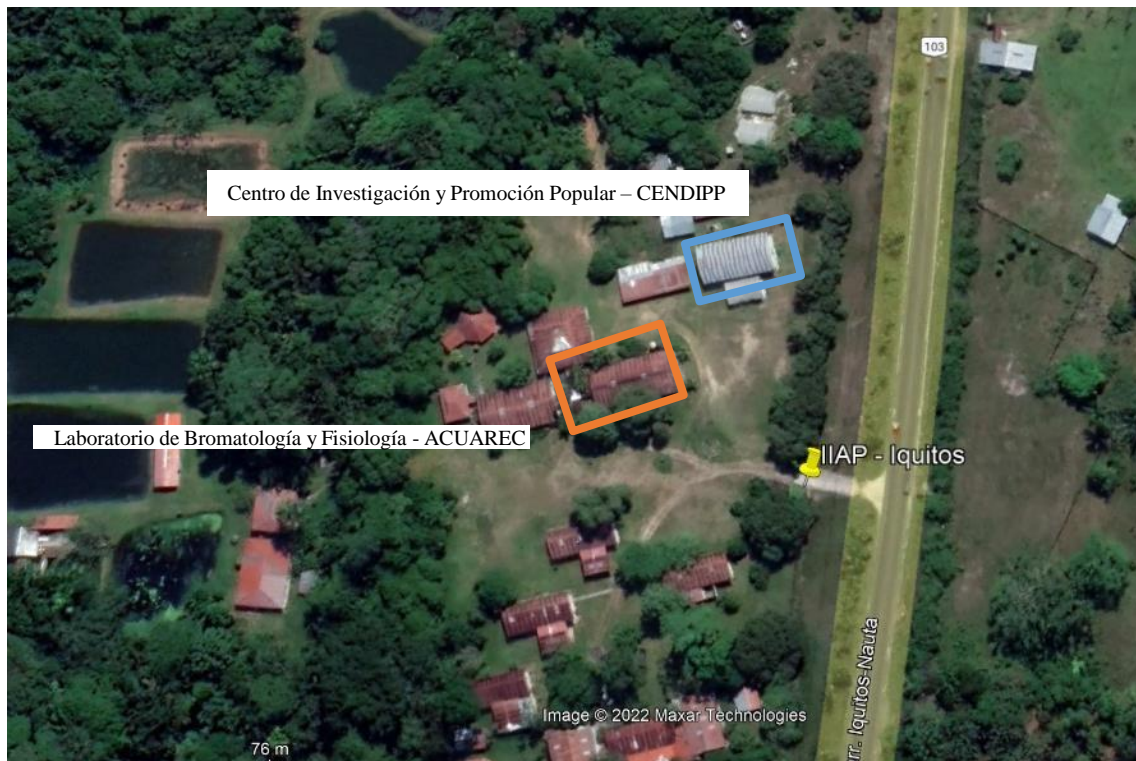


Figura 3: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) – Iquitos (Perú).  
Google Earth.

### **3.2. Animales de experimentación**

Se utilizaron 120 juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* de un peso promedio de  $167.8 \pm 15.5$  g y  $22.2 \pm 0.7$  cm de longitud total promedio, procedentes del mismo centro – IIAP (Iquitos). Se distribuyeron aleatoriamente en tres tratamientos con tres repeticiones cada uno, 10 individuos por tanque. Al realizar la biometría de los peces se utilizó Eugenol a una concentración de 27.35  $\mu\text{L/L}$  de agua (Anexo 1), para evitar el estrés y facilitar el transporte. Sin embargo, en el último muestreo se utilizó Tricaina como anestésico a una concentración de 100 mg/L, para ello se realizó una prueba previa para la determinación de la dosis óptima (Anexo 2).

### **3.3. Instalaciones**

Los peces fueron distribuidos en 12 tanques de concreto, revestidos con loseta celeste de 1.87 m largo x 1.65 m ancho x 0.65 m altura, con una capacidad 600 litros de agua, además cuentan con un sistema de aireación por tubos suspendidos en la parte superior de los tanques (Anexo 3). Cada tanque cuenta con un filtro mecánico compuesto de esponjas de alta densidad para la filtración, tubos de PVC para la conexión de la aireación y plomos para mantener sumergidos los filtros (Anexo 4). Los tanques tenían tapas de madera, hechas de listones de 1"x 2", forrados con mallas de nylon verde de 1 mm, cada uno (Anexo 5).

### **3.4. Aceite esencial de orégano *Origanum vulgare***

Para la presente experimentación se utilizó un aceite esencial comercial 100% puro de orégano *Origanum vulgare* de la marca Q'api del lote 006 – R.S. C6000115N – VCIVAC, producido por Inv. Arcadius E.I.R.L. (Anexo 6).

### **3.5. Alimentación**

Se utilizó el alimento comercial extrusado de crecimiento (Aquatech, Naltech, Lima, Perú), las características nutricionales se muestran en la Tabla 9, con un tamaño de partícula de 6x6 mm. La alimentación se realizó tres veces al día (8:00, 12:00 y 16:00 horas) durante un periodo de 35 días, con una tasa de alimentación de 3.5% de la biomasa. A los 30 minutos de culminada la alimentación se recolectó el alimento no consumido para evitar el deterioro

de la calidad de agua.

Tabla 9: Composición proximal de la dieta comercial utilizada en la experimentación

<b>GAMITANA 28 (Crecimiento)</b>	<b>Porcentaje mínimo (%)</b>
Proteína (mín.)	28
Grasa (mín.)	5
Fibra (máx.)	8
Ceniza (máx.)	10
Humedad (máx.)	12

Fuente: Empresa Aquatech® (Naltech, Lima, Perú).

### 3.5.1. Elaboración de soluciones de aceite esencial

Las soluciones se prepararon pesando la cantidad correspondiente de aceite esencial en vasos precipitados para cada dosis (0%, 0.5%, 1.0% y 1.5%) respecto a la cantidad de alimento a preparar. El AE fue disuelto en alcohol etílico comercial de 96°, en una relación volumen/peso de 1:10, es decir por 100 g de alcohol por 1000 g de alimento a preparar (Tabla 10). La solución se homogenizó hasta la disolución completa del aceite en el alcohol y se conservó sellada (parafilm) hasta su uso.

Tabla 10: Cantidades de AE de orégano, alcohol etílico de 96° y alimento balanceado para la preparación del alimento suplementado

<b>Dosis de AE(%)</b>	<b>Cantidad de AE(g)</b>	<b>Cantidad de alcohol etílico comercial de 96° (g)</b>	<b>Cantidad de alimento balanceado (g)</b>
0	0	100	1000
0.5	5	100	1000
1.0	10	100	1000
1.5	15	100	1000

Fuente: Elaboración propia.

### 3.5.2. Inclusión del aceite esencial en el alimento

La inclusión de las soluciones de AE de orégano *Origanum vulgare* en el alimento, se realizó

por el método de aspersión mecánica utilizando pulverizadores manuales. El procedimiento fue colocar el alimento pesado en bandejas de plástico de manera extendida, luego las soluciones de AE se colocaron en los pulverizadores, y posteriormente fueron rociadas de manera homogénea en el alimento, este procedimiento se realizó para cada una de las dosis (Anexo 7). El alimento se dejó secar a temperatura ambiente (28 °C) durante 48 horas, y posteriormente se almacenó en envases herméticos rotulados a una temperatura de 2 °C. Se detalla el procedimiento general en el siguiente flujograma (Fig. 4).



Figura 4: Flujograma de proceso de inclusión de aceite esencial al alimento balanceado comercial. Elaboración propia.

### 3.6. Diseño experimental

Se alimentó a juveniles de sábalo *Brycon amazonicus* con una dieta comercial con inclusión de aceite esencial comercial de orégano *Origanum vulgare* (Marca Q'api) en tres concentraciones 0.5%, 1.0% y 1.5% y control 0% durante un periodo de 42 días (Tabla 11). Para la distribución de las concentraciones en los tanques se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA), con 10 juveniles de sábalo en cada tanque, cada concentración y control se

realizó por triplicado (Fig. 5).

Tabla 11: Nomenclatura utilizada para los tratamientos por dosis de aceite esencial

Tratamientos	Dosis de aceite esencial(%)	Tipo	Repeticiones
T1	0	CONTROL	T1R1, T1R2, T1R3
T2	0.5	DOSIS 0.5%	T2R1, T2R2, T2R3
T3	1.0	DOSIS 1.0%	T3R1, T3R2, T3R3
T4	1.5	DOSIS 1.5%	T4R1, T4R2, T4R3

Fuente: Elaboración propia.

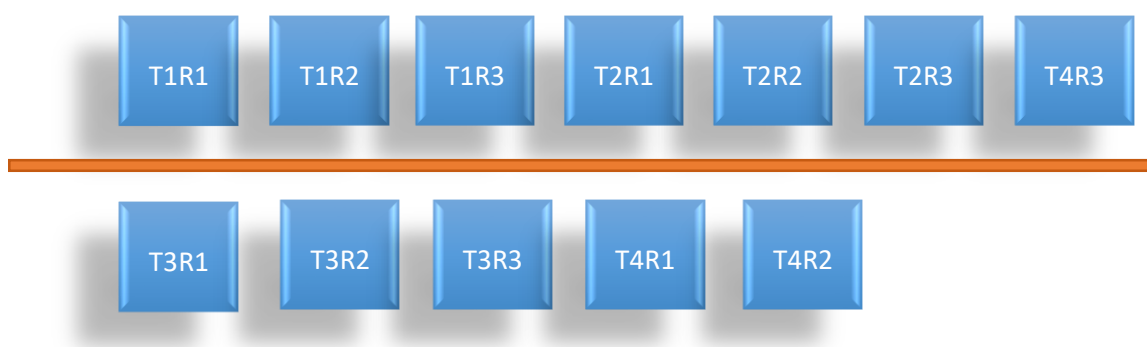


Figura 5: Distribución de tratamientos y tanques al azar, en la zona de experimentación.

### 3.7. Monitoreo de calidad de agua

El agua utilizada durante la experimentación proviene de la red de agua filtrada que abastece todas las instalaciones del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP. Los parámetros de calidad del agua fueron evaluados en cada uno de los tanques experimentales, dos veces al día (9:00 y 17:00 hrs.), cinco veces a la semana. En la tabla 12, se especifican los equipos y la metodología que se aplicaron para los diferentes parámetros de calidad de agua. El amonio (mg/L), amoníaco (mg/L) y nitritos (mg/L) se evaluaron dos veces por semana, a las 15 hrs. (Anexo 8).



Tabla 12: Parámetros de calidad de agua

Parámetros	Unidades	Equipo	Metodología	Horario	Lectura digital
Temperatura	°C				Rango: -5.00 a 55.00 °C Precisión: ± 0.15 °C <b>Lectura digital</b>
Oxígeno disuelto	mg/L	Multiparámetro portátil <i>Hanna Instruments (HI 98194)</i>			Rango: 0.00 a 50.00 mg/l Precisión: 0.00 a 30.00 mg/l → ± 0.10 mg/l 30.00 a 50.00 → ± 3% de la lectura <b>Lectura digital</b>
Potencial de hidrogeno	unidades (pH)				09:00 hrs. y 17:00 hrs. Rango: 0.00 a 14.00 pH Precisión: ± 0.02 pH <b>Lectura digital</b>
Conductividad	µS/cm				Rango: 0 a 200 mS/cm Precisión: ± 1% de la lectura
Amonio (NH <sub>4</sub> )	mg/L				Método Adaptado de ASTM Manual of Water and Environmental Technology, D1426 Método Nessler.
Amoniaco (NH <sub>3</sub> )	mg/L	Fotómetro <i>Hanna Instruments (HI 83203)</i>			<b>Rango: 0.00 a 3.00 mg/L</b> Precisión: ± 0.04 mg/L o ± 4% de lectura 15 hrs. Método Adaptado de EPA Método Diazotización 354.1
Nitritos (NO <sub>2</sub> )	mg/L				<b>Rango: 0 a 0.600 mg/L</b> Precisión: ± 0.020 mg/L o ± 4% de lectura

Fuente: Manual de equipos *Hanna Instruments*. Elaboración propia.

Se realizó la limpieza de los tanques cada tres días, 30 minutos después de la segunda alimentación y lavado de filtros cada 6 días. Además se realizó recambios parciales de agua de 50% a 80%. Las paredes de los tanques se limpiaron con esponjas y/o escoba, sin realizar movimientos bruscos del agua.

### 3.8. Determinación de los parámetros productivos

La evaluación de los parámetros productivos se realizó un día después de culminar los 35 días de la experimentación, éstos fueron determinados mediante la comparación del peso y longitud total de los peces al inicio y luego de los 35 días (Acar *et al.*, 2015). Para facilitar el manejo de los peces durante el muestreo, se utilizó Eugenol a una concentración de 27.35  $\mu\text{L/L}$  de agua. Estos una vez inmóviles (sedados) se pesaron (g), con una balanza digital de precisión - 0.1 g, y se midieron (cm) respecto a la longitud total, es decir desde el extremo anterior de la mandíbula hasta el extremo más largo de la aleta caudal (Laevastu, 1980) con un ictiómetro de 50 cm.

#### 3.8.1. Biomasa

La biomasa es definida como el peso total de la materia viva en una superficie determinada, es decir donde se realiza el cultivo (FONDEPES, 2004).

$$\text{Biomasa (g)} = \text{Peso Promedio} \times \text{N}^\circ \text{ de individuos}$$

#### 3.8.2. Ganancia de Peso Total (GPT)

La ganancia de peso de los individuos fue calculada mediante la diferencia entre el peso promedio final e inicial (Paredes, 2020).

$$\text{GPT (g)} = \text{Peso Promedio Final} - \text{Peso Promedio Inicial}$$

#### 3.8.3. Ganancia de Peso Diario (GPD)

La ganancia de peso diaria de los individuos fue calculada mediante la relación entre la ganancia de peso total y el número de días de la experimentación (Chirinos *et al.*, 2022).

$$\text{GPD (g/día)} = \frac{\text{Ganancia de peso total}}{\text{N}^\circ \text{ de días de experimentación}}$$

### 3.8.4. Consumo de Alimento Diario (CAD)

El consumo de alimento diario se calculó como relación entre la diferencia promedio del peso de la ración diaria (3% de la biomasa para cada tratamiento por triplicado) y el peso del alimento sobrante diario (ambos expresados en gramos), y el número de días de la experimentación.

$$\text{CAD (g/día)} = \frac{\text{Prom. (Peso de ración diaria - Peso diario de alimento sobrante)}}{\text{Nº de días de experimentación}}$$

### 3.8.5. Índice de Conversión Alimenticia Aparente (ICAA)

El Índice de Conversión Alimenticia Aparente se calculó mediante la relación entre la cantidad del alimento (kg) y el incremento de la biomasa (kg), este parámetro expresa la cantidad de alimento (kg) necesario para producir un kilogramo de carne de pez en el cultivo. Este parámetro determina la efectividad de los alimentos suministrados (Castell & Tiews, 1980).

$$\text{ICAA} = \frac{\text{Cantidad de alimento suministrado (kg)}}{\text{incremento de la biomasa (kg)}}$$

### 3.8.6. Tasa de Crecimiento Específico (TCE)

La tasa de crecimiento específico expresa el crecimiento del pez (en términos del peso) relacionado con el tipo de alimento suministrado (Jauncey, 1982), además es un indicador de la respuesta a agentes bióticos o abióticos en el cultivo, influenciado principalmente por la calidad del alimento (Tacon, 1987).

$$\text{TCE (\%)} = \frac{[(\text{Ln Peso promedio final} - \text{Ln Peso promedio inicial})]}{\text{Nº de días de experimentación}} \times 100$$

### 3.8.7. Tasa de Crecimiento Relativo (TCR)

La Tasa de Crecimiento Relativo expresa la relación entre la ganancia de peso de los individuos con respecto al peso promedio inicial, se expresa en porcentaje (Huamán, 2016).

$$\text{TCR (\%)} = \frac{\text{Peso promedio final} - \text{Peso promedio inicial}}{\text{Peso promedio inicial}} \times 100$$

### 3.8.8. Factor de Condición (K)

El factor de Condición expresa el grado de bienestar o condición somática de una especie o población respecto al medio donde se desarrolla en función a su nutrición. También es llamado “Grado de Robustez”.

$$K = \frac{\text{Peso promedio}}{\text{Longitud promedio}^3} \times 100$$

### 3.8.9. Coeficientes de Variación de Peso (CVP)

El Coeficiente de Variación de Peso se expresa como la relación entre desviación estándar del peso promedio final y el peso promedio final, se expresa en porcentaje (Gardini & Caceres, 2015).

$$\text{CVP (\%)} = \frac{\text{Desviación estandar del peso promedio final}}{\text{Peso promedio final}} \times 100$$

### 3.8.10. Sobrevivencia (S)

Se expresa como la relación entre el número de individuos que sobreviven al finalizar el proceso experimental, con respecto al número de individuos con el que se inició el experimento (Paredes, 2020).

$$S (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de peces sembrados}}{\text{N}^\circ \text{ de peces cosechados}} \times 100$$

### 3.8.11. Índices morfofisiológicos

El mecanismo de transformación de la energía endógena de los órganos, generan los índices morfofisiológicos como el Índice Hepatosomático (IHS), Índice Viscerosomático (IVS) y el

Índice de Grasa Visceral (IGV) en los seres vivos (Collins & Anderson 1995). Estos proporcionan información directa del crecimiento, reproducción y nutrición de los peces, es decir, el estado de salud en un momento específico (Cifuentes *et al.*, 2012).

#### 3.8.11.1. Índice Hepatosomático (IHS)

Se expresa como la relación entre el peso del hígado respecto al peso del pez eviscerado (expresado en porcentaje).

$$\text{IHS (\%)} = \frac{\text{Peso del hígado}}{\text{Peso del pez eviscerado}} \times 100$$

#### 3.8.11.2. Índice Viscerosomático (IVS)

El Índice Viscerosomático (IVS) relaciona con el contenido visceral respecto al peso del pez (en porcentaje), además, se sabe que este tiende a aumentar por el contenido de carbohidratos y lípidos en la dieta (Aguirre *et al.*, 2015). Resulta importante calcularlo ya que refleja el valor del alimento suministrado a los peces (Malami *et al.*, 2004).

$$\text{IVS (\%)} = \frac{\text{Peso de las vísceras}}{\text{Peso del pez}} \times 100$$

#### 3.8.11.3. Índice de Grasa Visceral (IGV)

El Índice de Grasa Visceral (IGV), está relacionado con los niveles de lípidos en las dietas de los peces. El exceso de estos niveles podría ser almacenado como grasa visceral y alterar los niveles de colesterol y triglicéridos, y causar la disminución del crecimiento de los individuos (Campeche *et al.*, 2018). Se expresa como la relación entre peso de la grasa visceral y el peso del pez, expresado en porcentaje.

$$\text{IGV (\%)} = \frac{\text{Peso de grasa visceral}}{\text{Peso del pez}} \times 100$$

### 3.9. Evaluación de parámetros fisiológicos

La evaluación de los parámetros fisiológicos se realizó en tres etapas de la experimentación:

luego de los 35 días de experimentación y a los 7 días después del desafío bacteriano. Para cada uno de los muestreos se usaron tres peces por replica (en total 9 peces por tratamiento).

Previamente los peces fueron anestesiados con Eugenol a una concentración de 27.35  $\mu\text{L/L}$  de agua (Gonzales, 2019). La toma de muestras se obtuvo mediante punción de la arteria caudal a nivel del arco hemal, con jeringas desechables de 3 ml y agujas de calibre 21G humedecidas con anticoagulante EDTA al 10% (Anexo 9). Las muestras de sangre se separaron en dos microtubos graduados de polipropileno - Eppendorf™, en un microtubo de 0.5 ml para la obtención de plasma y el resto a un microtubo de 2.0 ml para el análisis hematológico (Salvador *et al.*, 2014).

### 3.9.1. Parámetros hematológicos

#### 3.9.1.1. Número de Eritrocitos (Eri)

Se determinó el número de eritrocitos presentes en un milímetro cúbico de sangre, con la ayuda de una cámara de Neubauer y solución Formol/Citrato - FC (Tavares-Días & Moraes, 2004). En un microtubo de 2ml se mezclan 1990  $\mu\text{l}$  de solución con 10  $\mu\text{l}$  de sangre (dilución 1/200 de solución FC), y finalmente se homogenizó la mezcla con un vortex. Para la lectura, se extrajo 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla y se colocó en la cámara Neubauer para proceder a realizar el conteo en un microscopio utilizando el aumento 100x. El conteo se realizó en los cuatro cuadrantes grandes angulares: 1, 3, 7 y 9, tal como se muestra en la figura 6, además se debe tomar en cuenta los eritrocitos adheridos en la línea horizontal superior y vertical exterior (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

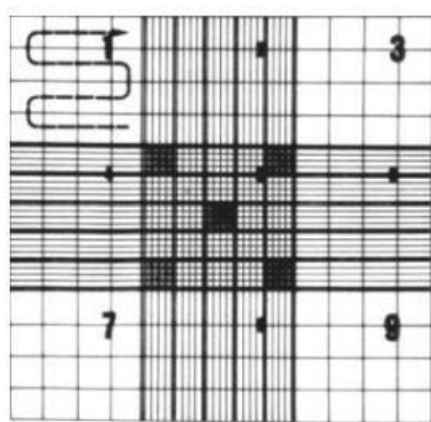


Figura 6: Conteo de eritrocitos en Cámara Neubauer – Métodos para el análisis hematológico en peces (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

El número de eritrocitos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{N}^\circ \text{ de Eritrocitos} / \text{mm}^3 = \text{células contadas} \times 200 \times 10 \times 5$$

Dónde:

200 : factor de dilución

10 : corrección por la altura de cámara

5 : número de sub cuadrículas contadas

### 3.9.1.2. Porcentaje de Hematocrito (% Ht)

Se determinó el porcentaje de hematocrito mediante el llenado de un tubo capilar de microhematocrito, en sus  $\frac{3}{4}$  partes, con sangre y luego se selló la entrada del capilar con plastilina para evitar derrames de la muestra. Luego se colocaron los tubos cargados en una microcentrífuga Hettich-210 a 10000 revoluciones por minuto (RPM) durante cinco minutos. Finalmente se retiraron los capilares de la centrifuga y se realizó la lectura del porcentaje de hematocrito con la ayuda de una regla graduada (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013), representado en la figura 7.

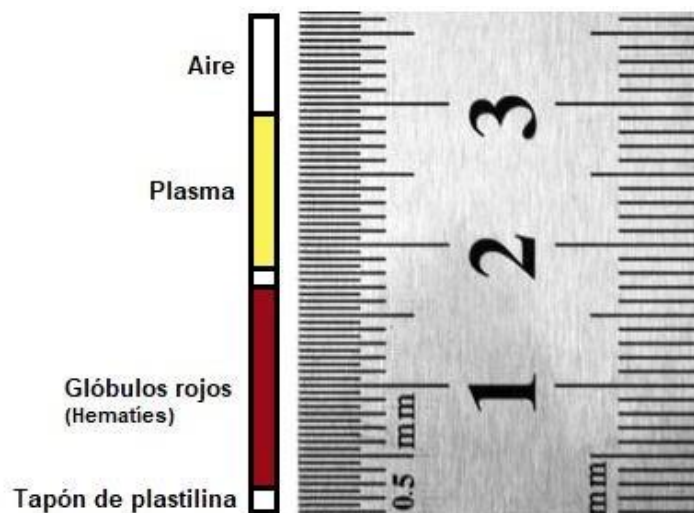


Figura 7: Lectura de hematocrito en tubos capilares - Métodos para el análisis hematológico en peces (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

### 3.9.1.3. Concentración de hemoglobina

Se determinó la concentración de hemoglobina presente en la sangre de los peces según el método de la cianometahemoglobina (Laboratorios BIOLAB, UK) a 540 nm de longitud de onda; con una micropipeta se extrajeron 10 µl de la muestra de sangre, se colocó en un tubo de ensayo previamente cargado con 5 ml de solución Drabkin, se enjuagó la punta de la micropipeta varias veces para expulsar toda la sangre (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). Finalmente se homogenizó y se colocó 80 µl de la mezcla en una cubeta para la lectura en Espectrofotómetro UV – Visible GENESYS 6 (*Serie 335908*) (Tabla 11).

Tabla 13: Ficha técnica de Espectrofotómetro UV – Visible GENESYS 6 (Serie 335908)

Espectrofotómetro UV – Visible		Descripción
	Marca	GENESYS 6
	Serie	335908
Diseño óptico		Detectores duales basados en rejillas de haz dividido
Ancho de banda espectral		1,8 nm
Fuente de lámpara		Xenon
	Rango	190 – 1100nm
Longitud de onda	Precisión	± 1,0 A
Repetibilidad		± 0,5 nm
Fotométrico	Rango	0.1 – 3.0A; 0,3 - 125%T; ± 9999C
	Lectura	Absorbancia, Transmitancia, Concentración
	Precisión	0,5 % o 0,005 A, lo que sea mayor, hasta 2 A
Velocidad de escaneo		10 – 2000 nm/min

Fuente: ©2006 Thermo Electron Corporation.

La determinación de la concentración de hemoglobina se calculó con la siguiente fórmula (Gonzales, 2019):

$$\text{Hb (g/dl.)} = \left( \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO estándar}} \right) \times [\text{Estándar}]$$



Dónde:

DO muestra : Absorbancia de la muestra  
DO estándar : Absorbancia del estándar  
[Estándar] : Concentración de hemoglobina del estándar

### 3.9.1.4. Índices hematimétricos

La determinación de los índices hematimétricos: Volumen Corpuscular Media (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), fueron calculados mediante el método de Wintrobe (1934).

#### - **Volumen Corpuscular Medio (VCM)**

El Volumen Corpuscular Medio (VCM) se expresa como la relación entre el porcentaje de eritrocitos y el número de eritrocitos en sangre, esto representa el volumen de los eritrocitos en la sangre.

$$\text{VCM (fl.)} = \frac{\% \text{ de hematocrito}}{\text{N}^\circ \text{ de eritrocitos}} \times 10$$

#### - **Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)**

La Hemoglobina corpuscular media (HCM), se expresa como la relación entre la concentración de hemoglobina y el número de eritrocitos en sangre, esto representa la cantidad de hemoglobina existente en cada uno de los eritrocitos.

$$\text{HCM (g/dl)} = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{N}^\circ \text{ de eritrocitos}} \times 10$$

### - **Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)**

La Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) se expresa como la relación entre la concentración de hemoglobina y el porcentaje de hematocrito, esto representa la concentración del pigmento hemático en cada uno de los eritrocitos.

$$\text{CHCM (g/dl)} = \frac{\text{Hemoglobina}}{\% \text{ de hematocrito}} \times 100$$

#### **3.9.1.5. Número de leucocitos (Leu)**

Se determinó el número de leucocitos presentes en un milímetro cúbico de sangre, con la ayuda de una cámara Neubauer y solución Natt e Herrick (1952). El procedimiento fue extraer una muestra de sangre, con una pipeta Thomma contadora de leucocitos hasta la marca de 0.5 (Fig. 8), luego se enraza con solución Natt e Herrick hasta la marca de 11, se homogenizó la mezcla manualmente con movimientos ondulatorios. Finalmente se expulsó una cuarta parte de la mezcla, y se colocó 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla en la cámara Neubauer y se realizó el conteo, de la misma manera que la descrita para el conteo de eritrocitos (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).



Figura 8: Pipeta Thomma para dilución de sangre, empleada para el conteo de leucocitos - Métodos para el análisis hematológico en peces (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

El número de leucocitos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{N}^\circ \text{ de Leucocitos / mm}^3 = \frac{\text{células contadas} \times 10 \times 20}{4}$$

Dónde:

10 : corrección por la altura de cámara

20 : factor de dilución

4 : número de cuadrículas contadas

### **3.9.2. Parámetros inmunológicos**

#### **3.9.2.1. Fórmula leucocitaria**

Se realizó un frotis sanguíneo aplicando la Coloración Rosenfeld modificado (Tavares-Días *et al.*, 2003). Se colocó 5 µl de sangre en el portaobjetos y se extendió la sangre con ayuda de otro portaobjetos, luego se realizó el teñido con la solución Rosenfeld y se dejó secar por un periodo de 24 horas. El frotis se observó al microscopio, donde se contó de 200 a más leucocitos de distintos tipos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos), luego de clasificarlos se calcularon las proporciones de cada tipo de leucocitos en función a la cantidad total, los resultados se expresaron en porcentaje de tipos celulares (Tavares-Días *et al.*, 2006).

#### **3.9.2.2. Plasma sanguíneo**

La obtención del plasma sanguíneo se realizó a partir de la sangre extraída, los microtubos graduados de polipropileno - Eppendorf™ de 0.5 ml se colocaron en una centrifuga (TOMOS-USA SCIENCE-TECH GROUP) a 5000 RPM. El plasma sanguíneo fue separado en tubos de 0.1 ml y congelados a -20°C hasta el análisis posterior. A partir del plasma se realizaron los ensayos bioquímicos, los cuales permiten cuantificar la concentración de albumina, proteína, triglicéridos, glucosa y colesterol de acuerdo a los métodos mencionados en la Tabla 14. Las lecturas fueron realizadas en un Espectrofotómetro UV – Visible GENESYS 6 (*Serie 335908*) – Ficha técnica en la Tabla 13, dentro del periodo máximo de 60 minutos post preparación de las muestras. La longitud de onda para cada uno de los ensayos es diferente (Tabla 14), por lo que en cada lectura se procedió a cambiarla (Anexo10).

## - Procedimientos de los ensayos bioquímicos

Para el análisis de los parámetros se siguieron los procedimientos establecidos por el fabricante: DiaSys Diagnostic Systems GmbH Alte Strasse 9/65558 Holzheim – Alemania. Para los ensayos de albumina, triglicéridos, glucosa y colesterol FS\*, se extrajeron 1000 µl de reactivo y se colocaron en cada uno de los tubos de ensayo respectivamente para cada una de las muestras de plasma sanguíneo, además del estándar y el blanco (agua destilada). Se le adicionaron 10 µl de muestra/estándar/agua destilada a cada uno de los tubos, luego seselló con parafilm y se homogenizó. Finalmente, las muestras se llevaron a baño maría a 37°C por un tiempo de 10 minutos y luego fueron colocadas en cubetas para su posterior lectura en el espectrofotómetro a la longitud de onda que le corresponde a cada análisis. Para el análisis de proteína total FS\* se extrajeron 1000 µl de monoreactivo (4 partes de R1 con una parte de R2) y se colocaron en tubos de ensayo para cada una de las muestras de plasma sanguíneo, además del estándar y el blanco (agua destilada). Se le adicionaron 20 µl de muestra/estándar/agua destilada a cada uno de los tubos, luego se sellaron con parafilm y se homogenizaron. Finalmente, las muestras se llevaron a baño maría a 37°C por un tiempo de 5 minutos y fueron colocadas en cubetas para su posterior lectura en el espectrómetro

Tabla 14: Análisis de los ensayos bioquímicos

Ensayo	Longitud de onda (nm)	Método	Fórmula
Triglicéridos FS*	500	Test colorimétrico enzimático utilizando glicerol-3- fosfato- oxidasa (GPO).	Triglicéridos [mg/dL] = $\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Estd/Cal.}} \times \text{Conc. Estd.}$
Albumina FS*	578	Test fotométrico utilizando verde de bromocresol	Albumina [g/dL] = $\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Cal.}} \times \text{Conc. Cal.}$
Glucosa GOB FS*	500	Test fotométrico enzimático “GOD- PAP”	Glucosa [mg/dL] = $\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Cal.}} \times \text{Conc. Cal.}$
Colesterol FS*	500	Prueba enzimática fotométrica “CHOD- PAP”	Colesterol [mg/dL] = $\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Estd/Cal.}} \times \text{Conc. Estd.}$
Proteína total FS*	540	Test fotométrico de acuerdo al método de Biuret	Proteína total [g/dL] = $\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Estd/Cal.}} \times \text{Conc. Estd.}$

Fuente: DiaSys Diagnostic Systems GmbH Alte Strasse 9/65558 Holzheim – Alemania. Elaboración propia.

### **3.10. Determinación de los parámetros proximales del músculo de los peces**

Para la determinación de los parámetros proximales, se sacrificaron a los peces que se les realizó la extracción de sangre luego de los 35 días de experimentación, es decir tres peces de cada replica (en total 9 peces por tratamiento). Se calcularon los tenores de humedad, cenizas en base húmeda, grasas y proteína bruta en base seca; para ello se extrajeron muestras únicamente del músculo de cada pez, luego se trituraron en un mortero y se distribuyó las cantidades requeridas para cada uno de los análisis. El objetivo fue identificar los valores nutricionales y composición química de las especies que se consumen (Izquierdo *et al.*, 2000). Todos los análisis se realizaron por triplicado de acuerdo a las recomendaciones de la A.O.A.C - Modificado (1984), en el laboratorio de Bromatología y Fisiología del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP).

#### **3.10.1. Humedad (HU)**

El porcentaje de humedad se determinó por la pérdida de peso de pequeñas cantidades de material, cuando se sometió a una temperatura de 105 °C, hasta conseguir un peso constante.

#### **3.10.2. Extracto Etéreo o grasa (EE)**

El contenido de grasas se determinó en el extractor de Soxhlet, a través de la extracción continua con éter de petróleo, el resultado se obtiene por diferencia de peso luego de la extracción donde se volatiliza el solvente.

#### **3.10.3. Proteína Bruta (PB)**

Inicialmente se determinó el tenor de nitrógeno total por el método de Micro – Kjeldahl, utilizando 6.25 como factor de conversión. De esta manera el tenor de proteína determinado por cada análisis fue:

$$PB = \text{Tenor de N (\%)} \times 6.25$$

#### **3.10.4. Cenizas o Material Mineral (MM)**

El material mineral o cenizas se determinó quemando las muestras en la mufla a una temperatura constante de 550 ° C por un periodo de tres horas.

#### **3.11. Dosis Letal media (LD50)**

La determinación de los valores LD50 se realizó previamente al desafío bacteriano, este proceso duró 36 horas mediante la inyección de cuatro rangos de dosis de *A. hydrophila* ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFC/pez) y un control con una solución isotónica no toxica para las células - PBS (*Phosphate Buffered Saline*), que además se utiliza para diluir sustancia utilizadas para el cultivo de células (Serrano, 2018). La inoculación se realizó vía intraperitoneal a juveniles sanos de *Brycon amazonicus*, que posteriormente fueron colocados en acuarios (6 peces por tratamiento). Los resultados mostraron como LD50 a  $1.68 \times 10^7$  UFC/mL (Anexo 11).

#### **3.12. Prueba de desafío bacteriano con *Aeromonas hydrophila***

Después de 35 días de la prueba de alimentación se realizó el desafío bacteriano, de acuerdo al protocolo de Oliveira (2011), a cinco peces de cada replica (15 peces por tratamiento), fueron en total 60 peces desafiados con la cepa de la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Se realizó la inoculación vía intraperitoneal con jeringas descartables de 2 ml y agujas de calibre 21G (en medio estéril) a una concentración de  $6 \times 10^7$  UFC/ml. Se utilizó una cepa comercial Kwik Stik *plus* (ATCC 35654™) de Microbiologics Inc.

Se evaluó la mortalidad y los signos clínicos de la enfermedad durante 7 días (Dias *et al.*, 2019), durante este tiempo se evitó el estrés por manipulación de los individuos. Posterior a este periodo, se realizó la toma de muestras de sangre de cada uno de los peces, para determinar los parámetros hematológicos e inmunológicos descritos en el punto 3.9.1. y 3.9.2., respectivamente.

### **3.12.1. Soluciones bacterianas**

La cepa de la bacteria *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654<sup>TM</sup>), se activó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 12). Se extrajeron inóculos de la bacteria, en medio aséptico con mecheros de alcohol y tipo Bunsen, con asas de siembra esterilizadas en placas con agar Infusión Cerebro Corazón/Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a temperatura ambiente 28 °C durante 24 horas. Se extrajeron dos colonias de la placa de BHI sembrada anteriormente y se volvieron a sembrar (en medio estéril) con un asa de siembra en un matraz con Caldo Soya Tripticasa/Tryptic Soy Broth (TSB), el cual fue colocado a un agitador orbital a 150 rpm durante 15 hrs. Confirmado el crecimiento en el caldo por la turbidez, se realizó el peletizado de la bacteria (Oliveira *et al.*, 2011), esto consiste en formar un pelet de la bacteria en un medio isotónico (PSB). El lavado consistió en traspasar la soluciones bacterianas (en caldo de cultivo) a tubos de ensayo estériles con tapa para ser centrifugados a 40 rpm durante 10 minutos, luego se procedió a eliminar el sobrenadante y adicionando PBS estéril durante tres veces (Ngugi *et al.*, 2017). La concentración del tubo con la bacteria, previamente lavada, se obtuvo a través de la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Anexo A).

### **3.13. Procesamiento y análisis de datos**

Los datos obtenidos de las evaluaciones fueron almacenados y procesados en plantillas de cálculo de Microsoft Excel, y los resultados de los parámetros productivos, fisiológicos y proximales de los tratamientos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (Anova). En caso de existencia de significancia en los tratamientos se aplicó la prueba de comparación de promedios de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con el software estadístico SIGMAPLOT 11. Se aplicaron transformaciones estadísticas en los datos que no cumplían con las condiciones para el análisis de Varianza, como: Recuento de monocitos a los 35 y 42 días, el Consumo de Alimento Diario (CDA) a los 35 días, el Índice hepatosomático (IHS) a los 35 días, la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) a los 42 días.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Calidad de agua

En la tabla 15, se muestra el resultado del análisis de calidad de agua, los cuales fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA), y se encontró que ninguno de los parámetros presentan efecto significativo ( $P > 0.05$ ) de la inclusión de aceite esencial en el alimento durante la experimentación.

Tabla 15: Parámetros de calidad de agua registrados durante el proceso de experimentación durante 42 días

Parámetros	0%	0.5%	1%	1.5%
Temperatura (°C)	27.61 ± 0.38 <sup>a</sup>	27.42 ± 0.37 <sup>a</sup>	27.60 ± 0.37 <sup>a</sup>	27.43 ± 0.55 <sup>a</sup>
pH	6.75 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.71 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.76 ± 0.06 <sup>a</sup>
Conductividad (μS/m)	40.64 ± 6.39 <sup>a</sup>	39.15 ± 3.18 <sup>a</sup>	40.08 ± 4.30 <sup>a</sup>	39.18 ± 4.3 <sup>a</sup>
Oxígeno (mg/L)	4.37 ± 0.44 <sup>a</sup>	4.49 ± 0.39 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.50 ± 0.39 <sup>a</sup>
Nitritos - NO <sub>2</sub> (mg/L)	0.31 ± 0.38 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.45 <sup>a</sup>
Amoníaco - NH <sub>3</sub> (mg/L)	0.61 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.58 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.44 <sup>a</sup>
Amonio - NH <sub>4</sub> (mg/L)	0.63 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.61 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.38 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.47 <sup>a</sup>



En todos los sistemas de cultivo fue importante mantener las condiciones óptimas de la calidad de agua, ya que esto influye en el desarrollo de los animales (Reynalte – Tataje *et al.*, 2004). Los valores registrados en el presente estudio como temperatura, pH, conductividad, oxígeno y amonio, fueron similares a los registrados en diversos estudios con sábalo cola roja *Brycon amazonicus* (Pedreira *et al.*, 2006; Frascá-Scorvo *et al.*, 2007; Sipaúba – Tavares *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), en donde reportaron temperatura promedio de 26.0 a 30.0 °C, valores de pH de 5.7 a 7.7, conductividad de 50.0 S/m, valores promedio de oxígeno disuelto entre 2.95 mg/L a 3.45 mg/L y amonio (NH<sub>4</sub>) de 0.77 mg/L siendo estos los valores óptimos recomendados para el cultivo de esta especie (Boyd & Gross, 1998; Castagnoli, 1992). Se recomienda que los valores de nitrito (NO<sub>2</sub>) y amoníaco (NH<sub>3</sub>) sean en promedio menor a 0.07 y menor a 0.36 ppm respectivamente (Sipaúba – Tavares *et al.*, 2008); sin embargo, en la experimentación se registraron valores mayores lo que estaría relacionado al pH y la temperatura, ya que estos parámetros influyen en la toxicidad de varias sustancias como el amoníaco total - no ionizado (NH<sub>3</sub>) e ionizado (NH<sub>4</sub>) (Inoue *et. al.*, 2005)

## **4.2. Evaluación de la alimentación en el desempeño productivo y parámetros fisiológicos**

### **4.2.1. Desempeño productivo**

Los resultados del desempeño productivo que fueron procesados al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) se muestran en la Tabla 16. El peso final, longitud total final, biomasa, ganancia de peso total y diario, tasa de crecimiento específico y relativo, eficiencia alimenticia, índice de conversión alimenticia (ICAA), coeficiente de variación de peso (CVP) e índice hepatosomático no muestran diferencia significativa entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). En el consumo de alimento diario, se determinó que el tratamiento 0% (Control) presenta una mejor consumo estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) en comparación con los demás tratamientos de 0.5%, 1.0% y 1.5% de AE de orégano, estos últimos no presentan diferencia significativa entre ellos ( $P > 0.05$ ). En el caso del factor de condición (K), se presenta un mejor valor en el tratamiento 0% (Control) estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) en comparación con el tratamiento 1.5%, los tratamientos 0.5% y 1.0% no presentan diferencia significativa con ningún tratamiento ( $P > 0.05$ ). El índice viscerosomático (IVS) registro un mayor indicativo en el tratamiento 0% (Control) estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) en comparación con los tratamientos 0.5% y 1.0%,

pero con el tratamiento 1.5% no registro tener una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). En el índice de grasa visceral (IGV) se registró un mayor índice en el tratamiento Control (0%) con diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con el tratamiento 0.5%, los demás tratamientos no registraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). La sobrevivencia durante esta etapa de la experimentación se mantuvo en 100% para todos los tratamientos.

Tabla 16: Parámetros productivos de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* suplementados con aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* en una dieta comercial durante 35 días

Parámetros	0%	0.5%	1.0%	1.5%
<b>Peso Inicial (g)</b>		167.8 ± 15.5		
<b>Peso Final (g)</b>	206.3 ± 21.8 <sup>a</sup>	195.1 ± 15.6 <sup>a</sup>	197.1 ± 25.0 <sup>a</sup>	198.2 ± 17.2 <sup>a</sup>
<b>Longitud Total Final (cm)</b>	23.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	23.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	23.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	23.8 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>Biomasa (g)</b>	2062.9 ± 65.5 <sup>a</sup>	1950.6 ± 87.7 <sup>a</sup>	1970.9 ± 95.9 <sup>a</sup>	1981.6 ± 47.7 <sup>a</sup>
<b>Ganancia de Peso (g)</b>	40.4 ± 2.7 <sup>a</sup>	25.9 ± 8.0 <sup>a</sup>	28.9 ± 10.4 <sup>a</sup>	30.1 ± 4.4 <sup>a</sup>
<b>GPD (g/día)</b>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>TCE (%/día)</b>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>TCR (%)</b>	24.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	15.3 ± 4.7 <sup>a</sup>	17.2 ± 6.3 <sup>a</sup>	17.9 ± 2.6 <sup>a</sup>
<b>CAD (g/día)</b>	32.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	27.9 ± 1.1 <sup>b</sup>	29.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	28.3 ± 0.4 <sup>b</sup>
<b>Eficiencia Alimenticia (%)</b>	35.11 ± 3.2 <sup>a</sup>	26.3 ± 7.3 <sup>a</sup>	28.0 ± 9.3 <sup>a</sup>	30.4 ± 4.9 <sup>a</sup>
<b>ICAA</b>	2.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
<b>CVP (%)</b>	10.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	13.1 ± 3.3 <sup>a</sup>	9.8 ± 4.0 <sup>a</sup>
<b>Factor de condición</b>	1.51 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.48 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.07 <sup>b</sup>
<b>Índice viscerosomático (%)</b>	8.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.4 <sup>b</sup>	7.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	7.4 ± 0.3 <sup>ab</sup>
<b>Índice hepatosomático (%)</b>	1.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>Índice de grasa visceral (%)</b>	2.81 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.25 ± 0.5 <sup>ab</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>ab</sup>
<b>Sobrevivencia (%)</b>	100	100	100	100

GPD= Ganancia de peso diario; TCE= Tasa de crecimiento específico; TCR= Tasa de crecimiento relativo; CAD= Consumo de alimento diario; ICAA = Índice de conversión alimenticia aparente y CVP = Coeficiente de variación de peso.

La inclusión de aceites esenciales en la dieta de los peces, ha registrado resultados alentadores como promotores del crecimiento e inmunoestimulante en diversas especies (Encarnaçã, 2016). Esta estrategia nutricional se enfoca en mejorar la respuesta inmunológica y fisiológica para contrarrestar el estrés y promover mejoras en el funcionamiento del tracto gastrointestinal (Sutili et al., 2017). La tendencia a usar estos compuestos se ha ido incrementando como alternativa natural en lugar del uso de antibióticos (Baba et al., 2016). El presente estudio determinó que la inclusión de diferentes dosis de aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* (0.5%, 1.0% y 1.5%) no presentó efectos significativos en los parámetros productivos (peso final, longitud final, biomasa, ganancia de peso, ganancia de peso diario, tasa de crecimiento específico, la tasa de crecimiento relativo, eficiencia alimenticia, índice de conversión alimenticia aparente, coeficiente de variación de peso, índice hepatosomático y sobrevivencia) como suplemento en la dieta del sábalo cola roja *Brycon amazonicus*. Diversos estudios registraron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, Martínez (2018) reportó que el aceite esencial de orégano *Lippia graveolens* en la dieta de tilapia *Oreochromis niloticus* no presenta efecto positivo en los parámetros productivos, de igual manera con el uso de orégano *Origanum vulgare* en diferentes concentraciones (0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125 y 0.15%) tampoco registró resultados positivos en la misma especie (Espirito et al., 2020). Del mismo modo existen estudios que demuestran que varios aceites esenciales no producen efectos positivos en estos parámetros como el AE de menta *Mentha piperita* en tilapia (De Souza-Silva et al., 2019), de dátil *Phoenix dactylifera* L. en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Gaballah et al., 2021) y de cascara de limón cítrico en tilapia *Oreochromis mossambicus* (Baba et al., 2016). Esto se encuentra estrechamente relacionado a las concentraciones de AE utilizadas en los ensayos y la composición química de los AE (Gültepe et al., 2014b). Los peces alimentados con las dietas suplementadas (0.5, 1.0 y 1.5%) tuvieron menor consumo del alimento diario (CAD), similar a un estudio de suplementación alimenticia con AE de orégano en Lubina *Dicentrarchus labrax* a concentraciones mayores de 100 ppm se reducía considerablemente la ingesta de alimento (Dinardo et al., 2020). Sin embargo, otro estudio en donde se emplea un producto comercial a base de aceite esencial de orégano - Ropadiar Polvo plus® a una concentración de 5 % y 10 %, muestra que el sabor aromático del AE de orégano aumento la palatabilidad del alimento para la tilapia *Oreochromis niloticus*, lo que resultó en una alta ingesta voluntaria del alimento e incremento del peso (Abdel-Latif & Khalil, 2014). El olor y sabor intenso debido a la alta concentración de AE podría reducir la palatabilidad, lo que conduce a un rendimiento de crecimiento deficiente de los peces. El factor de condición

refleja el estado fisiológico del pez en relación a su bienestar (Lizama & Ambrósio, 2002; Cifuentes *et al.*, 2012), desde el punto de vista nutricional se encuentra relacionado a la ganancia de peso y acumulación de grasa (Le Cren, 1951). El tratamiento control (0%) al presentar una mayor ingesta de alimento, presentó un mejor factor de condición en comparación con el tratamiento 1.5%, eso también se reportó en estudios donde se utilizaron dosis altas de aceites esencial donde evidencia un efecto inverso en cuanto a la dosis de aceite esencial y los efectos beneficiosos en los parámetros productivos, sin embargo esto también puede estar relacionado al periodo de tiempo experimental (De Moraes *et al.*, 2014; Diler *et al.*, 2017; Dinardo *et al.*, 2020). En el índice viscerosomático e índice de grasa visceral los menores valores se registran en los grupos de peces que consumieron el alimento suplementado (0.5, 1.0 y 1.5%) con aceite esencial de orégano que es resultado del menor consumo de alimento, debido a que algunas vísceras como el hígado acumulan glucógeno y nutrientes para la formación de proteínas y la grasa visceral es un almacenamiento de energía, que se reduce ante menor o deficiente consumo de nutrientes (Takahashi *et al.*, 2011; Robisalmi *et al.*, 2021).

#### **4.2.2. Análisis fisiológicos**

##### **4.2.2.1. Parámetros hematológicos**

Se registraron los resultados de los parámetros hematológicos en la tabla 17, según el análisis de varianza (ANOVA). El porcentaje de hematocrito registró una mejor proporción en el tratamiento 1.5%, estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ), en comparación con el tratamiento 0.5%, sin embargo, los demás tratamientos no expresaron tener una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). El número de eritrocitos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) no registraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos. Los leucocitos, a pesar de no mostrar diferencia significativa, registró un incremento en el tratamiento de 0.5% de AE de orégano. En el caso de la hemoglobina, expresó una mayor cantidad estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento de 1.5% en comparación con el tratamiento 0% (Control), los demás tratamientos 0.5% y 1.0% no registraron tener diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

Tabla 17: Parámetros hematológicos de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* suplementados con aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* en una dieta comercial durante 35 días

Parámetros	0%	0.5%	1%	1.5%
<b>Hematocrito (%)</b>	57.0 ± 3.6 <sup>ab</sup>	53.2 ± 3.4 <sup>b</sup>	54.9 ± 2.7 <sup>ab</sup>	58.2 ± 3.2 <sup>a</sup>
<b>Eritrocitos (x10<sup>6</sup> cel/μL)</b>	4.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	10.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	11.6 ± 0.5 <sup>ab</sup>	11.7 ± 0.5 <sup>ab</sup>	11.9 ± 0.8 <sup>b</sup>
<b>VCM (fL)</b>	136.6 ± 21.1 <sup>a</sup>	141.3 ± 11.1 <sup>a</sup>	142.6 ± 11.7 <sup>a</sup>	139.3 ± 12.2 <sup>a</sup>
<b>HCM (pg)</b>	27.8 ± 4.3 <sup>a</sup>	30.8 ± 2.4 <sup>a</sup>	30.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	28.1 ± 2.6 <sup>a</sup>
<b>CHCM (g/dL)</b>	20.5 ± 2.2 <sup>a</sup>	21.9 ± 1.7 <sup>a</sup>	21.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	20.2 ± 0.9 <sup>a</sup>
<b>Leucocitos (10<sup>3</sup>/μL)</b>	5.8 ± 2.1 <sup>a</sup>	6.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	5.3 ± 2.7 <sup>a</sup>	5.3 ± 1.2 <sup>a</sup>

VCM = volumen corpuscular medio, HCM = hemoglobina corpuscular media y CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media.

La sangre se utiliza como indicador del sistema inmunológico específico del pez (Tewary & Patra, 2011), así como también permite evaluar el estrés, estado nutricional y salud en general de los peces (Khalafalla *et al.*, 2020). En el presente estudio no se registraron efectos del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* en los valores de hematocrito, conteo de eritrocito, leucocitos, VCM, HCM y CHCM. Se obtuvieron resultados similares al presente estudio, con la adición de aceite esencial de menta y té en la alimentación de tilapia del Nilo, donde los parámetros hematológicos tampoco se vieron alterados (Valladao *et al.*, 2017). Así mismo, Saccol (2013), quien realizó la suplementación con AE de *Lippia alba* del alimento suministrado al bagre plateado, durante un periodo de 60 días, no registró influencia en los parámetros sanguíneos de estos animales. Por otro lado, la inclusión de hojas secas de orégano en la dieta de tilapias de Nilo tampoco indujo efectos significativos sobre los parámetros hematológicos (Espirito *et al.*, 2020). La hemoglobina presentó un incremento significativo en los peces alimentados con la mayor concentración (1.5%) frente al control. Estudios similares reportaron el mismo efecto para gamitana *Colossoma macropomum* y lubina asiática *Lates calcarifer*, alimentadas con dietas suplementadas a base de aceite esencial y hojas de *Menta piperita* respectivamente (Talpur, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016), así mismo *Lobelia rohita* presentó el mismo efecto con dietas de extractos de *Mucuna pruriens*

(Ojha *et al.*, 2014). La hemoglobina presenta incremento proporcional a la concentración del aceite suministrado a los peces debido a las propiedades inmunoestimulantes del aceite esencial (Chakraborty & Hancz, 2011). El incremento de hemoglobina en los eritrocitos indica un mayor transporte de oxígeno que tendría un efecto de bienestar en sistema inmune de los peces (Talpur & Ikhwanuddin, 2012).

#### 4.2.2.2. Parámetros inmunológicos

En la tabla 18, se registra los resultados finales de los parámetros inmunológicos sometidos a la prueba de análisis de varianza (ANOVA), en donde el número de linfocitos presentó diferencia significativa ( $P < 0.050$ ) entre los tratamientos de 0.5% y 1%; este último presentando menor número de linfocitos en sangre. Los demás parámetros no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.050$ ) entre los tratamientos.

Tabla 18: Parámetros inmunológicos de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* suplementados con aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* en una dieta comercial durante 35 días

Parámetros	0%	0.5%	1%	1.5%
Linfocitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$3.5 \pm 1.4^{\text{ab}}$	$4.4 \pm 1.2^{\text{a}}$	$2.2 \pm 0.6^{\text{b}}$	$3.5 \pm 1.2^{\text{ab}}$
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$1.8 \pm 1.0^{\text{a}}$	$1.8 \pm 0.5^{\text{a}}$	$2.3 \pm 1.9^{\text{a}}$	$1.8 \pm 0.4^{\text{a}}$
Monocitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$0.10 \pm 0.05^{\text{a}}$	$0.01 \pm 0.02^{\text{a}}$	$0.14 \pm 0.14^{\text{a}}$	$0.05 \pm 0.11^{\text{a}}$
Glucosa (mg/dL)	$46.1 \pm 9.0^{\text{a}}$	$49.3 \pm 7.5^{\text{a}}$	$40.6 \pm 9.2^{\text{a}}$	$52.1 \pm 16.0^{\text{a}}$
Albumina (g/dL)	$1.9 \pm 0.2^{\text{a}}$	$1.9 \pm 0.2^{\text{a}}$	$1.9 \pm 0.2^{\text{a}}$	$2.0 \pm 0.3^{\text{a}}$
Proteína (g/dL)	$3.8 \pm 0.4^{\text{a}}$	$3.9 \pm 0.2^{\text{a}}$	$3.8 \pm 0.4^{\text{a}}$	$4.1 \pm 0.5^{\text{a}}$
Colesterol (g/dL)	$192.2 \pm 39.6^{\text{a}}$	$206.4 \pm 33.1^{\text{a}}$	$222.5 \pm 37.0^{\text{a}}$	$199.9 \pm 34.5^{\text{a}}$
Triglicéridos (g/dL)	$546.5 \pm 72.0^{\text{a}}$	$458.6 \pm 118.6^{\text{a}}$	$475.3 \pm 102.2^{\text{a}}$	$489.8 \pm 109.8^{\text{a}}$

La respuesta inmunológica de los peces generalmente es evaluada a través del estudio de la actividad de la lisozima, leucocitos y el recuento diferencial de estos (Mohamed *et al.*, 2021).

Se ha confirmado en diversos estudios que la inclusión de compuestos herbales mejoran la respuesta inmune y minimizan pérdidas por enfermedades virales, bacterianas y parasitarias en peces marinos y de agua dulce (Harikrishnan *et al.* 2011). En el presente estudio la suplementación con aceite esencial de orégano no influyó en los parámetros inmunológicos del conteo diferencial de leucocitos. Similares resultados se reportaron en alevines de *Labeo victorianus* con dietas suplementadas a base de aceite esencial de limón amargo *Citrus limón* (Ngugi *et al.*, 2017) y en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* con extracto de orégano (Pourmoghim *et al.*, 2015), esto debido a que no existe una dosis óptima, tiempo de experimental o método de administración establecidos. En los parámetros bioquímicos no se registraron variaciones entre los tratamientos con AE esencial respecto a los peces del tratamiento control, similar a lo reportado por otros estudios realizados en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* suplementada con aceite esencial de *Ducrosia anethifolia* (Vazirzadeh *et al.*, 2017) y en goldfish *Carasius auratus* con raíz de *Ferula elaeochytris* en la dieta (Inanan *et al.*, 2021), esto se debe a que probablemente las concentraciones testadas no fueron suficientes para generar cambios en los parámetros bioquímicos séricos.

#### **4.2.3. Análisis de la composición proximal**

Los resultados del análisis de la composición proximal en el músculo de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* al ser sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA), se presentan en la Tabla 21. Los parámetros de humedad, ceniza y lípidos no presentan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos. El análisis de proteína registra un mejor porcentaje en el tratamiento 0.5% estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) en comparación con el tratamiento 1.5%, los demás tratamientos no presentan diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

Tabla 19: Composición proximal del músculo de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* suplementados con aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* en una dieta comercial durante 35 días

Composición	0%	0.5%	1%	1.5%
<b>Humedad (%)</b>	75.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	75.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	75.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	76.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>Ceniza (%)</b>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>Lípidos (%)</b>	2.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
<b>Proteína (%)</b>	21.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>	21.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.5 ± 0.4 <sup>ab</sup>	21.1 ± 0.7 <sup>b</sup>

El contenido proximal de músculo de los peces depende de varios factores relacionados con la alimentación (Castagnolli, 1979). La composición corporal de los juveniles de sábalo *Brycon amazonicus* alimentados con aceite esencial de orégano no presentaron cambios en la composición de humedad, cenizas, lípidos y proteínas. Resultados similares fueron obtenidos en suplementación dietética con aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* en alevinos de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Heluy *et al.*, 2020) y al adicionar carvacrol en las dieta de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Yilmaz *et al.*, 2015). Sin embargo otros estudios con la inclusión de aceites esenciales en la dieta muestran efectos de incremento de proteína en el bagre de canal *Ictalurus punctatus* con el aceite esencial de orégano *Origanum heracleoticum* L. y el bagre *Lophiosilurus alexandri* con aceite esencial de orégano *O. vulgare* (Zheng *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2020), esto se encuentra estrechamente relacionado a la composición y concentración de los compuesto activos del AE de orégano, además de los niveles de inclusión, fase de desarrollo y características intrínsecas de cada especie (Yilmaz *et al.*, 2015).



### 4.3. Desafío bacteriano

#### 4.3.1. Análisis fisiológico

##### 4.3.1.1. Parámetros hematológicos

En la Tabla 20, se expresan los resultados finales de los parámetros hematológicos luego del desafío bacteriano con *A. hydrophila*, los cuales fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA). Los parámetros hematocrito, eritrocitos, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos establecidos. En los leucocitos el tratamiento 1.0% presenta la mayor cantidad y diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con los tratamientos 0.5% y 0% (Control), este último presenta la menor presencia de leucocitos; el tratamiento 1.5% presentó solo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con el tratamiento 0% (Control). En el caso de la sobrevivencia, el tratamiento 0% (Control) presenta diferencia significativa ( $p < 0.050$ ) y un mayor porcentaje con respecto a los tratamientos de 0.5% y 1.5%.

Tabla 20: Sobrevivencia y parámetros hematológicos de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* después de 7 días del desafío bacteriano con *Aeromonas hydrophila*

Parámetros	0%	0.5%	1%	1.5%
Sobrevivencia (%)	80.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	40.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	66.7 ± 11.6 <sup>ab</sup>	40.0 ± 20.0 <sup>b</sup>
Hematocrito (%)	46.3 ± 10.1 <sup>a</sup>	41.8 ± 4.5 <sup>a</sup>	42.0 ± 6.9 <sup>a</sup>	45.9 ± 9.0 <sup>a</sup>
Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> cel/μL)	3.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	9.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	10.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	9.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	9.3 ± 1.7 <sup>a</sup>
VCM (fL)	156.2 ± 17.9 <sup>a</sup>	145.9 ± 22.2 <sup>a</sup>	145.9 ± 22.8 <sup>a</sup>	151.7 ± 20.7 <sup>a</sup>
HCM (pg)	35.6 ± 10.1 <sup>a</sup>	35.6 ± 4.0 <sup>a</sup>	37.0 ± 4.2 <sup>a</sup>	30.9 ± 4.1 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	20.9 ± 5.1 <sup>a</sup>	24.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	23.7 ± 4.4 <sup>a</sup>	20.4 ± 1.8 <sup>a</sup>
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	9.8 ± 2.0 <sup>c</sup>	12.8 ± 1.2 <sup>bc</sup>	18.1 ± 3.4 <sup>a</sup>	14.2 ± 4.3 <sup>ab</sup>

VCM = volumen corpuscular medio, HCM = hemoglobina corpuscular media y CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media.

Los parámetros hematológicos posteriores al desafío bacteriano no presentaron variación

entre los peces suplementados con el aceite esencial y el control excepto en los leucocitos, donde se incrementaron en las dosis más altas de 1 y 1.5%. (Ribeiro *et al.*, 2016), en gamitana *Colossoma macropomum*, suplementada con aceite esencial de menta *Mentha piperita* no mostró cambios en los parámetros hematológicos después del desafío bacteriano con *A. hydrophila*. Se reportó que en lubina asiática *Lates calcarifer* suplementada con ajo *Allium sativum* desafiada con *Vibrio harveyi* donde los parámetros bioquímicos no tuvieron influencia y demuestra el incremento de los leucocitos posterior al desafío bacteriano (Talpur & Ikhwanuddin, 2012), como una respuesta a la infección causados por la bacteria y la estimulación del mecanismo de defensa para hacer frente al patógeno.

Los aceites esenciales tienen efectos beneficiosos en la resistencia frente a diferentes patógenos debido a la capacidad antimicrobiana de sus principales componentes (Da Cunha *et al.*, 2010). Después de 7 días del desafío bacteriano con *A. hydrophila* se presentó mortalidad y signos de enfermedad en todos los tratamientos. Los peces con las dosis de 0.5 y 1.5% presentaron las mayores mortalidades frente al control. En estudios similares no se reportaron mortalidades respecto la suplementación con aceite esencial de *Mentha piperita* desafiado con *A. hydrophila* en *C. macropomum* (Ribeiro *et al.*, 2016). Sin embargo otros estudios demuestran resultados de menor mortalidad para el bagre del canal *Ictalurus punctatus* con aceite esencial de orégano *Origanum heracleoticum* L desafiado con *A. hydrophila* (Zheng *et al.*, 2009), así mismo para tilapia del Nilo suplementado con aceite esencial de la cáscara de naranja y desafiado con *Streptococcus iniae* (Acar *et al.*, 2015). Probablemente la mayor mortalidad demostraría un efecto negativo, ocasionado por la menor ingesta del alimento con aceite esencial reduciendo los compuestos activos asimilados por los peces.

#### **4.3.1.2. Parámetros inmunológicos**

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros inmunológicos se presentan en la Tabla 21, en donde se encontró que ninguno de los parámetros presenta diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos establecidos para la experimentación.

Tabla 21: Parámetros inmunológicos de juveniles de sábalo cola roja *Brycon amazonicus* después de 7 días del desafío bacteriano con *Aeromonas hydrophila*

Parámetros	0%	0.5%	1%	1.5%
Linfocitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$3.6 \pm 1.7^a$	$5.7 \pm 3.6^a$	$6.5 \pm 3.8^a$	$6.3 \pm 3.0^a$
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$5.1 \pm 3.7^a$	$4.6 \pm 3.1^a$	$7.4 \pm 4.7^a$	$6.9 \pm 2.9^a$
Monocitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$1.0 \pm 0.9^a$	$1.6 \pm 2.7^a$	$1.5 \pm 1.3^a$	$1.0 \pm 0.8^a$
Heterófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$0.01 \pm 0.03^a$	$0.02 \pm 0.06^a$	$0.06 \pm 0.11^a$	$0.01 \pm 0.02^a$
Glucosa (mg/dL)	$48.8 \pm 28.5^a$	$29.4 \pm 11.0^a$	$45.5 \pm 19.4^a$	$50.6 \pm 19.4^a$
Albumina (g/dL)	$1.8 \pm 0.3^a$	$2.0 \pm 0.2^a$	$1.7 \pm 0.5^a$	$2.0 \pm 0.4^a$
Proteína (g/dL)	$4.0 \pm 0.7^a$	$4.2 \pm 0.2^a$	$4.0 \pm 0.7^a$	$4.0 \pm 0.8^a$
Colesterol (g/dL)	$188.8 \pm 75.4^a$	$194.4 \pm 47.3^a$	$204.7 \pm 88.3^a$	$232.7 \pm 62.1^a$
Triglicéridos (g/dL)	$251.6 \pm 69.5^a$	$252.7 \pm 43.8^a$	$228.4 \pm 90.0^a$	$246.7 \pm 63.8^a$

La respuesta ante agentes estresantes o condiciones adversas puede influenciar el recuento diferencial de los leucocitos y los niveles de los parámetros bioquímicos como glucosa, albumina, proteína, colesterol y triglicéridos en la sangre de los peces (Tavares-Días *et al.*, 2008). El conteo diferencial de leucocitos y parámetros bioquímicos no tuvo influencia en los peces suplementados con el aceite esencial de orégano a pesar de mostrar efecto en el conteo total de leucocitos. Similares resultados fueron reportados para monocitos, linfocitos y neutrófilos, así como para glucosa, proteína total, colesterol, triglicéridos y albumina post desafío con *Vibrio harveyi* en lubina asiática *Lates calcarifer* suplementada con ajo *Allium sativum* (Talpur & Ikhwanuddin, 2012), en donde la disminución del contenido adiposo se asocia a un mejoramiento del sistema inmune, que asociado al AE de orégano, depende del contenido de carvacrol y al periodo experimental al que se encuentren los peces. Además, se

reportó en gamitana *Colossoma macropomum* que la suplementación con aceite esencial de menta *Mentha piperita* no influyó en los niveles de glucosa y colesterol después del desafío bacteriano con *A. hydrophila* (Ribeiro *et al.*, 2016).

## V. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo de investigación, las dosis de aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* no tuvieron influencia en los parámetros productivos, a excepción del factor de condición donde tuvo un efecto negativo en la mayor dosis (1.5%).
- La mayor dosis (1.5%) presentó un impacto positivo en algunos parámetros hematológicos, como hematocrito y hemoglobina; sin embargo, en los parámetros inmunológicos la dosis de 0.5% produjo un efecto positivo al incrementar el número de linfocitos en la sangre.
- No se registraron efectos positivos en el estado fisiológico del sábalo cola roja *Brycon amazonicus*, luego del desafío bacteriano en la mayoría de los parámetros evaluados, sin embargo, la dosis de 1.0% presentó un impacto positivo en el número de leucocitos.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la suplementación alimenticia durante un periodo de tiempo más prolongado para poder evidenciar una diferenciación marcada entre tratamientos.
- Realizar cortes histológicos del intestino anterior y posterior, con la finalidad de evidenciar la propiedad del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* como promotor del crecimiento.
- Realizar la prueba de lisozima, complementariamente para evidenciar agentes estresantes en los peces.
- Realizar una prueba de antibiograma para determinar la susceptibilidad de la bacteria *Aeromonas hydrophila* frente al aceite esencial de orégano.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Latif, H. M., & Khalil, R. H. (2014). Evaluation of two phytobiotics, *Spirulina platensis* and *Origanum vulgare* extract on growth, serum antioxidant activities and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Int. J. Fish. Aquat. Stud*, 250, 250-255.
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food control*, 35(1), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Abimorad, E. G., Squassoni, G. H., & Carneiro, D. J. (2008). Apparent digestibility of protein, energy, and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture nutrition* 14(4), 374-380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00544.x>
- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437, 282-286. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.015>
- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). *Información tecnológica*, 24(4), 43-48. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000400005>
- Agua Verde Acuicultura. (2011). Yamú - *Brycon amazonicus*. Ficha Técnica de Calidad de Agua para Bocachico. Recuperado de <https://sites.google.com/site/aguaverdeacuicultura2/yamu>

- Aguirre, M & Muñoz, L. (2015). Evaluación de dos niveles de proteína en dietas para juveniles de Sabaleta *Brycon Henni*. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales* 2:61p.
- Alcántara, B. (1991). Situación de la piscicultura en la Amazonía Peruana y estrategia para su desarrollo. *Folia Amazónica*, 3, 100-108.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (1984). Official methods of analysis. *12th edn., Washington, DC* p.1015.
- Arias J. A., Benavides M., Hernández G. & Eslava P. R. (2003). Valoración hematológica y química sanguínea del yamú *Brycon siebenthalae*, en tres etapas de cultivo. *Orinoquia* 7: 34-41. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89670206>
- Arias, C. J. A. (1996). Contribución al conocimiento de los peces de los llanos, anatomía, histología y fisiología del yamú *Brycon siebenthalae* (Eingenmann, 1912). *In 3er Simposio Col Ictiol.* 51p.
- Arias, C. J. A., & Murillo, P. R. (2000). Evaluación de dos densidades de siembra en policultivo del yamú *Brycon siebenthalae* con cherna *Colossoma macropomum* y coporo *Prochilodus mariae*. *VI Jornada de Acuicultura, Segunda Reunión Regional del Género Brycon*, 17-20.
- Arias, C.J., Zaniboni-Filho, E.& Aya, B.E. (2006). Indicadores del ciclo reproductivo del yamú *Brycon amazonicus*. *Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia*. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89610204>
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., & Yılmaz, S. (2016). Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, 465, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.023>
- Berger, C. (2020). La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*, 1(1), e003-e003. <https://doi.org/10.21142/SS-0101-2020-003>
- Bernal, R. J., & Cala, P. (1997). Composición de la dieta alimenticia del yamú *Brycon siebenthalae* (Pisces: *Characidae*), en la parte media del río Guayabero, sistema del alto río Guaviare, Colombia. *Dalia*, 2, 55-63. Borba, M. R., Fracalossi, D. M. &



- Pezzato, L. E. (2006). Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture Nutrition*, 12(3), 183-191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00401.x>
- Boyd, C. E., & Gross, A. (1998). Use of probiotics for improving soil and water quality in aquaculture ponds. *Advances in shrimp biotechnology*, 101-105.
- Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>
- Burgos-Morán, R., Sanchez, J., Andino, M., Torres, D., & Salazar, L. (2018). Madurez, reproducción y desarrollo embrionario del Sábalo (*Brycon amazonicus*) a distintas temperaturas en la Amazonía ecuatoriana.
- Burt, S. A. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. *Utrecht University*. Recuperado de: <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/24273>
- Calderón, K. (2019). Determinación del requerimiento de proteína bruta de alevinos de sábalo cola roja (*Brycon erythropterum*) (Tesis Ing. Zootecnista. Lima). *Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú*.
- Campbell, T., & Murru, F. (1990). An introduction to fish hematology. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 12(4), 525-532. Recuperado de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19912215332>
- Campeche, D. F. B., Andrade, D. H. de H., Souza, A. M., Melo, J. F. B., & Bezerra, R. de S. (2018). Dietary protein:lipid ratio changes growth, digestive enzyme activity, metabolic profile and haematological parameters in hybrid surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum* × *Leiarius marmoratus*). *Aquaculture Research*, 49(7), 2486-2494. <https://doi.org/10.1111/are.13708>
- Carvalho, E. G. (2001). Redução na oferta de ração: Efeitos no metabolismo energético e na maturação gonadal do matrinxã (*Brycon cephalus*, TELEOSTEI: *Characidae*) em cativeiro (Doctoral dissertation, Tesis). *Jaboticabal (Brasil), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias*.

- Castagnolli, N. (1979). Fundamentos de nutrição de peixes. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - *Campus de Jaboticabal. São Paulo*. 189 pp.
- Castagnolli, N. (1992). Criação de Peixes de Água Doce. *FUNEP*. 188p.
- Castell, J. D., & Tiews, K. (1980). Report of the EIFAC, JUNS and ICES working group on the standarization of methodology in fish nutrition research. *Hamburg, Federal Republic of Germany. EIF AC Tech. Pap.*, 36. 24p
- Chakraborty, S. B., & Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3(3), 103-119. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1- 19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>
- Chirinos O., N., Díaz V., J., & Mego M., V. (2022). Efecto de dietas extruidas en base a torta de castaña y fruto de macambo, sobre los índices de crecimiento y zootécnicos en el cultivo de pacos juveniles. *Ariotake–Revista de Investigación Veterinaria y Amazonía*,1(1), e176-e176. <https://doi.org/10.55873/ariva.v1i1.176>
- Chirinos, O.; Mc Bride, E.; Abarca, J.; Coaquira, J.; García, L. & León, D. (2009). Exportación de orégano de Tacna al mercado de Brasil. – *Lima. Universidad ESAN*, 210 p. Recuperado de : <https://hdl.handle.net/20.500.12640/96>
- Cifuentes, R., González, J., Montoya, G., Jara, A., Ortiz, N., Piedra, P., & Habit, E. (2012). Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)*, 76, 86-100. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382012000100009>
- Collins, A.L. & T.A. Anderson. (1995).The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.* 47:1004-1015. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb06024.x>
- Cruz, C.; Arias, C.; Vásquez, T.& Eslava, M. (2000). Cultivo de la cachama y el yamú en los Llanos Orientales de Colombia. *Revista Colombiana de ciencia y tecnología*. 18:10. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11146/2187>
- Cyrino, J.E.P.; Castagnolli, N.& Pereira filho, M. (1986). Digestibilidade da proteína de origem animal e vegetal pelo matrinxã *Brycon ceplalus* (Günther, 1869)

(*Euteleostei, Characiformes, Characidae*). *Anais do V Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. Cuiabá*.p.49-62

- Da Cunha, M.; De Barros, F.; De Oliveira, L.; De Lima, A.; Heinzmann, B.; Loro, V.; Emanuelli, T. & Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1-4), 403–406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>
- Da Silva, L.; Martins, M.; Santo, F.; Oliveira, F.; Chaves, F.; Chagas, E.; Martins, M. & De Campos, C. (2020). Essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* as anesthetics for the South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture*, 528, 735595. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735595>
- Dawood M. & Koshio S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture* 454: 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.033>
- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Neto, N. J. G., De Oliveira, M. E. G., & De Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44(5), 1541-1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.012>
- De Moraes F. F., P., Da Silva N., L., Coelho D., D., Da Veiga M., D. M., Lúcia S., A., Duca D., M. B., Souza C., A. P. & Sampaio Z., J. A. (2014). Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 28-34. <https://doi.org/10.1111/jwas.12094>
- De Oliveira H., G. S., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450, 182-186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>
- De Souza-Silva, L.; De Padua-Pereira, U.; De Oliveira, H.; Brasil, E.; Pereira, S.; Chagas, E.; Alves Jesus, G.; Cardoso, L.; Pedreira Mouriño, J. & Martins, M. (2019). Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Menthapiperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 506, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.035>

- Dias, M. K. R., Yoshioka, E. T. O., Rodriguez, A. F. R., Ribeiro, R. A., Faria, F. S. E. D. V., Ozório, R. O. A., & Tavares-Dias, M. (2019). Growth, physiological and immune responses of *Arapaima gigas* (Arapaimidae) to *Aeromonas hydrophila* challenge and handling stress following feeding with immunostimulant supplemented diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 843-847. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.045>
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., & Metin, S. E. Ç. İ. L. (2017). Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 844-851. <https://doi.org/10.1111/anu.12451>
- Dinardo, F. R., Deflorio, M., Casalino, E., Crescenzo, G., & Centoducati, G. (2020). Effect of feed supplementation with *Origanum vulgare* L. essential oil on sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A preliminary framework on metabolic status and growth performances. *Aquaculture Reports*, 18, 100511. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100511>
- Doolittle, R. F., & Surgenor, D. M. (1962). Blood coagulation in fish. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 203(5), 964-970. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.203.5.964>
- Dudareva, N., Florence Negre, F., Dinesh, A. & Irina, O. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25: 417–440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Duke, J. A. (2002). Handbook of Medicinal Herbs. *CRC Press. USA*. 870 p. <https://doi.org/10.1201/9781420040463>
- Enane, N. A., Frenkel, K., O'connor, J. M., Squibb, K. S., & Zelikoff, J. T. (1993). Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*, 80(1), 68. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1422119/>
- Encarnação, P. (2016). Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed formulation - Elsevier, Amsterdam*. pp. 217 – 236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1>
- Espirito, A.; Brito, T.; Brandão, L.; Tavares, G.; Leibowitz, M.; Prado, S.; Ferraz, V.; Hoyos,

- D.; Turra, E.; Teixeira, E.; Figueiredo, H.; Leal, C. & Ribeiro, P. (2020). Dietary supplementation of dry oregano leaves increases the innate immunity and resistance of Nile tilapia against *Streptococcus agalactiae* infection. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 418-436. <https://doi.org/10.1111/jwas.12602>
- Faleiro, L.; Miguel, G.; Ladeiro, F.; Venancio, F.; Tavares, R.; Brito, J.; Figueiredo, C.; Barroso, J. & Pedro, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in applied microbiology*, 36(1), 35-40. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01259.x>
- FAO. (2006). State of world aquaculture: 2006. *Chief publishing Management service*. 145p
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. *La sostenibilidad en acción. Roma*.
- Fernández C., A., Schenone, N., Pérez C., A., & Volpedo, A. V. (2009). Calidad de agua para la producción de especies animales tradicionales y no tradicionales en Argentina. *AUGM Domus*, 1, 45-66. Recuperado de: <https://revistas.unlp.edu.ar/domus/article/view/89>
- Fernández, A. B., De Blas, I., & Ruiz, I. (2016). El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista AquaTIC*, (16). Recuperado de: <http://revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/170/159>
- Flores, M. (2010). Investigación de los Aceites Esenciales, sus Características y Finalidad de uso. *Análisis del estado de su Regulación en Chile y el Mundo. Santiago de Chile*.
- FONDEPES. (2004). Manual de producción de Tilapia. *Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero*. 115p.
- FONDEPES. (2017). Protocolo de reproducción del sábalo cola roja. *Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero*. 1:36.
- Frascá-Scorvo, C.; Carneiro, D. & Malheiros, E. (2007). Efeito do manejo alimentar no desempenho do matrinxã *Brycon amazonicus* em tanques de cultivo. *Acta Amazônica*. vol. 37(4) 2007: 621 – 628. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000400018>
- Gaballah, S.; Alkhunni, S. & Gültepe, N. (2021). Effects of date (*Phoenix dactylifera L.*) kernel essential oil on growth performance and innate immunoassay in rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 73 -10 pages. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10524/65065>

Gardini A., K. D. & Cáceres A., E. (2015). Uso de harina de castaña, *Bertholletia excelsa* (*Lecytidaceae*) en dietas para alevines de paco *Piaractus brachypomus* (Pisces, *Serrasalminidae*) criados en corrales. *Facultad de Ciencias Biológicas, Iquitos – Perú*. Recuperado de: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/5556>

Georgiadis, M. P., Gardner, I. A. & Hedrick, R. P. (2001). The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Prev Vet Med.* 48:287-302. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00202-6)

Gomes, L. C., Baldisserotto, B., & Senhorini, J. A. (2000). Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of the matrinxã, *Brycon cephalus* (*Characidae*), in ponds. *Aquaculture*, 183(1-2), 73-81. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00288-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00288-4)

Gonzales, A., Curto, G., & Fernández-Mendez, C. (2019). Parámetros hematológicos de reproductores de *Brycon amazonicus* (*Bryconidae*) en cultivo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 133-142. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14935>

Goulding, M. (1980). *The fishes and the forest: Explorations in Amazonian natural history.* University of California Press, Berkeley, 280 pp.

Govindarajan, M.; Rajeswarya, M.; Hotib, S. & Benellic G. (2016). Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (*Lamiaceae*) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: *Culicidae*). *Research in Veterinary Science*, 104, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.11.011>

Griboff, J.; Cruz, J.; Bonansea, R. & Valdés, M. (2020). Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment. *Food Chemistry* 332 - 127380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127380>

Guidi, L.; Santos, F.; Ribeiro, A.; Fernandes, C.; Silva, L.; & Gloria, M. (2017). A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta*, 163, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.089>

- Gültepe, N.; Acar, Ü.; Kesbiç, O.; Yılmaz, S.; Yıldırım, Ö. & Türker, A. (2014b). Effects of dietary *Tribulus terrestris* extract supplementation on growth, feed utilization, hematological, immunological and biochemical variables of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 66: 1-12. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10524/49098>
- Günther, J., Boza, J., & Gálvez, N. (1997). Crecimiento de *Colossoma macropomum* en estanques de tierra en dependencia de la densidad. *Uniciencia*, 14(1), 27-32.
- Harikrishnan, R., & Balasundaram, C. (2005). Antimicrobial activity of medicinal herbs in vitro against fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*. *Fish Pathology*, 40(4), 187-189. <https://doi.org/10.3147/jsfp.40.187>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. & Heo, M.S., (2010). Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.013>
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. & Heo, M. (2009). Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish with *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88: 45 – 54. <https://doi.org/10.3354/dao02143>
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. & Heo, M. (2011). Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish and Shellfish Immunology* 30: 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.029>
- Hedberg, N.; Stenson, I.; Pettersson, M.; Warshan, D.; Nguyen-kim, H.; Tedengren, M. & Kautsky, N. (2018). Antibiotic use in Vietnamese fish and lobster sea cage farms; implications for coral reefs and human health. *Aquaculture*, 495, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.005>
- Heluy, G.; Ramos, L.; Pedrosa, V.; Sarturi, C.; Figueiredo, P.; Vidal, L.; França, I. & Pereira, M. (2020). Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil as an additive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings reared in salinized water. *Aquaculture Research*, 51(8), 3237-3243. <https://doi.org/10.1111/are.14658>
- Hori, T. S., Avilez, I. M., Iwama, G. K., Johnson, S. C., Moraes, G., & Afonso, L. O. (2008). Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*)

exposed to low concentrations of phenol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(4), 416-423.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.003>

Howes, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology*, 43(1), 1–47. Recuperado de: <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL82X0355624>

Huamán Silva, K. I. (2016). Evaluación y validación de la inclusión de pasta de coco (*Cocos nucifera*) en una dieta para el crecimiento de juveniles de *Colossoma macropomum*, Bello Horizonte, San Martín. *SUNEDU*.

Ietswaart, J. (1980). A Taxonomic Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae). *Leiden. University Press*. Amsterdam.

İnanan, B.; Acar, Ü. & İnanan, T. (2021). Effects of dietary *Ferula elaeochytris* root powder concentrations on haematology, serum biochemical parameters, spermatozoa parameters, and oxidative status in tissues of males goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 544, 737087. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737087>

Inoue, L.; Afonso, L.; Iwama, G. & Moraes, G. (2005). Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazônica*, 35(2):289-295. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018>

Iwashita, M. K. P., Nakandakare, I. B., Terhune, J. S., Wood, T., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2015). Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 43(1), 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.008>

Izquierdo, M. S., Socorro, J., Arantzamendi, L. & Hernandez-Cruz, C. M. (2000). Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol Biochem.* 22, 97-107. <https://doi.org/10.1023/A:1007810506259>

Jagadeeswaran, P., Sheehan, J. P., Craig, F. E., & Troyer, D. (1999). Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *British journal of haematology*, 107(4),



731-738. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01763.x>

- Janda, J. & Abbott S. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev.* 23:35-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Jauncey, K. (1982). The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture*, 27(1),43-54. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90108-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90108-9)
- Khalafalla, M.; Ibrahim, S.; Zayed, M.; Awad, M. & Mohamed, R. (2020). Effect of a dietary mixture of beneficial bacteria on growth performance, health condition, chemical composition, and water quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29(8), 823–835. <https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1764685>
- Klauer, G. (2009). Manual técnico de cultivo ecológico de orégano (*Origanum sp L.*). El taller asociación de promoción y desarrollo. Arequipa- Perú. 9 p.
- Laevastu, T. (1980). Manual de métodos de biología pesquera. FAO. Editorial Acribia. Zaragoza-España. Recuperado de: [http://biblioteca.especializada.unjbg.edu.pe/opac\\_css/index.php?lvl=notice\\_displ](http://biblioteca.especializada.unjbg.edu.pe/opac_css/index.php?lvl=notice_displ)
- Le Cren, E. D. (1951). The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *The Journal of Animal Ecology*, 201-219. <https://doi.org/10.2307/1540>
- Lima, F. (2017). A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: *Characidae*). *Zootaxa* 4222. New Zealand. 189 pp. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4222.1.1>
- Lima, T. C. (2018). Centros Melanomacrofágicos—ocorrência nos tecidos hematopoiéticos em teleósteos. *Revista de Trabalhos acadêmicos – Universo Belo Horizonte*, 1(3).
- Lizama M. & Ambrósio, A. (2002). Condition factor in nine species of fish of the *Characidae* family in the upper paraná river floodplain, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 62(1): 113-124. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000100014>
- López, O.; Vásquez, T.; Arias, C. & Wills, F. (2004). Evaluación de diferentes proporciones de energía/proteína en dietas para juveniles de yamú, *Brycon siebenthalae*

- (Eigenmann, 1912). *Rev. Orinoquia* (8):64-76. Recuperado de: <https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/2426>
- Malami, G. Z., Ipinjolu, J. K., Hassan, W. A., & Magawata, I. (2004). Feeding adaptations of ten fish species in river Rima, North Western Nigeria. *In A paper presented at the Annual conference of Zoological Society of Nigeria held at the Institute of Developmental Research, Ahmadu Bello University, Zaria* (p. 115).
- Martínez A. (2018). Evaluación del aceite esencial de orégano mexicano *Lippia graveolens* en el crecimiento de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* y su respuesta como antibacteriano de bacterias patógenas de peces. *Universidad autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco*.
- Meik, S.; Tiscornia, J.; Arias, M.; Kien, M. & Pellerano, G. (2011). Infección cutánea por *Aeromonas*. *Med Cutan Iber Lat Am*. 39:23-25. Recuperado de: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-92755>
- Mog M.; Ngasotter S.; Tesia S.; Waikhom D.; Priyadarshini S.; Sharma S. & Varshney S. (2020). Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 8(3): 1075-1082.
- Mohamed, R.; Yousef, Y.; El-Tras, W. & Khalafallaa, M. (2021). Dietary essential oil extract from sweet orange (*Citrus sinensis*) and bitter lemon (*Citrus limon*) peels improved Nile tilapia performance and health status. *Aquaculture Research* 52: 1463-1479. <https://doi.org/10.1111/are.15000>
- Munro, A. L. (1982). The pathogenesis of bacterial diseases of fish. *See Ref. 33*, pp. 13 1-50.
- Nakagawa, N. (2017). Aportes del IIAP al desarrollo de la piscicultura de especies amazónicas en la Región Amazonas. IIAP Amazonas. *Taller Macrorregional Amazónico - Situación de la Investigación e Innovación de la Acuicultura en la Amazonía*.
- Natt P & Herrick A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci.* 31: 735-738. <https://doi.org/10.3382/ps.0310735>
- Ngugi, C.; Oyoo-Okoth, E. & Muchiri, M. (2017). Effects of dietary levels of essential oil

- (EO) extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-immunological parameters and disease resistance in Juvenile *Labeo victorianus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 48(5), 2253-2265. <https://doi.org/10.1111/are.13062>
- NRC (National Research Council). (1993). Nutrient requirements of fish. Washington, USA: *National Academy Press*.
- O'Neill, J. (2015). Antimicrobials in agriculture and the environment: Reducing unnecessary use and waste. *The review on Antimicrobial Resistance*, 1–44.
- Ojha, M.; Chadha, N.; Saini, V.; Damroy, S. & Chandraprakash, P. (2014). Effect of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* on growth, metabolism and immunity of *Labeorohita* (Hamilton, 1822) fingerlings. *International Journal of Fauna and Biological Studies*; 1(5): 01-09.
- Olabuenaga, S. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana* (Concepción), 64(2), 205-215. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382000000200010>
- Oliveira, S. R. D., Souza, R. T. Y. B. D., Brasil, E. M., Andrade, J. I. A. D., Nunes, É. D. S. S., Ono, E. A., & Affonso, E. G. (2011). LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophilato* matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazônica*, 41, 321-326. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000200019>
- Oliveira, T. T., Campos, K. M., Cerqueira-Lima, A. T., Cana-Brasil-Carneiro, T., da-Silva-Veloza, E., & Figueiredo, C. A. (2015). Potential therapeutic effect of *Allium cepa* L. and quercetin in a murine model of *Blomia tropicalis* induced asthma. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23(1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0098-5>
- Paredes L.R., L. C. (2020). Efecto de tres tipos de aceite sobre la performance de alevines de Sábalo Cola Roja (*Brycon erythropterus*). *Repositorio Universidad Nacional Agraria La Molina*. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4538>
- Pedreira, M.; Sipaúba-Tavares, L. & Silva, R. (2006). Influência do formato do aquário na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de matrinxã *Brycon cephalus* (*Osteichthyes*, *Characidae*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 329–333. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000200001>
- Penagos, G., Barato, P., & Iregui, C. (2009). Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta*

*Biológica Colombiana*, 14(1), 3-26. Recuperado de:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v14n1/v14n1a01.pdf>

Pereira, M.; Castagnolli, N.; Storti, A. & Oliveira, M. (1995). Efeito de diferentes níveis de proteína e de fibra bruta na alimentação de juvenis de matrinxã, *Brycon cephalus*. *Acta Amazônica*, 25(1): 137-144. <https://doi.org/10.1590/1809-43921995252144>

Popoff, M., & Veron, M. (1976). A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *Microbiology*, 94(1), 11-22.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-94-1-11>

Pourmoghim, H.; Haghghi, M. & Rohani, M. (2015). Effect of dietary inclusion of *Origanum vulgare* extract on non-specific immune responses and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 4(3), 33-39.

Ministerio de la Producción - PRODUCE. (2021). Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2020. Recuperado de: <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oeedocumentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/1001-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2020>

Ranzani-Paiva M.J., Pádua S. B., Tavares-Dias M. & Egami M. (2013). Métodos para análise hematológica em peixes. *Maringá, Paraná: Eduem*. 140 p.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Santos, A. A., de Carla Dias, D., Seriani, R., & Egami, M. I. (2008). Hematological and phagocytic response of the fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. *Bioikos-Título não-corrente*, 22(1). Recuperado de: <https://periodicos.puc-campinas.edu.br/bioikos/article/view/816>

Reverter, M.; Bomtemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B. & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50 – 61.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

Reynalte-Tataje, D.; Zaniboni-Filho, E. & Esquivel, J. (2004). Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849 (*Pisces, Characidae*). *Acta Scientiarum*; 26(1): 67-71.  
<https://doi.org/10.4025/actascibiols.v26i1.1660>

- Ribeiro, S.; Castelo, A.; Silva, B.; Cunha, A.; Proietti, A. & Oba – Yoshioka, E. (2016). Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amazónica*, 46 (1), 99 – 106. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501284>
- Roberts, R. J. (2001). The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. *Fish pathology*, (Ed. 3), 55-132. Recuperado de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013056279>
- Robisalmi, A., Alipin, K., & Gunadi, B. (2021). Effect of Different Feed Restrictions on Growth, Biometric, and Hematological Response of Juvenile Red Tilapia (*Oreochromis spp*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 13(2), 243-254. <http://dx.doi.org/10.20473/jipk.v13i2.26302>
- Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & shellfish immunology*, 31(5), 616-626. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001>
- Rozas, M., Walker, R., Müller, A., & Bittencourt, P. (2015). Determinación de parámetros hematológicos, inmunológicos y mecanismos involucrados en las respuestas del hospedero a infecciones prevalentes y co-infecciones. Universidad Austral de Chile.
- Sá, M. & Fracalossi, D. (2002). Exigência protéica e relação energia/ proteína párr alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *R. Bras. Zootec.*, 31(1):1-10. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000100001>
- Saccol, E.; Uczay, J.; Pês, T.; Finamor, I.; Ourique, G.; Riffel, A.; Schmidt, D.; Caron, B.; Heinzmann, B.; Llesuy, S.; Lazzari, R.; Baldisserotto, B. & Pavanato, A. (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) NE Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidante response. *Aquaculture*, 416, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.036>
- Salinas, A. (2000). Aspectos de alevinaje de las principales especies nativas utilizadas en piscicultura en la Amazonía Peruana. *Iquitos - Folia Amazónica*. Vol 2.

- Salvador R, Moraes J. & Moraes F., (2014). Hemoparasite and hematological parameters in Nile tilapia. *Comp. Clin. Path.*, 23(2), 437-441. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1638-8>
- Sánchez I, Mejía F, Huanuiri K, Vásquez J, Gonzales A. & Fernández M, C. (2017). Respuesta hematológica y bioquímica en juveniles de paiche *Arapaima gigas* sometidos a diferentes concentraciones de amonio. *Folia Amazónica* 26: 51-58.
- Santamaria, S. (2014). Nutrición y alimentación en peces nativos. Recuperado de: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/2697>
- Shafaghat, A. (2011). Antibacterial Activity and GC/MS Analysis of the Essential Oils from Flower, Leaf and Stem of *Origanum vulgare ssp. viride* Growing Wild in Northwest Iran. *NPC - Natural Product Communications*. Vol. 6. No. 9. 1351 – 1352. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600933>
- Silva M.; Logato P.; Murgas L.; Ribeiro P. & María N. (2009). Crecimiento y supervivencia de postlarvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) MG. Brasileria. *Archivos de Zootecnia*. 58 (222): 285-288. Recuperado de: <https://scielo.isciii.es/pdf/azoo/v58n222/art14.pdf>
- Silva, N. & Fernandes A. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16: 402 – 413. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>
- Sipaúba-Tavares L.; Alvarez E. & Braga F. (2008). Water quality and zooplankton in tanks with larvae of *Brycon Orbignyanus* (Valenciennes, 1949). *Brasil. J. Biol.* 68 (1): 77-86. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100011>
- Sutili, F.; Gatlin, D.; Heinzmann, B. & Baldisserotto, B. (2017). Plant essential oils as fish additives: Benefits on fish health and stability in feed. *Aquaculture* 0: 1 – 11. <https://doi.org/10.1111/raq.12197>
- Syahidah, A.; Saad, C.; Daud, H. & Abdelhadi, Y. (2015). Status and potential of herbal applications in aquaculture: a review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1), pp.27-44. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/1834/11830>
- Taboada L., J. (2021). Efecto de diferentes niveles de energía manteniendo constante la

relación caloría: proteína en juveniles de Sábalo cola roja (*Brycon erythropterus*).  
Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4675>

Tacon, A. G. (1987). The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp; a training manual. *The essential nutrients* (1).

Takahashi, L.; Biller, J.; Criscuolo-Urbinati, E. & Urbinati, E. (2011). Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 95(2), 259-266.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01050.x>

Talpur, A. & Ikhwanuddin, M. (2012). Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on hemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 364, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.035>

Talpur, A. (2014). *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 420-421, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.039>

Tavares-Días M, Affonso EG, Oliveira SR, Marcon JL. & Egami MI. (2008). Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (*Characidae: Bryconinae*) with others *Bryconinae* species. *Acta Amazon* 38: 799-805. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400026>

Tavares-Días M, De Moraes FR. (2004). Hematologia de peixes teleósteos. *Ribeirão Preto: Villimpress*. 144 p.

Tavares-Dias M, Frascá-Scorvo CM, Moraes FR. & Campos-Filho E. (1999). Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã (*Brycon cephalus* - Günther, 1869) (*Osteichthyes: Characidae*). *Rev Bras Zool* 15: 149-153.

Tavares-Dias M. & Moraes FR. (2006). Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (*Osteichthyes: Characidae*) intensively bred. *Hidrobiologica* 16: 271-274. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v16n3/v16n3a8.pdf>

- Tavares-Dias, M., & Moraes, F. R. (2010). Parâmetros bioquímicos de *Piaractus mesopotamicus* E *Colossoma macropomum* (Characidae) e Híbrido Tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, 11(2), 363-368.
- Tavares-Días, M.; Schalch, S. & Moraes, F. (2003). Hematological characteristics of Brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 29: 109-115.
- Tellez, L. (2017). Caracterización de los aceites esenciales de seis ecotipos de orégano (*Origanum vulgare* ssp.) procedentes del Valle de Urubamba – Cuzco; Perú. *Universidad Nacional Agraria La Molina*. Lima – Perú. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3479>
- Tewary, A. & Patra, B. (2011). Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). *J. Aquac. Res. Dev.* 2, 1-7. Recuperado de: <http://www.omicsonline.org/2155-9546/>
- Thepot, V., Campbell, A. H., Rimmer, M. A., & Paul, N. A. (2021). Meta-analysis of the use of seaweeds and their extracts as immunostimulants for fish: a systematic review. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 907-933. <https://doi.org/10.1111/raq.12504>
- Uchôa, A; Pereira-Filho, M; Antelmo, L. & Vasconcelos, J. (2004). Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Acta Amazônica* 34(2):179-184. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200005>
- Valladao, G.; Gallani, S., Pala, G.; Jesus, R.; Kotzent, S.; Costa, J.; Silva, T. & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture research*, 48(11), 5640- 5649. <https://doi.org/10.1111/are.13386>
- Vallejos-Vidal E.; Reyes-Lopez F.; Teles M. & MacKenzie S. (2016). The response of fish to immunostimulant diets. *Fish and Shellfish Immunology* 56: 34–69. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.028>
- Vásquez, D. (2012). El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del alto patía: efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Universidad nacional de Colombia tesis en magister en Ciencias químicas. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.028>



- Vásquez-Piñeros, M. A., Eslava-Mocha, P. R., & Rondón-Barragan, I. S. (2012). Inmunoestimulantes en teleosteos: Probióticos, b-glucanos y LPS. *Orinoquia*, 16(1), 46-62. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89625076006>
- Vazirzadeh, A.; Dehghan, F. & Kazemeini, R. (2017). Changes in growth, blood immune parameters and expression of immune related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Fish & Shellfish Immunology*, 69, 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.022>
- Vergara, J. S. (2008). Correlación entre bacterias psicrófilas, psicrótrofas y coliformes totales en leche semi-descremada y chocolatada de la planta de lácteos Zamorano. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11036/5423>
- Vilcapoma C., D. R. (2021). Determinación de la digestibilidad de nutrientes y energía digestible de la harina de pescado en juveniles de sábalo cola roja (*Brycon erythropterum*). Repositorio Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4922>
- Wahli, T. (2002). Approaches to investigate environmental impacts on fish health. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 22. Recuperado de: [http://eafp.org/download/2002-Volume22/Issue%202/22\\_126.pdf](http://eafp.org/download/2002-Volume22/Issue%202/22_126.pdf)
- Wenk, C. (2003). Herbs and botanicals in the nutrition of monogastric animals. *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*. Symposium #9 - 25 September 2003, Jena/Thüringen. 45-60. Recuperado de: [https://literatur.thuenen.de/digbib\\_extern/zi031985.pdf#page=62](https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/zi031985.pdf#page=62)
- Wintrobe, M. M. (1934). Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. *Folia Hematol.* 51, 32-49.
- Yilmaz, E.; Ergün, S. & Yilmaz, S. (2015). Influence of carvacrol on the growth performance, hematological, non-specific immune and serum biochemistry parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Nutr. Sci.* 6 (05), 523. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2015.65054>
- Zaniboni-Filho, E.; Reynalte; D. & Weingartner, M. (2006). Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. Laboratorio de Biología e Cultivo de Peixes de

Água Doce (LAPAD). Rodovia SC 406 n°3532, CEP 88066-292. Universidad de Antioquia. Colombia. Recuperado de: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324038/20781211>

Zepeda-Velázquez, A. (2015). *Aeromonas spp.*: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. Universidad de Zaragoza, España. *AquaTIC*, núm. 42, enero-junio, pp. 1-16. Recuperado de: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/261/316>

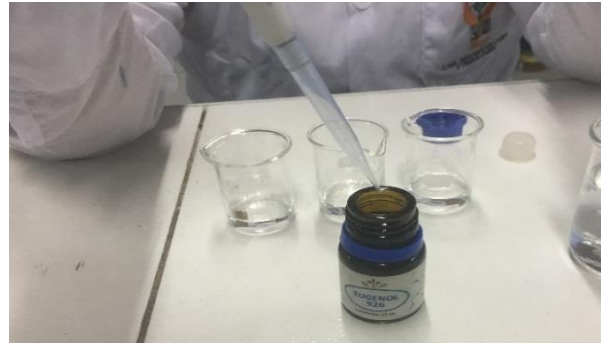
Zheng, Z.; Tan, J.; Liu, H.; Zhou, X.; Xiang, X. & Wang, K. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum L.*) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3-4), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>

## VIII. ANEXOS

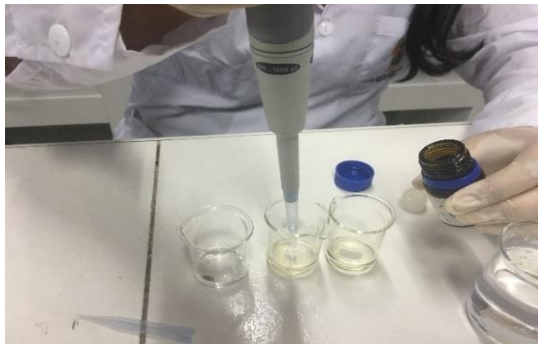
### Anexo 1: Preparación de anestésico: Eugenol (AE de clavo de olor).



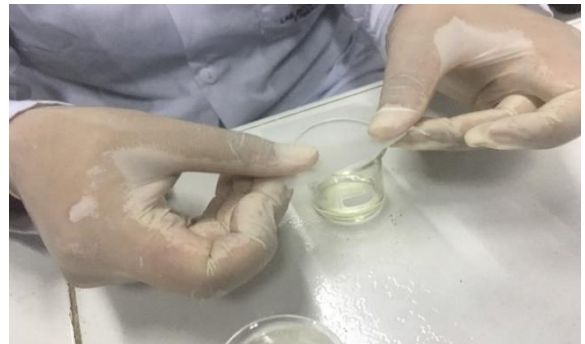
Con ayuda de una pipeta se colocó el alcohol en vasos precipitados como disolvente del Eugenol.



De la misma manera se colocó el Eugenol en cada vaso precipitado de acuerdo a la concentración.



Se enjuagó la pipeta hasta en 4 oportunidades en cada vaso precipitado para tener la dosis correcta.



Cada vaso precipitado se selló con parafilm para evitar la evaporación de la solución anestésica.



Anexo 2: Evaluación de tiempo de inducción y recuperación del anestésico Tricafna ensábalo cola roja *Brycon amazonicus*.  
(Determinación de dosis óptima)

Para esta prueba se utilizaron tres acuarios con 5 L de agua, y en cada acuario un pez experimental – juvenil de sábalo cola roja *Brycon amazonicus*.

Se evaluaron tres dosis (en base a referencias)

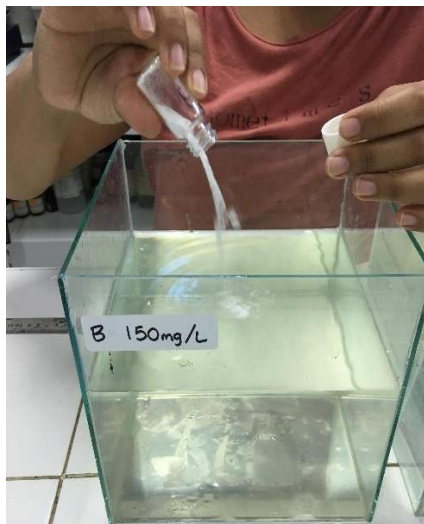
- Dosis 1: 100 mg/L
- Dosis 2: 150 mg/L
- Dosis 3: 200 mg/L

**Procedimiento:**

1. Se colocó en cada acuario los 5 L de agua.



2. Se realizó el pesado de las dosis y posterior a ello se adicionó en cada uno de los acuarios, para luego homogenizar el agua con la mano en movimientos ondulatorios.



3. Se colocó al pez en su respectivo acuario y se esperó que la dosis haga efecto para poder registrar el tiempo de inducción. El pez estuvo durante un promedio de 10 minutos con efectos de la anestesia.



4. Finalmente, se retiró al pez y fue colocado en acuarios con agua limpia para analizar el tiempo de recuperación de cada uno.



## Resultados:

- Dosis 1: 100 mg/L

Tiempo de inducción (Ti) = **2.02'** (ESTADO IIIC – ANESTESIA QUIRURGICA)

Tiempo de recuperación (Tr) = **2.44'**

Biometría del pez:

**Peso** = 187.4 g

**Talla** = 23.3 cm

Manejo: El pez se mantiene tranquilo – se puede realizar el manejo sin complicaciones.

- Dosis 2: 150 mg/L

Tiempo de inducción (Ti) = **2.27'** (ESTADO IIIC – ANESTESIA QUIRURGICA)

Tiempo de recuperación (Tr) = **7.51'**

Biometría del pez:

**Peso** = 193.2 g

**Talla** = 24.5 cm

Manejo: El pez se mantiene tranquilo – se puede realizar el manejo sin complicaciones, pero tomo mucho tiempo en recuperarse.

- Dosis 3: 200 mg/L

No se realizó para evitar matar al pez, ya que la dosis 2, el tiempo de recuperación fue alto.

## Conclusión:

Se utilizó la dosis 1: **100 mg/L**, ya que el pez se quedó sedado el tiempo promedio requerido para los muestreos. Sin embargo, este tipo de experimentación sería necesaria repetirla para poder tener resultados más confiables.

Anexo 3: Tanques de concreto, utilizados en el trabajo de investigación



Anexo 4: Filtros mecánicos utilizados en cada uno de los tanques experimentales.



Anexo 5: Tapas de madera y malla para cada uno de los tanques experimentales.

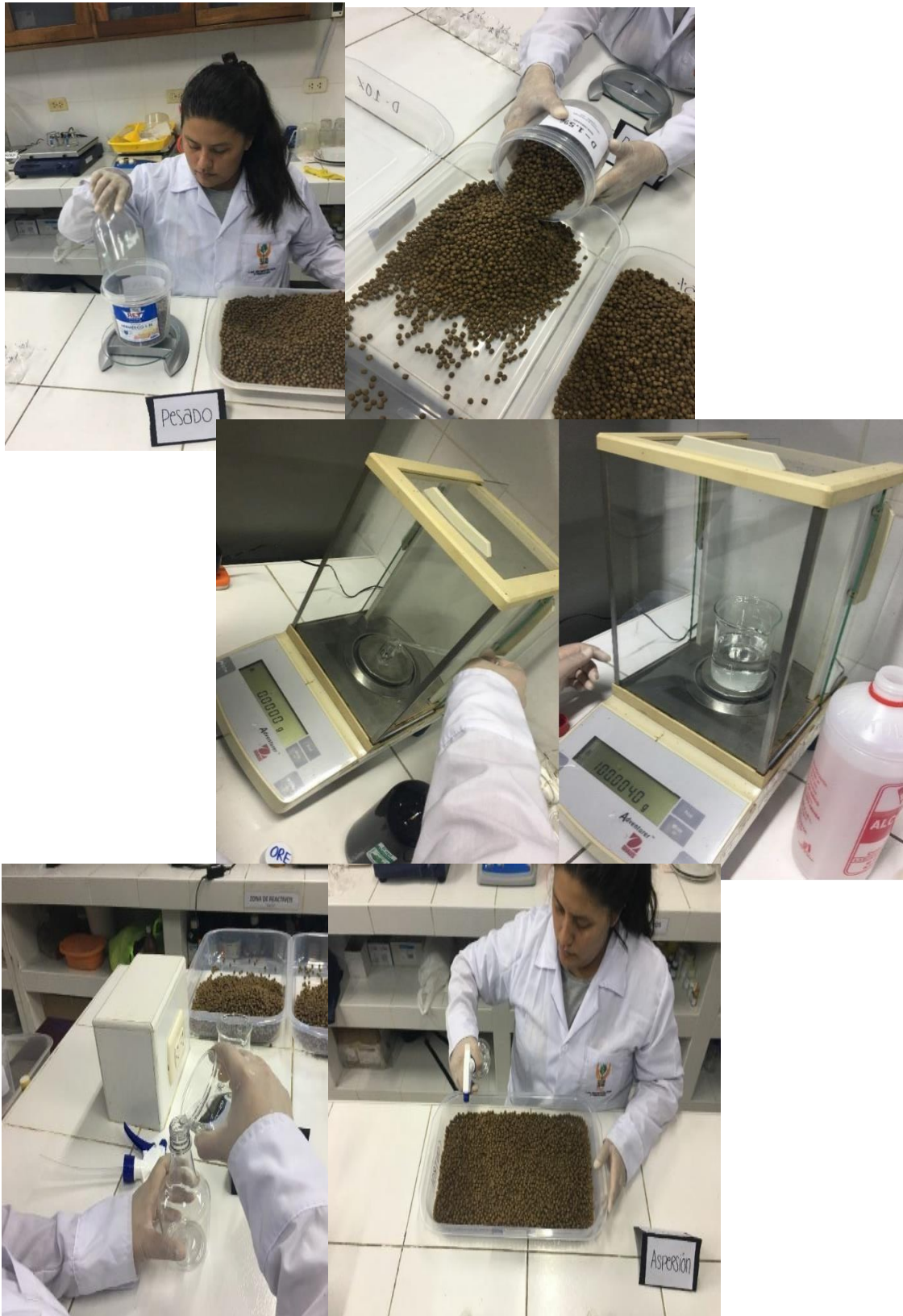


Anexo 6: Aceite esencial de orégano *Origanum vulgare*.





Anexo 7: Preparación del alimento balanceado – inclusión de AE de orégano *Origanum vulgare*.



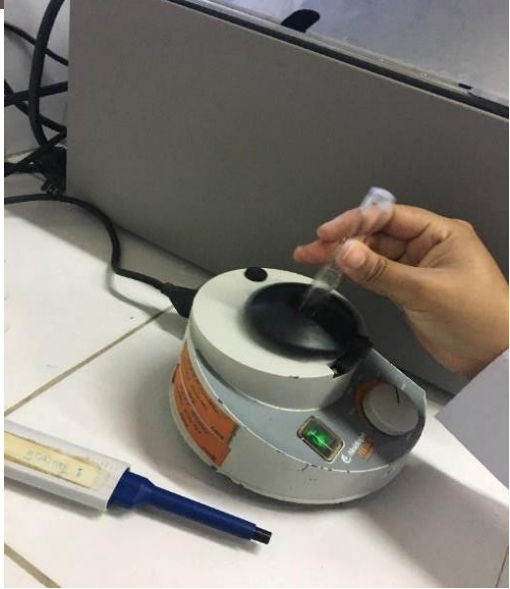
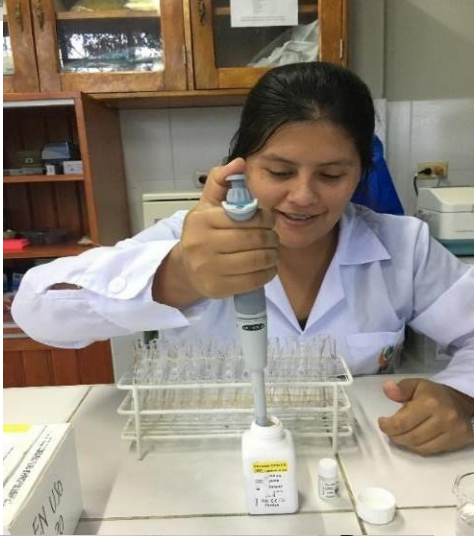
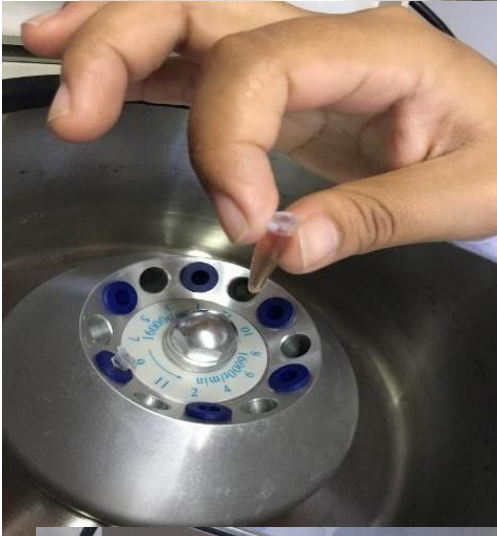
Anexo 8: Procedimiento para el análisis de calidad de agua durante la experimentación.



Anexo 9: Toma de muestras de sangre del zona peritoneal.



Anexo 10: Procedimiento para los ensayos bioquímicos del plasma sanguíneo.



Anexo 11: Procedimiento para la determinación del LD50 de la cepa de *Aeromonas hydrophila*.

La cepa de la bacteria *Aeromonas hydrophila* fue obtenida de la empresa Microbiologics, Inc – USA. El producto es conocido como KwikStik, este incluye una gránulo liofilizado del microorganismo, una ampolla de líquido hidratante y un hisopo de inoculación; además, cada uno de estos productos traen su manual de uso (disponible en [www.microbiologics.com](http://www.microbiologics.com)).

**Materiales:**

- KwikStik
- Placas Petri
- Asas Drigalsky
- Tips
- Medios de cultivo
- Autoclave – 121°C x 15 minutos
- Matraces
- Balanza
- Espectrofotómetro

**Procedimiento:**

1. Se preparó 150 ml de agar BHI, para 7 placas (20 ml por cada placa). Luego la mezcla se colocó en un matraz para llevarlo a autoclavar a una temperatura de 121 °C por 10 minutos.

**BHI H<sub>2</sub>O**

37g → 1L

X → 150 ml

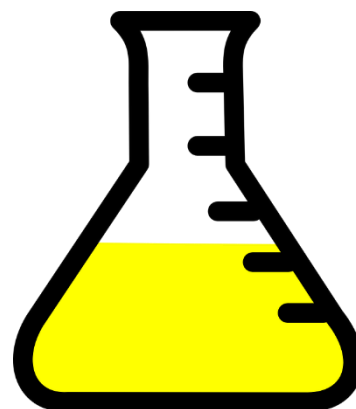
X = **5.55g** caldo BHI

**AGAR H<sub>2</sub>O**

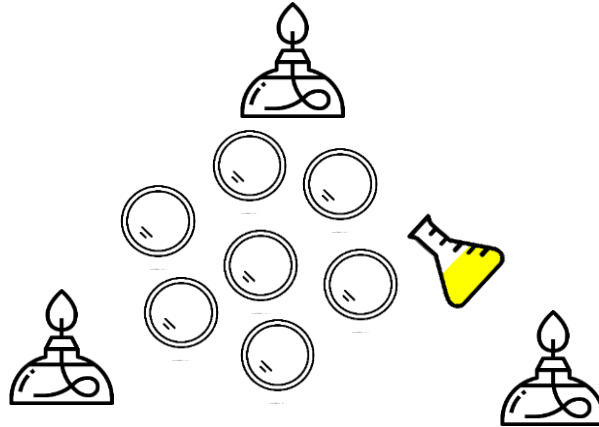
15g → 1L

X → 150 mlX =

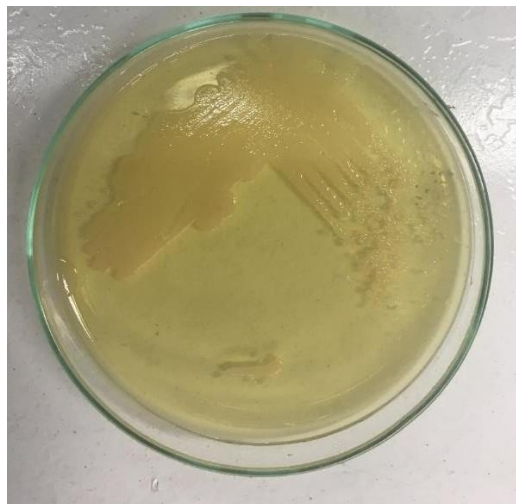
**2.25g** Agar



Luego del proceso de autoclave, se realizó el plaqueo, para ello se distribuyeron mecheros en la mesa de trabajo para crear un halo de sanitización. Se dejaron enfriar las placas, y finalmente fueron rotuladas y selladas con film para incubarla en una estufa a temperatura ambiente por 24 horas.



2. Posterior a las 24 horas de incubación de las placas, en las que se pudo observar el crecimiento de diversos microorganismos fueron descartadas, las demás se reservaron para ser utilizadas. Se abrió el KwikStik y se sembró en 6 placas, en forma de líneas en 4 direcciones diferentes. Luego de ello, volvieron a ser selladas e incubadas por 24 horas a 28°C, en donde se observó el crecimiento de la bacteria.



Se preparó el medio de cultivo para resembrar la bacteria en las placas Petri, se utilizó Tryptic Soy Broth (TSB). La mezcla se colocó en un matraz y luego se traspasó 10 ml de la mezcla en cada tubo de 15 ml con tapa, en total 5 tubos, para ser autoclavados. Al finalizar este proceso se incubaron por 24 horas a 28°C.

**TSB H<sub>2</sub>O**

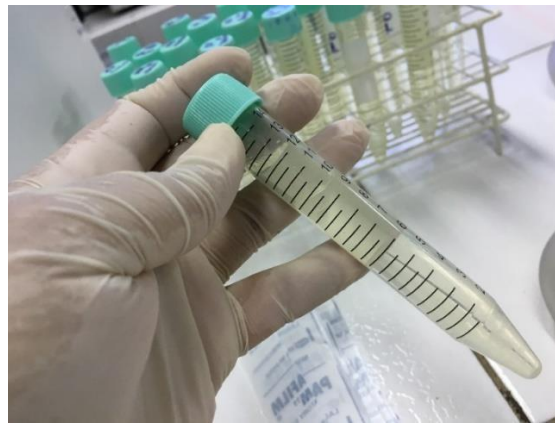
30g → 1L X

→ 50 ml X =

**1.5g TSB**



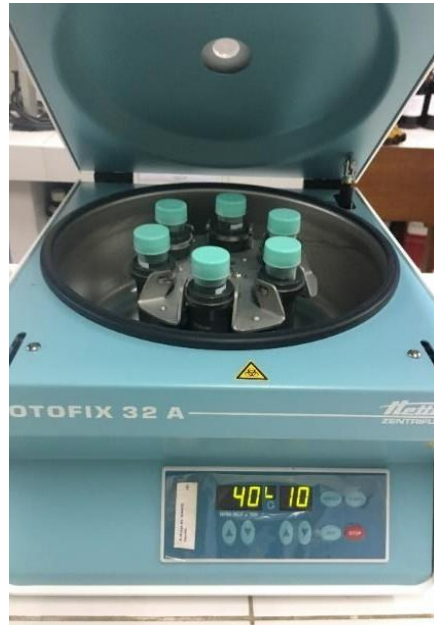
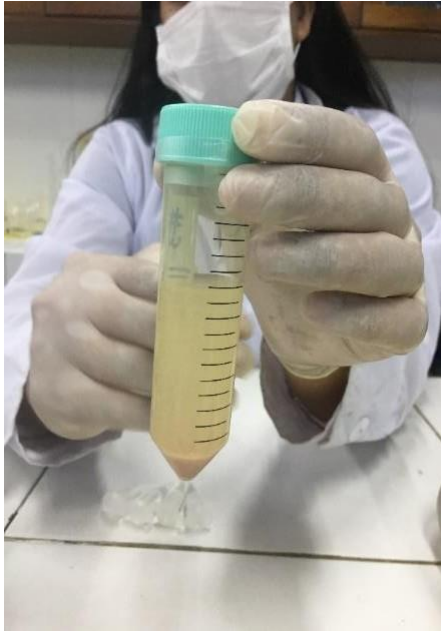
Además, también se alistaron 10 tubos de 15 ml de PBS para realizar el lavado de la bacteria y formar el pellet.



3. Los tubos que no presentaron signos de contaminación fueron utilizados para sembrar la bacteria de las placas Petri con BHI. Con ayuda de un asa Drigalsky se retiró una cepa y se colocó en el tubo de TSB, se cerró e incubó por 18 horas a 28°C en un agitador orbital.



4. Luego de las 18 horas el tubo se pone turbio, por ello es necesario realizar una centrifugación a 40 RPM por 10 minutos, para poder eliminar el medio de TSB e ir lavándolo con una solución de PSB, este proceso se repite unas 3 o 4 veces hasta formar el pellet de *Aeromonas hydrophila*.



5. Se realizaron las diluciones para poder probar las dosis de inoculación con *Aeromonas hydrophila*. Cada una de las diluciones realizadas se sembraron en placas con TSA, finalmente fueron incubadas por 24 horas a 28°C. Además, con ayuda de una micropipeta se extrae una porción para realizar la lectura en el espectrofotómetro y registrar las abs. Los resultados son los siguientes:



**Tabla A:** Resultados de medición de absorbancia de las diluciones con *Aeromonas hydrophila*.

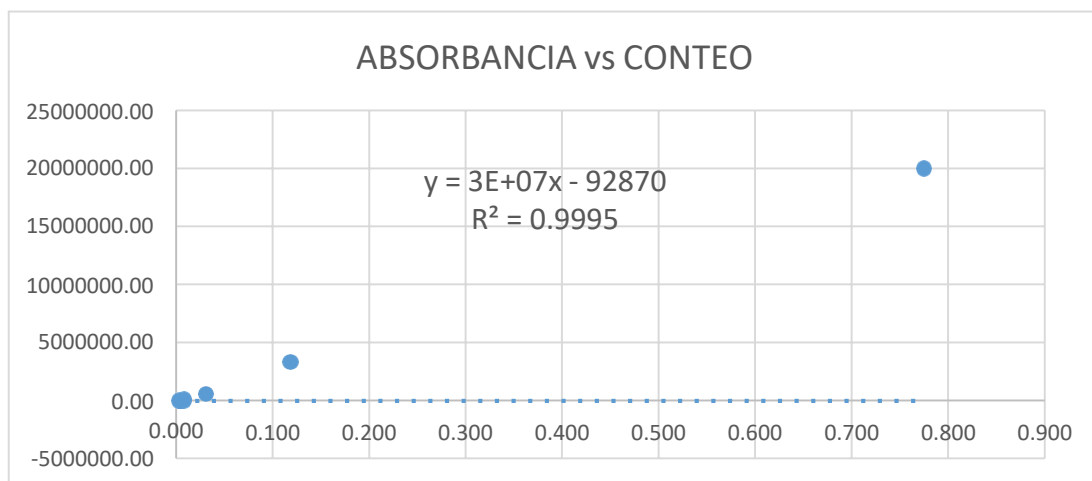
INOCULACION	SABALO COLA ROJA
-------------	------------------

LONGITUD DE ONDA	590
------------------	-----

MUESTRA	ABS			ABS (PROM)	CONTEO				UFC/100µL	UFC/mL	UFC/mL - REGRESION
	PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA		P#1	P#2	P#3	PROMEDIO			
BLANCO (PSB)	0	0	0	<b>0.000</b>	-	-	-	-			
1	0.765	0.780	0.780	<b>0.775</b>	-	-	-	-			<b>20000000.00</b>
0.1	0.122	0.117	0.117	<b>0.119</b>	-	-	-	-			<b>3344490.72</b>
0.01	0.032	0.032	0.029	<b>0.031</b>	-	-	-	-			<b>559280.91</b>
0.001	0.011	0.007	0.006	<b>0.008</b>	-	-	-	-			<b>93525.49</b>
0.0001	0.007	0.005	0.005	<b>0.006</b>	1198.000	-	-	1198.000	1198	11980	<b>15639.76</b>
0.00001	0.004	0.004	0.003	<b>0.004</b>	227.000	-	-	227.000	227	2270	<b>2615.35</b>
0.000001	0.007	0.009	0.008	<b>0.008</b>	29.000	38.000	-	33.500	34	335	<b>437.35</b>
0.0000001	0.004	0.002	0.002	<b>0.003</b>	-	-	-	-			<b>73.14</b>

MUESTRA	ABS			ABS (PROM)	CONTEO				UFC/100µL	UFC/mL	UFC/mL - REGRESION
	PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA		P#1	P#2	P#3	PROMEDIO			
BLANCO (PSB)	0	0	0	<b>0.000</b>	-	-	-	-			
1	0.765	0.780	0.780	<b>0.775</b>	-	-	-	-			<b>20000000.00</b>
10	0.122	0.117	0.117	<b>0.119</b>	-	-	-	-			<b>3342181.23</b>
100	0.032	0.032	0.029	<b>0.031</b>	-	-	-	-			<b>558508.77</b>
1000	0.011	0.007	0.006	<b>0.008</b>	-	-	-	-			<b>93331.88</b>
10000	0.007	0.005	0.005	<b>0.006</b>	1198.000	-	-	1198	1198	11980	<b>15596.60</b>
100000	0.004	0.004	0.003	<b>0.004</b>	227.000	-	-	227	227	2270	<b>2606.33</b>
1000000	0.007	0.009	0.008	<b>0.008</b>	29.000	38.000	-	34	34	335	<b>435.54</b>
10000000	0.004	0.002	0.002	<b>0.003</b>	-	-	-	-			<b>72.78</b>

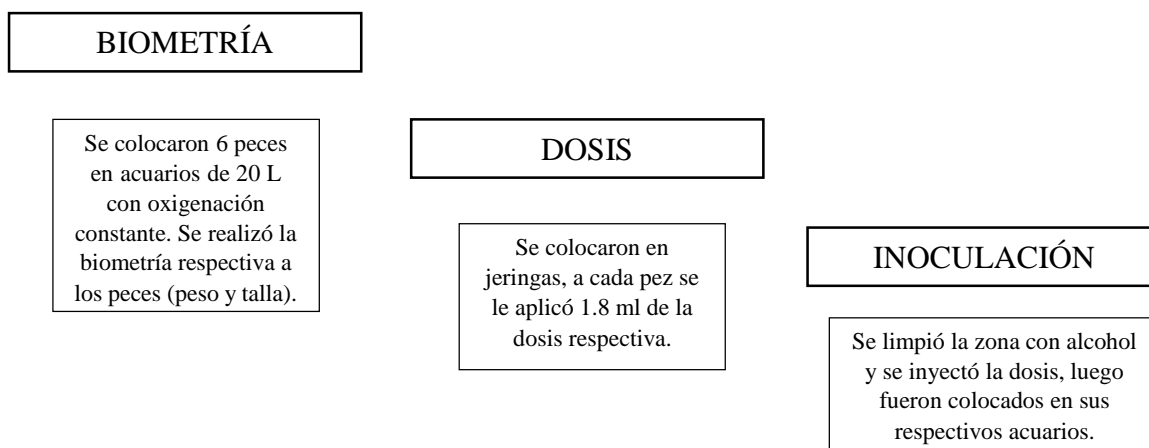
De este procedimiento se obtuvo la fórmula adecuada para calcular las UFC/ml respecto a la absorbancia que se registró en el espectrofotómetro. Tal como se muestra en el gráfico siguiente:



6. Se volvió a realizar el procedimiento para lograr una mayor concentración de UFC/ml, que permita llegar a las dosis de inoculación. Se obtuvo una solución madre de  $1.68 \times 10^9$ , a partir de la cual se realizaron las diluciones que se analizaron en la prueba de DL50. Estas fueron:

- ✓  $10^9$
- ✓  $10^8$
- ✓  $10^7$
- ✓  $10^6$
- ✓ Control

7. El proceso para la inoculación fue el siguiente:





### **Resultados:**

Luego de 36 horas se observó que las dosis de  $1.68 \times 10^7$  UFC/ml y  $1,68 \times 10^6$  registraron una mortalidad del 16,7%, la cual fue menor en comparación con las demás dosis ya que estas registraron una mortalidad del 100%. Además, se pudieron apreciar algunos signos clínicos externos e internos de la enfermedad en los peces infectados.

Anexo 12: Instrucciones para la activación de la bacteria *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654™) KWIKSTIK plus.





**INSTRUCCIONES CON ILUSTRACIONES**

- 1**



Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.

**2**



Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquese a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desarme el dispositivo durante la hidratación.

**3**

Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agriete la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratado.
- 4**



Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.

**5**



Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.

**6**



De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transféralo al medio con agar correspondiente o utilícelo según el procedimiento operativo estándar del laboratorio.
- 7**



Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.

**8**



Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.

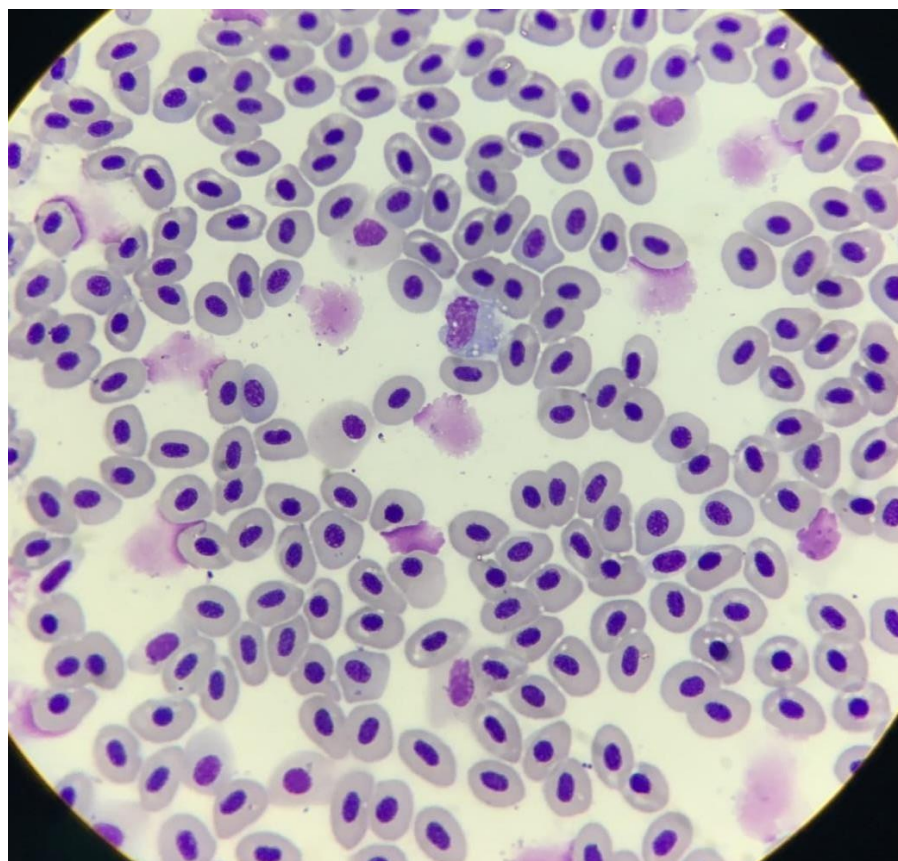
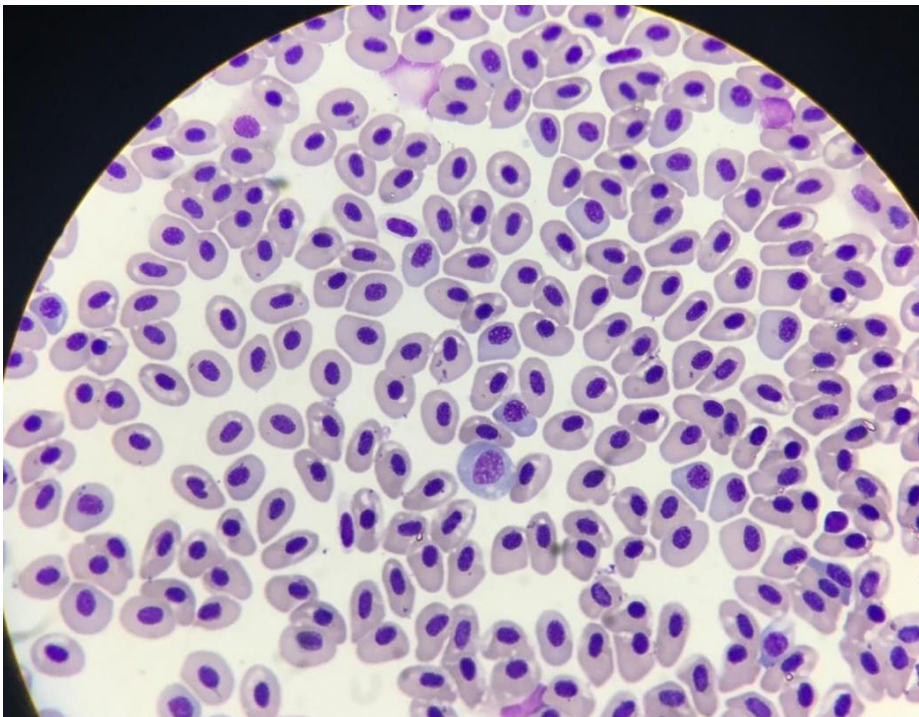
**9**

Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico. 
- 10**

De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.

*Para ver el método de cultivo ingrese a la página del producto en [www.microbiologies.com](http://www.microbiologies.com).*

Anexo 13: Diferenciación y recuento de leucocitos en muestras de sangre.



Anexo 14: Signos clínicos externos de la enfermedad, registrados luego del desafío bacteriano.



d) Descamación de la piel



c) Necrosis leve en la aleta caudal

b) Distención abdominal



a) Hinchazón de la cavidad ventral

e) Hemorragia en la aleta caudal



Anexo 15: Signos clínicos internos de la enfermedad, registrados luego del desafióbacteriano.

