



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN
DIETARIA CON ACEITES ESENCIALES,
EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS,
HEMATOLÓGICOS Y BACTERIAS
INTESTINALES DE LA TILAPIA GRIS
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

CARLOS ARMANDO YONG ROJAS

LIMA - PERÚ

2021

ASESOR

Mg. MV. CARLOS SHIVA RAMAYONI

CO ASESOR

Mg. MV. JORGE RODRIGUEZ BAILÓN

JURADO DE TESIS

MG. DAPHNE JHOANNA LEON CORDOVA

PRESIDENTE

MG. CIELO AYDELI LLERENA ZAVALA

VOCAL

MG. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR

SECRETARIO

AGRADECIMIENTO

Es complicado recordar sin una sonrisa,
el apoyo de cada persona que confió en mí
durante el transcurso de este proyecto,
por ese motivo, volvería a vivir cada pequeño
momento.

Al Ing. Camilo Espinoza, por permitirme interactuar por primera vez con la acuicultura y dar los primeros vistazos a esta rama de la veterinaria.

A mi colega, Carlos Smith, por su guía durante el desarrollo de la maestría y su ayuda a orientar mi línea de carrera.

A mi compañero de promoción, Jesús Roldán, por todo su apoyo durante el periodo experimental de las tilapias, desde sus cimientos.

A la Dra Cielo Llerena, por sus consejos para el desarrollo de mi tesis.

A Fariva, por su apoyo para despejar mis dudas en la realización de mi tesis

Al Dr. Shiva, por su apoyo en el desarrollo del proyecto y facilitar el acceso a las instalaciones del laboratorio de Nutrición e Inocuidad Alimentaria.

A mi compañero, Aaron Obregón por su apoyo en el procesamiento microbiológico.

A los miembros del laboratorio de patología clínica, Rosa Santos y Roy Andrade, por su apoyo en el procesamiento hematológico de las muestras.

A Hippocampus del Perú S.R.L por brindarme un espacio en sus instalaciones para la realización de mi tesis.

A Igusol Advance S.A. por proveerme el aceite esencial durante el período experimental de mi tesis.

Al laboratorio Bioservice S.R.L, por permitirme usar sus instalaciones para la identificación molecular de los microorganismos y a sus miembros por su apoyo,

Dr. Jorge Rodríguez, Dra. Rosario Condori, Renzo Cárdenas, Martín Cossios y
Andrea Serpa.

A mi alma mater, por mi formación académica y ética en el campo laboral.

A Jefferon Pinedo y a Marelsy Pilco por su apoyo en el programa de la maestría

A Rosario Lapa, por su ayuda en los trámites académicos.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante el transcurso de mi formación
profesional, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

Al programa Ciencia activa del CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al
programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH

FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Maestro en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC, Convenio de Gestión N° 230-2015-FONDECYT-DE- PROMOCIÓN 3.

Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA). Mediante el cofinanciamiento del subproyecto “Capacitación en suplementación de alimento balanceado con aceites esenciales en la dieta, para aumentar los índices productivos en la crianza de tilapia en el distrito de Barranca PNIPA-ACU-SEREX-PP000115”.

Anexo N° 18 - Formato para la Declaración de Autor

FORMATO PARA LA DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	11	08	2020
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	Yong Rojas Carlos Armando		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN SANIDAD ACUÍCOLA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	02	04	2018
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETARIA CON ACEITES ESENCIALES, EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS, HEMATOLÓGICOS Y BACTERIAS INTESTINALES DE LA TILAPIA GRIS		
MODALIDAD (marcar)	Tesis	X	Sustentación temática
Declaración del Autor			
La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	945589346		
E-mail	Carlos.yong.r@upch.pe		



Firma del egresado

DNI:73796548

Tabla de contenido

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.	MARCO TEÓRICO	5
3.1	Tilapia	5
3.2	Bacterias benéficas	6
	3.2.1 Género LactoBacillus	6
	3.2.2 Género Bacillus	7
3.3	Bacterias patógenas:	8
	3.2.1 Género Aeromonas	8
	3.2.2 Género Pseudomonas	9
3.4	Parámetros hematológicos en peces	10
3.5	Aceites esenciales (A.E.)	11
3.6	Microencapsulación de aceites esenciales	12
3.7	Aceite esencial Emerald®	13
IV.	ANTECEDENTES	14
V.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	16
VI.	HIPÓTESIS	18
VII.	OBJETIVOS	18
	Objetivo general	18
	Objetivos específicos	18
VIII.	METODOLOGÍA	19
8.1	Lugar de Estudio:	19
8.2	Diseño del estudio:	19
8.3	Población	20
8.4	Criterios de inclusión y exclusión	20
8.5	Tamaño de muestra	21
8.6	Preparación del alimento:	22
8.7	Obtención del A.E:	23
8.9	Medición de parámetros físico-químicos de agua	23
8.10	Toma de muestra de parámetros zootécnicos	23
8.11	Transporte de los animales	24
8.12	Toma de muestras hematológicas	24
8.13	Toma de muestras de contenido intestinal	27

8.14 Plan de análisis de datos	32
IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS:	33
X. RESULTADOS	34
XI. DISCUSIÓN	39
XII. CONCLUSIONES	50
XIII. RECOMENDACIONES	51
XIV. BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de componentes activos en el A.E EMERALD®

Tabla 2: Resultado de parámetros productivos en tilapias suplementadas con A.E Emerald® (N=34)

Tabla 3: Resultado de parámetros hematológicos en tilapias suplementadas con A.E Emerald® (N=10)

Tabla 4: Resultado de unidades formadoras de colonias de contenido intestinal en tilapias suplementadas con A.E Emerald® (n=5)

Tabla 5: Porcentaje de identificación de cepas aisladas en tilapias suplementadas con A.E Emerald®

GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribución y frecuencia de muestreo en el grupo control.

Gráfico 2: Distribución y frecuencia de muestreo en el grupo experimental.

Gráfico 3: Desarrollo del peso durante el periodo experimental.

ANEXOS

Anexo 1: Tabla de descarte por grado de hemólisis (Dugan *et al.*, 2005).

Anexo 2: Composición del alimento administrado.

Anexo 3: Imagen en negativo de PCR 16S.

Anexo 4: Operacionalización de variables de parámetros productivos y parámetros hematológicos.

Anexo 5: Operacionalización de variables de UFC.

Anexo 6: Componentes activos del aceite esencial Emerald ®.

Anexo 7: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Bacillus megaterium*.

Anexo 8: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Bacillus bombysepticus*.

Anexo 9: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Pseudomonas stutzeri*.

Anexo 10: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Bacillus cereus*. **Anexo 11:** Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Ralstonia pickettii*.

Anexo 12: Procesamiento de muestras microbiológicas.

Anexo 13: Procesamiento molecular de muestras microbiológicas.

Anexo 14: Procesamiento de muestras hematológicas.

Anexo 15: Imagen de piscigranja Hippocampus del Perú.

Anexo 16: Crecimiento de unidades formadoras de colonias en medio Bacillus Hicrome.

Glosario de abreviaciones:

A.E: Aceite esencial

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas

pH: Coeficiente que indica el grado de acidez o alcalinidad de una solución

P.V: Peso vivo

BH: Agar Bacillus Hicrome

GSP: Agar glutamato almidón

HK: Agar Hektoen

UFC: Unidad Formadora de Colonias

REC: Ratio específico de crecimiento

GDP: Ganancia de peso diario

%GP: Porcentaje de ganancia de peso

Ht: Hematocrito

Hb: Hemoglobina

GR: Número de glóbulos rojos

LE: Número de leucocitos

VCM: Volumen corpuscular medio

CMCH: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la efectividad del producto comercial Emerald[®], que contiene una mezcla de aceites esenciales microencapsulados, como suplemento alimenticio para tilapia, por medio de la evaluación de parámetros zootécnicos, hematológicos y bacterias intestinales. De un total de 520 tilapias juveniles con un peso promedio de 10 ± 1.17 gramos, se formó dos grupos de forma aleatoria, un grupo con tratamiento suplementado con el A.E al 1% y otro grupo control alimentado sin el producto comercial por un periodo de 60 días, con un control quincenal del peso. Al término del período experimental, se realizó la toma y análisis de los parámetros hematológicos y bacterias intestinales. Por otro lado, las poblaciones bacterianas fueron enumeradas y diferenciadas por su crecimiento en 3 diferentes agares, Hektoen, Bacillus Hicrome y GSP. Los resultados demostraron que la media en el peso final aumentó en un 20.74% en el grupo suplementado con A.E al 1%, comparado con el grupo control. En la media del recuento leucocitario se encontró un aumento del 45.75% en el grupo suplementado con A.E al 1%. Por otro lado, se encontró una disminución de UFC en el grupo suplementado con A.E al 1% en las especies sembradas en agar Hektoen y Bacillus de 95 y 87% respectivamente. Es así que se concluye que el uso de A.E Emerald[®] al 1%, como suplemento alimenticio, resulta una alternativa eficiente para la mejora de los índices productivos.

Palabras clave: A.E. Bacterias. Parámetros– hematológicos. Índices productivos

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the effectiveness of the commercial product Emerald[®], which contains a mixture of microencapsulated essential oils, as a food supplement for tilapia, through the evaluation of zootechnical, hematological and intestinal bacteria parameters. Out of a total of 520 juvenile tilapia with an average weight of 10 ± 1.17 grams, two groups were randomly formed, a group with treatment supplemented with 1% EA and another control group fed without the commercial product for a period of 60 days with a fortnightly weight check. At the end of the experimental period, the hematological parameters and intestinal bacteria were taken and analyzed. The bacterial populations were enumerated and differentiated by their growth in 3 different agars, Hektoen, Bacillus Hicrome and GSP. The results showed that the mean final weight increased by 20.74% in the group supplemented with 1% A.E, compared to the control group. In the mean leukocyte count, an increase of 45.75% was found in the group supplemented with 1% AE. On the other hand, a decrease in CFU was found in the group supplemented with 1% A.E in the species sown on Hektoen and Bacillus agar of 95 and 87% respectively. Therefore, it is concluded that the use of A.E Emerald[®] 1%, as a nutritional supplement, is an efficient alternative for the improvement of the productive index.

Key words: Essential oil. Bacteria. Hematological parameters. Productive index

I. INTRODUCCIÓN

La tilapia constituye el segundo grupo más grande de peces cultivados, encontrándose su producción en constante crecimiento por su buena demanda (Saranya y Sudhakaran., 2020). La eficiencia productiva de este grupo de especies, aumenta la susceptibilidad a procesos infecciosos por ello, para la prevención de la aparición de los mismos, se realizan denodados esfuerzos en sanidad, lo que trae consigo inversiones importantes, específicamente en el uso de antibióticos (Xia *et al.*, 2020). El uso de estos productos en el pasado, daba una solución inmediata, pero a largo plazo ocasiona problemas de resistencia bacteriana, contaminación de zonas adyacentes, entre otros (Yu *et al.*, 2019). Adicionalmente, estos productos se usaban como promotores de crecimiento, pero este uso fue prohibido por la Unión Europea a partir del año 2006 (Done *et al.*, 2015; Moraes., 2018; Ochoa *et al.*, 2017).

Con el fin de contribuir a la prevención de aparición de procesos patológicos y disminuir el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, el enfoque actual de la industria, no sólo está concentrado en buscar alternativas sostenibles que eviten la proliferación de enfermedades, sino que además disminuyan la susceptibilidad a las mismas y aumenten la eficiencia de los procesos productivos, encontrándose el desarrollo de tecnologías como aceites esenciales (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

Para la elaboración de los aceites esenciales se usan extractos a base de clavo, canela, jengibre, orégano, entre otros. Es así que el aceite comercial a usarse, se denomina Emerald[®] el cual es manufacturado por la empresa IGUSOL ADVANCE SA. El producto en cuestión es un microencapsulado que contiene una mezcla de

aceites esenciales en base a clavo, canela, orégano y palma. Este producto está siendo empleado en explotaciones acuícolas de Europa y Centroamérica, para mejorar rendimientos productivos en peces y crustáceos. Sin embargo, hasta el momento el producto en cuestión no ha sido usado en explotaciones intensivas de tilapia. Siendo así el objetivo del presente estudio, determinar el efecto de la suplementación dietaria del aceite esencial microencapsulado Emerald ®, en los parámetros productivos, hematológicos y bacterias intestinales de la tilapia gris (*Oreochromis niloticus*).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El crecimiento de la producción de tilapia en el Perú se encuentra limitado por diversos factores, dentro de los cuales están principalmente, las elevadas densidades de cultivo, deficiente calidad de agua, baja capacitación de los profesionales en el rubro y manejo inadecuado de la semilla (Alcaraz., 2010; Baltazar., 2007; Arteaga *et al.*, 2017). Estos problemas desencadenan en la inmunosupresión de los peces y proliferación de microorganismos potencialmente patógenos en la microbiota residente, dentro de los cuales se incluye el género *Aeromonas*, el cual puede generar grandes pérdidas económicas, por septicemia hemorrágica y forunculosis (Austin y Austin., 2012), debido a que esta enfermedad tiene una morbilidad de 80% y mortalidad del 51.2% (Rodríguez y Hernández, 1998). Además del cuadro patológico producido, la proliferación de estos microorganismos patógenos, genera una competencia directa por la disponibilidad de nutrientes con microorganismos que tienen un efecto benéfico en la salud de los peces, tales como *Bacillus sp.* (Apún, 2007; Nuñez, 2011), generando a su vez la disminución de la eficiencia alimentaria.

Los beneficios de los A.E han sido demostrados en varios estudios previos en explotaciones acuícolas de Europa y Centroamérica, obteniéndose como resultado mejoras en el rendimiento productivo de peces y crustáceos. Si bien existen estudios que demuestran que los componentes de los A.E, pueden mejorar los parámetros hematológicos, y actuar como promotores de crecimiento y moduladores de la población microbiana, aún no se ha demostrado que el producto (EMERALD ®) cuyos componentes son A.E de orégano, clavo, canela y palma, tenga efectos

benéficos para el crecimiento de la tilapia (*O. niloticus*). Este estudio permitirá el uso de alternativa profiláctica para disminuir el uso de antibióticos como quimioterapéuticos, cuyos efectos nocivos a la fecha han sido previamente descritos en la literatura (Yu *et al.*, 2019).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Tilapia

La Tilapia es el segundo pez de agua dulce con mayor producción a nivel global, debido a su elevado valor nutricional, y facilidad de manejo, estando distribuido en más de 100 países (Prabu *et al.*, 2019). Las actividades productivas de esta especie se registraron por primera vez en 1924 en Kenia, para después obtener mejores resultados productivos en Malasia y masificar el cultivo en diferentes zonas del mundo. La Tilapia *rendalli* ingresó en el Perú en la década del 50 por primera vez, como alimento de forraje para paiche y posteriormente ingresaron las especies *O. hornorum*, *O. mossambica* y *O. niloticus*, con fines de investigación y cultivo en las zonas de la selva siendo esta última especie mayormente producida en el país (Baltazar; 2007). Actualmente se registra una producción de *O. niloticus* de 3 mil toneladas por año, cerca del 3% de la producción acuícola en el país, ubicándose principalmente en los departamentos de San Martín y Piura, seguidos de Lima, Cajamarca y Tumbes (PRODUCE; 2017). Los rangos de los parámetros de agua ideales para la producción de esta especie son los siguientes: Ph 6-9, oxígeno ≥ 3 mg L⁻¹, temperatura 22-29 C° y nitrógeno amoniacal ≤ 2 mg (Aanyu., 2016).

La tilapia posee distintas fases de cultivo, en donde se encuentra la etapa de alevinaje, en la cual, los alevines presentan pesos de 1 gr. a 5 gr. y deben ser alimentados con un alimento que contenga 45% de proteína, equivalente al 10% de su biomasa. La siguiente etapa es la etapa de crecimiento, en donde los peces pesan

de 50 gr a 150 gr, en esta etapa, deben ser alimentados con un alimento que contenga 40% de proteína, equivalente al 6-10% de su biomasa total. Por último, en la etapa de engorde, la cual comprende de 150 gr en adelante, en donde los peces deben ser alimentados con un alimento que contenga entre 38-33% de proteína, siendo suministrado al 1.5%-3% de su biomasa total (Cama., 2017).

3.2 Bacterias benéficas

Las bacterias benéficas son organismos vivos capaces de promover una mejora en la composición microbiana intestinal y promover la salud del hospedero (Hemarajata y Versalovic., 2013). Los beneficios son: Mejora de la función de la barrera intestinal, adhesión mejorada de las células intestinales e inhibición de patógenos, producción de sustancias antibacterianas y regulación de las funciones inmunes (Xia *et al.*, 2020). Los probióticos más utilizados en la acuicultura son las bacterias ácido-lácticas, entre las cuales se encuentran los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*.

3.2.1 Género LactoBacillus

Son organismos gram positivos, no formadores de esporas, en forma de bastón y negativos para la actividad catalasa (Goyal, *et al.*, 2012). El género *Lactobacillus*, es un grupo estudiado para aplicaciones biotecnológicas y comercializado como probiótico, debido a que evitan el daño oxidativo y disminuyen el daño por radicales libres (Lee *et al.*, 2017) en los peces, además de poseer la capacidad de producir agentes antibacterianos como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y el diacetilo (Kang *et al.*, 2017). Se han desarrollado varias cepas de *Lactobacillus* para

su uso en peces, en donde se encuentran especies como *L. Acidophilus*, *L. Ractis*, *L. Plantalum* y *L. Ramnosus* (He *et al.*, 2017).

3.2.2 Género Bacillus

Son organismos gram positivos, formadores de esporas, poseen forma de bastón y son parte de la microbiota intestinal de las tilapias (Sookchaiyaporn., 2020), además de ser aerobios obligatorios o facultativos y positivos para la actividad catalasa (Patel *et al.*, 2009). El género *Bacillus* es un grupo extensivamente estudiado (Doroteo *et al.*, 2018), debido a que la mayoría de especies en este género tiene potencial probiótico en la industria acuícola, por sus propiedades benéficas, en donde se encuentra, la mejora del sistema inmune, exclusión competitiva y producción de sustancias antibacterianas (Knipe *et al.*, 2020).

Algunas especies como *Bacillus* spp y *B. subtilis* han sido frecuentemente usadas como probióticos en la acuicultura, debido a que estas especies promueven la colonización intestinal, mejoran el ratio de supervivencia sin afectar la ingesta de alimento, masa total y disminuyen costos operativos parciales presentes en la producción (Xia *et al.*, 2020).

Las cepas probióticas de *B. subtilis* estimulan la respuesta inmune a través de vías locales y sistémicas en la tilapia, además de mejorar el desempeño en el crecimiento y la resistencia a enfermedades (Galagarza *et al.*, 2018). Adicionalmente estudios recientes demuestran que la especie *Bacillus* podría ser efectiva para la prevención de infecciones por *Streptococcus* sp. (Widanarni y Tanbiyaskur., 2015).

3.3 Bacterias patógenas:

Con el incremento de la intensificación en la producción acuícola, las enfermedades se han vuelto un tema frecuente en la acuicultura. Encontrándose con más frecuencia entre estas los siguientes agentes causales:

3.2.1 Género *Aeromonas*

Son bacterias gram (-), en forma de bastón, positivas para la oxidasa y aerobias facultativas, que forman parte de la microbiota intestinal de las tilapias y se encuentran en el medio acuático (Varshney *et al.*, 2017; Pakingking *et al.*, 2020). La patogenicidad de este grupo de bacterias, se relaciona a 2 genes de virulencia, los cuales son la aerolisina y la enterotoxina citotóxica, que tienen efecto citotóxico, enterotóxico y hemolítico (El-Bahar *et al.*, 2019). Las lesiones reportadas en tilapias debido a la infección por *Aeromonas* son la presencia de úlceras hemorrágicas en la piel, edema, descamación y despigmentación (Grajales-Hahn *et al.* 2018).

Se han reportado 5 diferentes especies patógenas (Amal *et al.*, 2018; Grajales-Hahn *et al.*, 2018) destacando entre estas, *Aeromonas hydrophila*, agente causal de la septicemia mótil aeromonadal. A pesar de que esta especie de *Aeromonas* es considerada como un patógeno secundario, puede tener carácter emergente como patógeno primario (Aly *et al.*, 2015). Este grupo de bacterias se ha identificado como patógenos de importancia en peces de agua dulce, debido a que han sido aisladas de un estudio de prevalencia en un 46.7 % en tilapias infectadas naturalmente (Hassan *et al.*, 2020), además de tener una morbilidad del 80% y mortalidad del 51.2%, lo que conlleva a una menor calidad del producto final y pérdidas económicas importantes (Rodríguez y Hernández, 1998).

3.2.2 Género *Pseudomonas*

Son bacterias gram (-), en forma de bastón, positivas para la oxidasa y aerobias obligatorias, no formadores de esporas y motiles por un flagelo polar (Liu *et al* 2021), además de ser aislada de tractos intestinales de tilapia con poca prevalencia (Alcaraz., 2010). Se han reportado 3 diferentes especies patógenas en este grupo, destacándose la *P. aeruginosa* (Ghazy *et al.*, 2020; Hal y Manal, 2020), la cual posee dentro de sus factores de patogenicidad, la formación de biofilms, proteasas, elastasas, y toxinas (Osman *et al.*, 2021). *P. aeruginosa* posee resistencia a la mayoría de los antibióticos y actualmente se reconoce como una bacteria importante para el Centro de Control y la Prevención de Enfermedades (Paczkowski *et al.*, 2017).

Las lesiones de tilapia relacionadas a infecciones por *Pseudomonas* son hemorragias, pérdida de escamas, úlceras y ascitis (Derwa *et al.*, 2017; Ismail, y El Lamei., 2017). Se conoce que esta especie puede causar cuadros patológicos en una frecuencia de 23 % en un estudio de prevalencia de patógenos en tilapias infectadas naturalmente (Hassan *et al.*, 2020), y llegar a producir un ratio de mortalidad del 30% en *O. niloticus* infectadas experimentalmente (Hossain *et al.*, 2006).

3.4 Parámetros hematológicos en peces

Los parámetros hematológicos conforman un papel importante en el manejo y la salud de los peces, debido a que indican el estado actual de la inmunidad, a través del conteo de LE e interacción de nutrientes y sirven como herramienta para identificar el efecto de los aceites esenciales en los peces (Abdelhamid *et al.*, 2019). Adicionalmente los estudios en los parámetros hematológicos, ayudan a detectar alteraciones que no podrían observarse a través de la sintomatología o mortalidad de los animales, causadas por condiciones estresantes o enfermedades (Harikrishnan y Balasundaram., 2005). Asimismo, Aly *et al.*, 2020 reportó que en infecciones experimentales de *A. hydrophila*, se encuentra una disminución total en el recuento eritrocitario y concentración de hemoglobina, además de un aumento en el recuento leucocitario

Leucocitos: Normalmente, uno de los parámetros más sensibles a alterarse en condiciones de estrés, infecciones y cambios en los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo es el recuento leucocitario (Bosisio., *et al* 2017).

Hematocrito: El análisis de sus variaciones puede ser usado para determinar el nivel de actividad de los peces, debido a que Wilhelm *et al.*, 1992 observaron que las especies de peces más activas poseen niveles más altos de Ht, Hb y Rbc en comparación con especies de peces menos activas. Este cambio es causado debido a que la contracción esplénica, se relaciona con el aumento del tamaño de los eritrocitos (Dal'Bó *et al.*, 2015).

MCHC: El MCHC es un indicador de la hinchazón de los eritrocitos, es el ratio de la hemoglobina en sangre que no es influenciado por la cantidad de células. Su disminución además podría significar una disminución en la síntesis de hemoglobina. (Alohan *et al.*, 2014)

VCM: El MCV es un indicador que determina el tamaño de los eritrocitos. Las alteraciones en sus valores podrían indicar una anemia, en donde un MCV alto indicaría un estado macrocítico y un MCV bajo indicaría un estado microcítico (Javed *et al.*, 2016).

3.5 Aceites esenciales (A.E.)

Son compuestos a base de múltiples sustancias volátiles, líquidas y lipofílicas obtenidas a partir de diferentes partes de plantas, cada A.E posee dentro de su composición, numerosas moléculas en diferentes proporciones con componentes bioactivos, que determinan la propiedad biológica del A.E (Silva y Fernandes., 2010). El número de estos componentes varía de 20 a 200, encontrándose los componentes mayores en concentraciones de 20 a 95%, seguido de los componentes secundarios con una concentración de 1 a 20% y los elementos traza, que poseen una concentración menor al 1% (Souza *et al.*, 2019). Estos componentes son principalmente hidrocarburos (Sesquiterpenos, terpenos, componentes oxigenados, cetonas, alcoholes, aldehídos) y en menor proporción se encuentran los residuos no volátiles, tales como cera, parafina, entre otros (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi., 2007). Algunos de estos, son reconocidos por tener un efecto beneficioso en la salud de los animales, teniendo la capacidad de potenciar la respuesta inmune, cantidad de linfocitos circulantes, conteo de macrófagos, así como el aumento de los parámetros productivos y modulación positiva de la

microbiota intestinal (Aanyu *et al.*, 2020). El perfil químico de los aceites esenciales puede variar en cantidad y en composición, de acuerdo al clima, composición del suelo, órgano de la planta, edad y ciclo vegetativo así que, con el fin de obtener la misma composición de aceites esenciales, se debe realizar la extracción en las mismas condiciones (Baptista-Silva *et al.*, 2020). Existen diversas técnicas que pueden ser usadas, entre estas se tiene la extracción de solventes, destilación a vapor, expresión bajo presión, extracción de agua subcrítica y extracción de fluidos supercrítica (Edris., 2007).

3.6 Microencapsulación de aceites esenciales

Los componentes activos de los aceites esenciales pueden degradarse cuando están expuestos a oxígeno, luz, y calor, lo que puede provocar la formación de sabores no agradables y la generación de radicales libres (Turek y Stintzing., 2013). Estos cambios tienen un efecto negativo en la estabilidad del aceite, propiedades sensoriales y aceptabilidad del mismo (Bakry *et al.*, 2016). De modo que, con el fin de que los aceites esenciales mantengan las propiedades funcionales de sus componentes activos, se desarrollan tecnologías que cumplan este propósito, siendo la tecnología de microencapsulación, una forma viable de mantener las propiedades funcionales de los componentes activos de los aceites esenciales (Veiga *et al.*, 2019).

La microencapsulación es un proceso, en el que un componente activo es embebido en una matriz heterogénea para formar pequeñas cápsulas (Martins *et al.*, 2014). El material de la cápsula suele ser gradualmente difuso, con el fin de ofrecer una liberación controlada de las sustancias bajo condiciones deseadas. Por lo tanto, la

tecnología de microencapsulación puede usarse para mejorar las capacidades de manejo de los aceites esenciales (AbdManaf *et al.*, 2015)

3.7 Aceite esencial Emerald®

Emerald® es un producto comercial desarrollado por la empresa española Igosol Advance SA, este es un microencapsulado compuesto de aceites esenciales de canela, clavo, orégano y palma, usado para la suplementación de dietas en truchas y camarones. Debido a la microencapsulación del producto, los aceites esenciales pueden llegar al intestino, además de permitir su liberación progresiva y completo depósito de los mismos, mejorando el estado de salud en los peces (IGUSOL ADVANCE S.A,

IV. ANTECEDENTES

En un estudio en tilapia nilótica (*O. niloticus*) se evaluó el efecto de A.E. de timol a concentraciones de 0.1, 0.5, y 1% por 15 días, en parámetros sanguíneos y población intestinal de *Bacillus* spp. Se llegó a la conclusión que, debido al comportamiento de los peces, la administración de este A.E. no era tóxica, además que las concentraciones de linfocitos y leucocitos aumentaron con la dosis más alta y las poblaciones de *Bacillus* spp. no fueron alteradas en estas dosis (Valladão *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en juveniles de tilapia, se investigó el efecto de 2 aceites esenciales: cinamaldehído y timol, en el crecimiento y la inmunidad. La alimentación de los peces fue realizada por 75 días, los resultados mostraron que los peces suplementados con las dietas suplementadas con A.E. incrementaron su crecimiento significativamente en comparación al grupo control y que la suplementación dietaria con cinamaldehído o timol aumentó significativamente el peso en los peces (Amer *et al.*, 2018).

Se realizó un estudio para identificar el efecto de dos aditivos en el alimento, uno rico en carvacrol conteniendo 1g/ kg y otro rico en timol que contenía 1 g/kg, en el crecimiento y microbiota intestinal en truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de un peso de 113.0 ± 10.4 gr. Los grupos experimentales fueron alimentados por 56 días. Los resultados mostraron que la suplementación dietaria con estos productos aumentó la eficiencia alimentaria en las dietas fitogénicas, sin embargo, no afectó la ganancia de peso, a diferencia del recuento de la microbiota intestinal, en donde se halló una disminución en bacterias anaerobias, y un aumento la población de lactobacillus.

Por último, los niveles de lisozima y catalasa fueron más altos en las dietas fitogénicas (Giannenas *et al.* 2012).

En un estudio se investigó si la suplementación dietaria de componentes fitogénicos como limoneno y timol tenían un efecto sinérgico en el crecimiento y fisiología nutricional en la tilapia gris (*O. niloticus*), para ello se realizó la suplementación de 3 dietas experimentales distintas, las cuales fueron 500 ppm de timol, 400 ppm de limoneno y una combinación de ambos a tilapias de un peso de 1.5 ± 0.0 gr por 63 días. El peso final mejoró de manera similar en los peces alimentados con la combinación de los aceites y aquellos alimentados con timol. Sin embargo, no se encontró una mejora en el peso final en los peces suplementados solamente con timol. Adicionalmente se evaluaron genes responsables de la digestión de nutrientes y el crecimiento, encontrándose una mayor expresión de estos genes, en la dieta sólo con limoneno, por lo que se llegó a la conclusión que la dieta combinada con limoneno y timol, no tiene un efecto sinérgico o aditivo (Aanyu *et al.*, 2020).

V. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La tilapia es el segundo pez más producido a nivel mundial, solo superado por la carpa. Representa una fuente barata de proteína para la mayoría de países en desarrollo y contribuye significativamente a la seguridad alimentaria global (Ren *et al.*, 2019). El cultivo de tilapia ha mostrado una producción en constante crecimiento, acercándose a 4.8 millones de toneladas a nivel global en el año 2015 (Globefish., 2015). Es una alternativa para satisfacer la demanda de alimentos a nivel mundial debido a su rápido crecimiento, adaptabilidad, fácil manejo y altos indicadores de producción (Espinosa-Chaurand *et al.*, 2019).

La suplementación de aceites esenciales en la dieta favorece la eficiencia de los procesos productivos, por medio de la modulación positiva de la microbiota y la disminución indirecta, en el uso de productos sanitarios para el control de las enfermedades, debido a que evita la entrada de agentes patógenos a las producciones acuícolas por medio de la mejora del sistema inmune de los peces (Vaseeharan y Thaya., 2014). Con este fin, anteriormente se han usado mezclas comerciales de aceites esenciales en la suplementación de tilapia tales como SALUTO® (Freccia *et al.*, 2014) o Essential® (Sosa *et al* 2020).

El producto usado en este estudio, es un aditivo microencapsulado que contiene A.E. ampliamente estudiados, encontrándose dentro de este, A.E. de canela, clavo de olor, orégano y aceite de palma, estos aceites han sido estudiados individualmente con anterioridad en tilapias (Gaber., 2000; Amer *et al.*, 2018; Ayisi *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado un estudio para elucidar si la combinación de dichos aceites posee un efecto sinérgico en la tilapia (*O. niloticus*).

Por lo tanto, es de interés estudiar el potencial del A.E como agente inmunoestimulante y prebiótico, además de su efecto promotor en los parámetros hematológicos y zootécnicos. Es así que se espera que los resultados obtenidos contribuyan a la reducción del uso de antibióticos, así como la reducción de los costos sanitarios, de modo que la producción tenga una relación cada vez más sostenible con el medio ambiente, además del aumento de la eficiencia productiva de la especie, por medio del efecto nutritivo del aceite de palma y el efecto modulador de la microbiota del aceite de orégano, clavo y canela.

VI. HIPÓTESIS

La suplementación del compuesto Emerald® al 1%, aumenta el porcentaje de peso final en un 20% de la tilapia (*Oreochromis niloticus* sp.).

VII. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto del compuesto Emerald® al 1%, en los índices productivos, los parámetros hematológicos a partir de la vena caudal y el conteo de colonias bacterianas a partir del intestino posterior.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto del compuesto Emerald® al 1% en el peso final, ganancia de peso diario (mg/día) y el ratio específico de crecimiento.
- Determinar el efecto del compuesto Emerald® al 1% en el hematocrito, recuento eritrocitario y recuento leucocitario.
- Determinar el efecto del compuesto Emerald® al 1% en el recuento bacteriano de *Aeromonas* spp, *Bacillus* spp y en recuento de gram negativas del contenido intestinal.

VIII. METODOLOGÍA

8.1 Lugar de Estudio:

La suplementación del aceite esencial a las tilapias fue realizada en la Empresa HIPPOCAMPUS DEL PERÚ S.A.C, la cual, está localizada en la provincia de Barranca, departamento de Lima, Perú.

La hematología se realizó en el laboratorio de Patología clínica y las muestras para el conteo bacteriano, se procesaron en el laboratorio de Nutrición e Inocuidad Alimentaria, ambos laboratorios pertenecientes a la Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Las colonias bacterianas aisladas anteriormente, fueron transportadas al laboratorio de Biología molecular de Bioservice SRL para la extracción de adn.

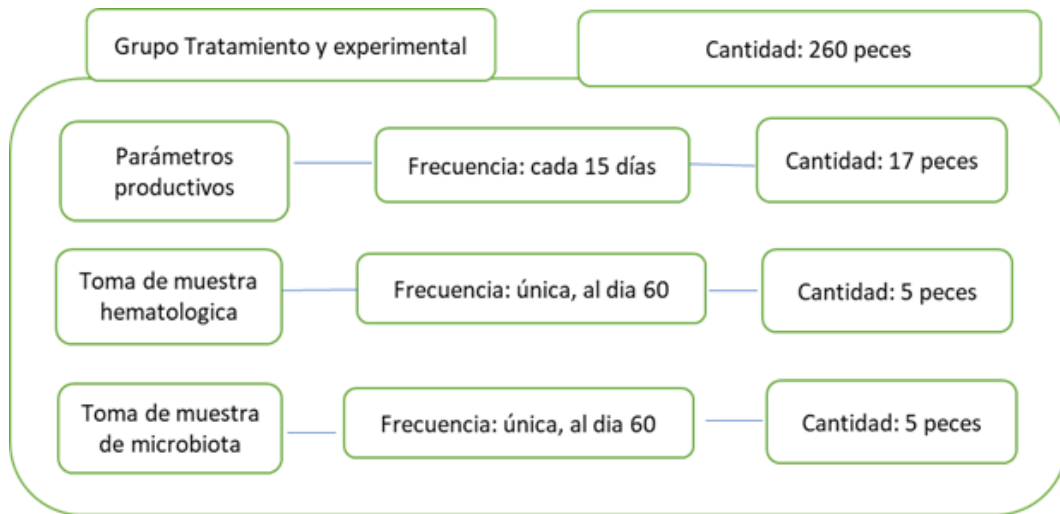
8.2 Diseño del estudio:

El tipo de estudio realizado fue experimental.

La distribución para la toma de muestra de los grupos utilizados se realizó según los siguientes cuadros.

La parte experimental de este estudio, comenzó el 4 de septiembre, terminando el 11 de noviembre, teniendo una duración total de 60 días.

Gráfico 1: Distribución y frecuencia de muestreo en el grupo control y experimental



8.3 Población

Se utilizó un total de 520 juveniles de tilapia (*O. niloticus*) provistos por la empresa Hippocampus del Perú S.A.C. de un peso de 10 ± 1.2 gramos.

8.4 Criterios de inclusión y exclusión

El criterio de inclusión fue en base a la unidad muestral, peces juveniles alimentados con los tratamientos pertenecientes al estudio.

Los peces que presentaron sintomatología patológica como pérdida de apetito, nado anormal (orientación vertical y giros), conductas de rascado, ubicación en el fondo, boqueo frecuente y melanosis (GGA; 2020), fueron excluidos del experimento.

Para las muestras hematológicas, se excluyó las que presentaron un grado de hemólisis mayor a 200 mg/dl, según la tabla de descarte (Anexo 1).

8.5 Tamaño de muestra

El número de peces por grupo, se determinó con el programa Winepi 2006 (Working in epidemiologic) con la función de estimar una proporción. Se estimó una proporción máxima aceptable de 81% de tilapias que cumplieran con las condiciones deseadas en el estudio (Abbas *et al.*, 2010) con un nivel de confianza del 95% y un margen de error de 5.00%, resultando un tamaño muestral de 237 individuos, adicionalmente se consideró el 10% de pérdidas esperadas, teniendo un total de 260 peces por grupo. En el estudio se tuvieron dos grupos, un grupo control que fue alimentado con dieta comercial y otro grupo experimental, el cual fue suplementado con el A.E Emerald[®] al 1% teniendo un total de 520 peces en el estudio.

El tamaño de muestra se determinó a través de la ejecución de 2 medias diferentes. El primer grupo involucró las muestras requeridas para las siguientes variables: constantes hematológicas y conteo bacteriano de los géneros de *Aeromonas*, *Bacillus* y bacterias gram negativas a partir de contenido intestinal. Se introdujo en el programa Winepi, como media en el grupo control de 1.65, la media en el grupo experimental de 2.26, la desviación estándar de 0.24, estos valores representan a las unidades formadoras de colonias, debido a que, en un estudio previo, estos parámetros contaban un varianza mayor que los parámetros hematológicos, además de usarse un nivel de confianza de 90% y una potencia de 80% (Wigraiboon *et al.*, 2016). Obteniendo cinco individuos por grupo para los parámetros hematológicos y conteo bacteriano, los cuales se muestrearon al término de los 60 días de los estudio.

Para el segundo grupo, el cual involucró los parámetros zootécnicos. Se introdujo en el programa Winepi, como media en el grupo control de 1.76, para la media en el grupo experimental se planteó un incremento del 10% de la media en el grupo control, resultando 1.96 y para la desviación estándar se planteó un valor del 10% de la media en el grupo control, resultando 0.17, estos valores fueron obtenidos a partir del valor del peso de tilapias de un estudio anterior, trabajándose un nivel de confianza de 95% y una potencia de 80% (Wigraiboon et al., 2016). Obteniendo diecisiete individuos por grupo para los parámetros zootécnicos, los cuales se muestrearon cada 15 días luego de haber comenzado el estudio.

8.6 Preparación del alimento:

Los alimentos usados por el experimento, provinieron de la empresa peruana Aquatech, la composición químico proximal de estos, está detallada en el anexo 2. Se suplementó a los peces con dos tipos de alimentos, de acuerdo al peso que alcanzaban dentro del experimento, siguiendo las recomendaciones del fabricante, que fueron tilapia 40 y tilapia 35 para pesos de 10 gr - 30 gr y 30 gr - 80 gr respectivamente. Se brindó la cantidad de alimento necesaria a los animales de acuerdo al peso y temperatura del agua del estanque.

El aceite microencapsulado, fue suplementado en concentración de 1 gr por kg del alimento, utilizando melaza diluida al 3% por medio de un pulverizador con el uso de una mezcladora horizontal de acero inoxidable por 20 minutos, con el fin de adherir el microencapsulado al alimento balanceado, según las recomendaciones del fabricante.

8.7 Obtención del A.E:

El aceite Emerald[®] fue elaborado el 20 de febrero del 2019 en las instalaciones de Iguisol, en Zaragoza, España. Importándose un total de 2 bolsas para su uso en el experimento.

La composición del microencapsulado del A.E fue obtenida por medio de (CG-MS), que fue realizado por la Unidad de Investigación en productos Naturales del laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con el equipo: Cromatografía de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975 C.

8.9 Medición de parámetros físico-químicos de agua

Durante el experimento se realizó la medición de los siguientes parámetros físico químicos: temperatura, oxígeno disuelto y pH, cada dos veces al día: 8:00 am y 5:00 pm.

8.10 Toma de muestra de parámetros zootécnicos

Recolección de información de desempeño en el crecimiento:

Se recolectó la información de desempeño en el crecimiento cada dos semanas a 30 peces de manera aleatoria en ambos grupos experimentales. Se pesó a las tilapias individualmente con una balanza gramera digital de marca Pocket Scale, la cual fue calibrada con un peso de 0.01 gr.

Efecto en el desarrollo:

Para obtener el efecto en el desarrollo, se usó el método usado por Ümit *et al.*, 2015 usando las siguientes fórmulas:

- Ganancia de peso diario (mg/d) = (Peso final – Peso inicial) / (periodo experimental)
- Ratio específico de crecimiento= 100 x ln (peso final/peso inicial) /días de experimento.

8.11 Transporte de los animales

Con el objetivo de reducir el estrés de los peces durante el transporte de los mismos, se siguieron las disposiciones propuestas por la FAO 1998, para transporte de peces en donde previamente, los especímenes fueron sometidos a un ayuno de 12 horas. Se realizó el llenado de dos baldes de plástico con capacidad de 10 litros hasta los 2/3 de su capacidad, se identificaron los baldes según el grupo al que pertenecían los peces, teniendo aproximadamente cinco peces por balde. Se verificó que el agua cuente con temperatura entre 15 C°-20 C°; pH entre 7 y 7,5; oxígeno disuelto mayor a 5.5. Asimismo, se colocó trozos de tela húmeda alrededor del balde para mantener la temperatura del agua. Por último, se realizó un orificio en la parte superior del balde para conectar el agua de las tilapias a una manguera, alimentada con un aireador a pilas de marca sb-960 con capacidad de 2 L/Min Con respecto al medio de transporte, se realizó el viaje en la mañana y se redujo el número de paradas al máximo para la llegada de los peces a los laboratorios de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

8.12 Toma de muestras hematológicas

Se procesaron 5 muestras hematológicas de ambos grupos experimentales en el laboratorio de Patología Clínica dentro de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cayetano Heredia.

Previamente los peces fueron anestesiados en un acuario de dimensiones de 40*20*20 cm con Benzocaína en una dosis de 190 ppm por 86 segundos (Okamura *et al.*, 2010), luego se ubicó la vena caudal y se realizó una punción de la misma usando aguja de calibre 21G embebida en 0.1 ml de anticoagulante EDTA. Se separaron e identificaron las muestras obtenidas del grupo control o de aceites esenciales; parte de las muestras fue usada para el ensayo hematológico, siendo colocado 0.4 ml de sangre en tubos con EDTA al 10% (Salvador *et al.*, 2014).

Recuento Celular

Para el conteo de la población celular en sangre, se utilizó la cámara Neubauer con el reactivo Nat-Herrick, según el proceso efectuado por Martínez-Silvestre. *et al* 2013. Una vez que la muestra estuvo teñida, las células fueron diferenciadas solamente como leucocitos o eritrocitos, siguiendo el criterio por Tavares-Dias (2006) para peces teleósteos.

Proceso de tinción

Se comenzó colocando 995 μ L de diluyente en microtubo de 1.5 ml, luego se agregó 5 μ L de sangre y se mezcló durante 2 minutos, para luego dejar reposar la mezcla durante 4 minutos. Luego se mezcló nuevamente y se colocó 1 ml en una cámara de Neubauer y se dejó reposar el contenido durante 2 min.

Posteriormente se comenzó el conteo de células. En el conteo de leucocitos, se contó los leucocitos dentro de 9 cuadrados primarios y se multiplicó por el 10% del total y 200. Para el conteo de eritrocitos, se consideró el cuadrado primario central, después se multiplicó el total de eritrocitos por 10 000.

Hemoglobina

Para determinar la concentración de HB (g/dl), se mezcló 0.02 cm³ de la sangre con 4 cm³ del reactivo de Drakbin, luego se invirtió lentamente la mezcla por 10 minutos, con el fin de obtener la cianometahemoglobina. El coágulo formado fue removido con una varilla de plástico, y se leyó su transmitancia con un espectrofotómetro a 540 nm, luego esta lectura fue convertida a la concentración de hemoglobina por gramo por 100cm³.

El volumen de Hematocrito fue determinado por capilaridad, colocándose 75 mm de sangre en capilares, que fueron posteriormente sellados y centrifugados en una microcentrífuga de hematocrito a 10 mil RPM por 5 minutos para la posterior lectura.

El volumen corpuscular, y las concentraciones promedio de MCH y MCHC fueron calculadas por las siguientes fórmulas según (Lewis *et al.*, 2008):

$$MCV (\mu m^3) = \frac{(Hct \%) \times 10}{(RBC \times 10^6 \text{ por } mm^3)}$$

$$MCH (pg) = \frac{\left(Hb \frac{g}{dL}\right) \times 10}{(RBC \times 10^6 \text{ por } mm^3)}$$

$$MCHC (\%) = \frac{\left(Hb \frac{g}{dL}\right) \times 100}{(Hct \%)}$$

8.13 Toma de muestras de contenido intestinal

Para el aislamiento de la microbiota, se realizó la eutanasia por medio de sobredosis anestésica de benzocaína de 250 mg/L por 5 minutos (AVMA., 2013). Se verificó como el indicador de muerte, el cese de movimiento opercular (Hastein., 2005). El pez eutanasiado fue inmediatamente removido del acuario, para que se realice la toma de muestra por medio de la necropsia, en donde se realizó una incisión aséptica a los peces en el abdomen, a continuación, se obtuvo 1 gr del intestino posterior, cuya sección se encuentra incluida 1 cm de distancia del ano y a 0,5 cm de distancia de la mitad del intestino (Frierson *et al.*, 1992).

Posteriormente, se realizó diluciones seriadas del mismo en tubos que contenían 10 ml de agua estéril, y posteriormente se usó un mezclador de vórtice para su homogenización, según Giannenas *et al.*, 2012; Jimoh, *et al.*, 2019.

Se colocó el contenido intestinal en diluciones de agua estéril (10^{-1} , 10^{-9}) para los agares Hicrome Bacillus, GSP y Hektoen (Araújo *et al.*, 2017), previamente con el objetivo de obtener una dilución óptima, todas las diluciones fueron sembradas en triplicado, con el método de recuento en placa por siembra en superficie con una asa de Drigalski (Fátima., 2015).

Para realizar el recuento bacteriano dirigido al género bacteriano *Aeromonas* spp, se usó el agar GSP (Glutamato almidón fenol rojo). Se comenzó preparando el agar GSP con las recomendaciones del fabricante, luego 100 µl del inóculo diluido de en diluciones de agua estéril (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) fue esparcido en la superficie de 3

placas Petri y fue incubado aeróbicamente a 37 C° por 48 horas. Posteriormente, las colonias que cambiaron el color del medio de rojo violeta a amarillo, fueron identificadas de forma preliminar como *Aeromonas* spp (Giannenas *et al.*, 2012) y otras colonias que crecieron, pero no presentaban cambios en el medio, fueron identificadas de forma preliminar como bacterias de la familia enterobacteriaceae. Para realizar el recuento bacteriano dirigido al género bacteriano *Bacillus* se usó el agar HiCrome™ Bacillus Agar. Se comenzó preparando el agar con las recomendaciones del fabricante, luego 100 µl del inóculo diluido de en diluciones de agua estéril (10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}) fue esparcido en la superficie de 3 placas Petri y fue incubado aeróbicamente a 37 C° por 24 horas. Posteriormente todas las colonias que crecieron en este medio y fueron de color verde amarillento, azules y rosadas, fueron identificadas de forma preliminar como *Bacillus* sp (Mishra *et al.*, 2012).

Para realizar el recuento bacteriano dirigido a bacterias gram negativas a partir de contenido enterico, se usó el agar Hektoen Enteric Agar. Se comenzó preparando el agar con las recomendaciones del fabricante y posteriormente se esparció 1 µl del inóculo en la superficie de 3 placas Petri, luego se realizó la incubación aeróbica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas, luego todas las colonias que crecieron en este medio fueron identificadas de forma preliminar como enterobacterias (Giannenas *et al.*, 2012).

Análisis de PCR

Se realizó un estudio complementario para el análisis PCR de las colonias encontradas, con el objetivo de complementar lo encontrado en el estudio. En

primer lugar, Se distinguió los diferentes tipos de colonias encontrados en cada placa en los tres medios de cultivo, por medio de la diferenciación morfológica, identificándose los tipos de colonia encontrado y de cada tipo, se seleccionó una colonia al azar. Cada colonia colectada fue identificada mediante rótulos y la información referente a cantidad de muestra, número de muestra, características de la muestra, dirección, hora de muestreo, hora de remisión al laboratorio, nombre y firma del colector responsable fueron registradas antes de ser remitidas al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de Bioservice.

Se conservó un total de 5 colonias en suspensión de glicerol al 20% de BHI a -70 C° para su posterior identificación por medio de PCR (Razmgah *et al.*, 2017).

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en un microtubo de 1.5 ml que contenía 1 mL de caldo BHI, dentro de un cooler con geles refrigerantes. Posteriormente se realizó la activación de las colonias en el laboratorio, colocando parte de la muestra original en un nuevo microtubo de 1.5 ml con 1 ml de BHI y se incubó la muestra por 24 horas, para que alcance un índice estimado de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland con un espectofotómetro.

Se realizó la obtención de ADN genómico de las 5 muestras previamente colectadas, mediante el método modificado de membranas de sílica gel utilizando el Kit de extracción de ADN: GF-1 Tissue DNA Extraction (Vivantis)-Proteínasa K, Lysis enhancer, Wash buffer, Elution buffer, TBE buffer (Bioservice, 2019).

Para cada colonia aislada conservada en la suspensión de glicerol, se utilizó un Kit comercial de purificación (GF-1), para la extracción de ADN genómico y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR estándar) para amplificar el gen que codifica ARNr 16S.

La extracción del ADN genómico se realizó comenzando con la centrifugación a 14000 rpm de 1 ml en caldo BHI previamente incubado con la colonia de interés por 5 minutos y eliminación del sobrenadante. Adición de 20 uL de Proteinasa K y mezcla vigorosa en vórtex durante 20 segundos. Adición de 10 uL de Lysis enhancer y colocar la mezcla en un vórtex por 15 segundos; incubación del homogenizado a 65°C por 30 minutos. Adición de 200 uL de etanol absoluto y colocado de la mezcla en vortex por 20 segundos. Transferencia del homogenizado a una columna colocada sobre un tubo de colección de 2 ml (proveídos por el Kit vivantis). Centrifugación a 8.000 rpm por 1 minuto. Descarte del contenido del tubo de colección. Adición de 650 uL del Wash Buffer a la columna. Centrifugación a 8.000 rpm por 1 minuto. Descarte el contenido del tubo de colección. Repetición de los pasos, hasta completar un total de 2 lavados con Wash Buffer. Centrifugación por una última vez a 13.000 rpm por 1 minuto. Descarte del tubo de colección con el filtrado y colocado de la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Precaentado del Elution Buffer por 10 minutos a 65°C. Adición de 200 uL de Elution Buffer precaentado, al filtro de la columna e incubación por 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto. Almacenamiento del ADN genómico resuspendido a -20 C°.

La confirmación de la presencia de las 6 cepas bacterianas aisladas se realizó por amplificación y secuenciamiento de 1000 bp del gen 16S rRNA. El gen 16S rRNA se amplificó usando los siguientes pares de cebadores: 27F (5`AGAGTTTGATCMTGGCTCAG`3) y 1525R (5`AAAGGAGGTGWTCCARCC`3); las condiciones de amplificación fueron: PCR inicial de 95 C° a 4 minutos; 30 ciclos de PCR a las fases de desnaturalización de 95 °C 30 segundos, alineamiento 55 C° a 45 segundos y la fase de polimerización a 72 C° a 45 segundos; y un post-PCR de 72 C° a 5 minutos Lillo *et al.*, (2006). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE 1X (Tris, Borato, EDTA) durante 45 minutos a 100 voltios y visualizados bajo luz ultravioleta, se tomó una foto para comprobar que los productos de PCR estaban siendo amplificados, y que obtuviesen 1200 pares de bases del gen en mención y se verificó que alcancen ese tamaño con un control positivo (Anexo 3). Posteriormente se envió el producto PCR sin purificar para su secuenciación.

El secuenciamiento se realizó utilizando las dos hebras mediante el BigDye v3.1 sequencing terminator Kit (LT) y un analizador genético ABI 3137 XL (LT), el servicio fue proveído por la empresa Macrogen Inc. (Korea).

Para determinar la especie secuenciada, se utilizó la página <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, en donde se introdujeron las dos hebras de ADN y se analizaron en conjunto con la función nucleotide blast. Se introdujo la secuencia fasta enviada por la empresa Macrogen Inc y de los datos resultantes se eligió las cepas bacterianas que tenían mayor porcentaje de similaridad y puntuación. El porcentaje de similaridad mínimo aceptable fue de 98.5% de acorde

a lo realizado por Bou *et al* 2011 para la identificación bacteriana.

El programa Blast calcula la puntuación en los nucleótidos mediante la asignación de un sistema de recompensa de 2 puntos por cada par alineado de letras idénticas y una penalización de -3 puntos por cada par no idéntico alineado a lo largo del alineamiento (Wheeler; 2007).

8.14 Plan de análisis de datos

Para el análisis de datos, se realizó el uso de software STATA versión 14. Se consideró el valor $p < 0.05$, en donde se realizó la prueba de *Kolmogorov Smirnov*, con el fin de obtener el comportamiento normal o no de la variable.

Los estadígrafos utilizados durante el estudio fueron la media y desviación estándar. Con respecto para la operacionalización de variables, se enfrentó al tipo de dieta (cualitativa dicotómica) contra los parámetros productivos (ganancia de peso diario, y ratio específico de crecimiento), y parámetros hematológicos (Hematocrito, hemoglobina, número de glóbulos rojos, número de leucocitos, volumen corpuscular medio y concentración de hemoglobina corpuscular media) como cuantitativa continua, para posteriormente realizar la prueba T de student independiente (Anexo 4). Mientras que se enfrentó el tipo de dieta (cualitativa dicotómica) contra las unidades formadoras de colonias, para posteriormente realizar la prueba de U de Mann-Whitney (Anexo 5). Se consideró el valor $p < 0.05$.

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

La presente investigación con código de registro SIDISI 103987 fue evaluada por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y aprobada mediante la constancia E010 - 06 - 20.

Durante la experimentación se siguieron los protocolos establecidos por FAO (1998) para el transporte de animales y (AVMA., 2013) para la eutanasia de los mismos respetándose el bienestar animal.

X. RESULTADOS

Se obtuvo nueve compuestos del A.E, encontrándose en mayor proporción: Cinamaldehído 53.93%, Timol 24.22% y Carvacrol 18.73% (**Anexo 6**)

Para conocer la concentración de la mezcla de aceites esenciales en el microencapsulado, se utilizó la técnica de arrastre con vapor de agua. En donde a partir de 10 gramos del microencapsulado, se extrajeron 1,5 ml de la mezcla de aceites esenciales.

Siguiendo esta información, si se suplementó 1g de A.E por Kg de alimento, se tiene lo siguiente 1 gr de microencapsulado---> 0.15ml de A.E

Tabla 1: Concentración aproximada de componentes activos en el A.E por kg EMERALD®

Componentes	Cantidad en mL en alimento	Concentración en alimento (%)
1-metil-4-(1-metiletenil)-Benceno	0.0135	0.0000135
Limoneno	0.018	0.000018
Estireno	0.0435	0.0000435
Benzaldehído	0.1095	0.0001095
p-Cimeno	0.1215	0.0001215
3-fenil-2-Propenal	0.162	0.000162
Carvacrol	2.8095	0.0028095
Timol	3.633	0.003633
Cinamaldehído	8.0895	0.0080895

Se reportan que los parámetros físico químicos del agua de cultivo para temperatura, oxígeno disuelto y pH fueron de 21.3 ± 3.2 , 5.1 ± 0.8 y 7.2 ± 1.4 con sus respectivas medias y desviaciones estándar.

La media de ganancia de peso diario y el peso final en el grupo tratado fue significativamente mayor que en el grupo control al día 60 del experimento ($p < 0.05$).

Tabla 2: Resultado de parámetros productivos en tilapias suplementadas con A.E EMERALD® (N=34)

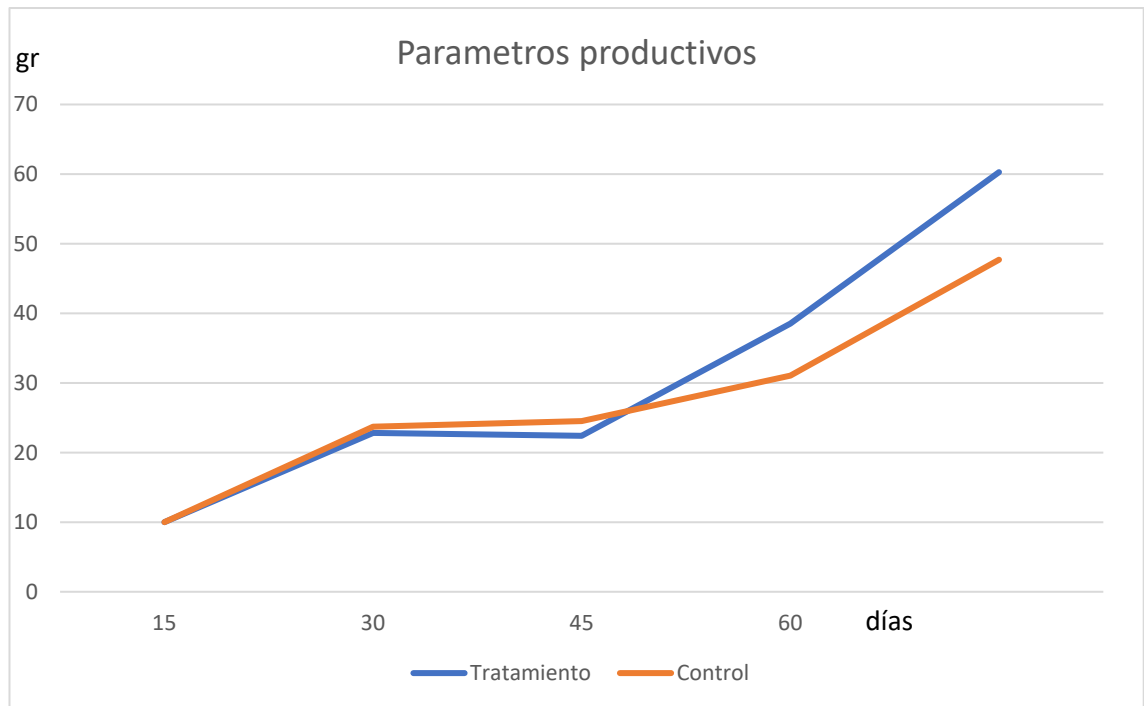
VARIABLE	DOSIS 1% (n=17)	CONTROL (n=17)
REC (%)	2.44 ± 0.08	2.22 ± 0.04
Peso final (gr)	$60.28 \pm 16.4^*$	47.7 ± 7.01
GDP (mg/d)	$718 \pm 50^*$	540 ± 10

Los datos representan la media \pm error estándar

*Se encontró diferencia estadística significativa

El gráfico muestra que la suplementación de A.E Emerald ® al 1% empieza a hacer efecto a partir del día 45 de administrarse en el grupo experimental observándose una tendencia en la media del peso total, finalizando con una mejora significativa en el día 60

Gráfico 3: Desarrollo del peso durante el periodo experimental(n=34)



Parámetros hematológicos

La media de recuento leucocitario en el grupo tratado fue significativamente mayor que en el grupo control ($p < 0.05$).

Tabla 3: Resultado de parámetros hematológicos en tilapias suplementadas con A.E Emerald® en el día 60(N=10)

VARIABLE	DOSIS 1%	CONTROL
	(n=5)	(n=5)
Hematocrito (%)	28.86 ± 3.8	27.43 ± 2.4
Hemoglobina (g/dL)	7.51 ± 0.36	7.76 ± 3.59
Eritrocitos (x 10⁶/μL)	1.8 ± 0.01	1.71 ± 0.01
VCM (fL)	121.22 ± 1.69	122.94 ± 1.21
CHCM (g/dL)	29.57 ± 0.32	29.65 ± 0.66
Leucocitos (x 10³/μL)	9.4 ± 0.01 *	5.1 ± 0.01

Los datos representan la media ± error estándar

*Se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Recuento de bacterias en contenido intestinal.

Tabla 4: Resultado de microbiota intestinal de unidades formadoras de colonias en tilapias suplementadas con A.E Emerald® (n=5)

VARIABLE	DOSIS 1% (n=5)	CONTROL (n=5)
UFC de agar GSP (x 10 ⁻⁶ /ml)	2.72	2.83
UFC de enterobacterias (x 10 ⁻⁶ /ml)	0.08	1.66
UFC de <i>Bacillus sp.</i> (x 10 ⁻⁶ /ml)	0.0005	0.0039

*GSP: Aeromonas, enterobacteriaceae

*Hektoen: Enterobacterias

*Bacillus: Bacterias del género bacillus

La siguiente tabla muestra el siguiente de identificación para las colonias aisladas previamente en la página de NCBI blast

Tabla 5: Porcentaje de identificación de cepas aisladas en tilapias suplementadas con A.E Emerald®

Cepas identificadas	Porcentaje de identificación (%)
<i>Ralstonia picketti</i>	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100
<i>B. megaterium</i>	100
<i>B. cereus</i>	100
<i>B. bombysepticus</i>	100

XI. DISCUSIÓN

Actualmente se reportan diversos estudios en los componentes del A.E. Emerald®, en los cuales se encuentran A.E de canela, orégano, clavo de olor y sus principales componentes activos. Sin embargo, la mayoría de dichos estudios no cuentan con la tecnología de microencapsulación para aumentar el efecto de estos aceites, o no cuentan con la combinación de estos, por ello, el objetivo del estudio fue analizar el efecto combinado de estos componentes, protegidos por microencapsulación.

Se realizó un análisis de CG-MS para determinar la concentración de componentes activos del A.E. Emerald® y verificar que los resultados del análisis concuerden con lo descrito por la posología del producto.

El mayor componente activo resultante del análisis fue el cinamaldehído en una concentración de 53.93%, lo que nos lleva a inferir que el principal A.E presente en el A.E. Emerald® es canela, debido a que el cinamaldehído se encuentra de manera normal en la canela como metabolito primario en un 90%. Este componente posee un amplio espectro antimicrobiano frente a *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (Shreaz *et al.*, 2016; Albano *et al.*, 2018), además de reportarse su efecto en bacterias multidrogaresistentes como *P. aeruginosa* (Utchariyakiat *et al.*, 2016) y en especies de *Bacillus* spp, evitando el proceso de división celular, a través de la inhibición de la proteína FtsZ (Doyle y Stephens, 2019). Asimismo, se reporta que el cinamaldehído tiene la capacidad de actuar sobre los receptores de serotonina en el tracto gastrointestinal de los peces, incrementando el tamaño de las vellosidades intestinales y cantidad de masa de enterocitos, mejorando la absorción intestinal (Greig *et al.*, 2019; Lieder *et al.*,

2020) por ende, el aumento en el peso final. Similar efecto fue reportado por Zhou *et al.*, 2020, quienes alimentaron con cinamaldehído a carpas (*Ctenopharyngodon idella*), comprobando un aumento de peso ligado a la promoción de transportadores de aminoácidos en enterocitos.

En segundo lugar, se encuentra el timol en una concentración de 24.22%, dicho componente posee un amplio espectro antimicrobiano en bacterias de importancia alimenticia como *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Listeria* y especies de *Bacillus* spp. (Marchese *et al.*, 2016). Sönmez *et al.*, 2015 reportan un aumento de peso al suplementar timol al 0.5 % a truchas (*O. mykiss*) de 13.3 ± 0.08 gr por 60 días, obteniendo una mejora en el peso final en comparación con el grupo control en 11.4%. Del mismo modo, Amer *et al.*, 2018 reportan que la suplementación de timol al 0.001% en tilapias de 10.2 ± 0.06 gr por 60 días, mejora el peso final en un 21,74%, siendo la concentración de timol similar a la de este estudio, la cual fue de 0.0036% (tabla 1).

Por último, se encuentra el carvacrol en una concentración de 18.73%, el cual posee actividad antimicrobiana contra bacterias drogoresistentes (Memar *et al.*, 2017) y posee un efecto en la mejora de los índices productivos. El carvacrol y el timol poseen un efecto en la disminución de bacterias gram negativas este efecto ha sido comentado por Helander *et al.*, 1998 y Núñez., 2011 quienes sugieren que estos componentes tienen un efecto en la modulación de la microbiota, específicamente en bacterias gram negativas, debido a que desintegran la membrana de estas bacterias y provocan la liberación de componentes asociados a la membrana al medio externo.

Se deduce que el segundo ingrediente activo sería el orégano, sin embargo, se observa una gran disparidad con respecto a lo encontrado en la literatura, que según Grul'ová *et al.*, 2020, la concentración de timol y carvacrol en el orégano, está cercana al 20% y 75%, respectivamente, esto podría ser explicado debido a que Baptista-Silva *et al.*, 2020, fundamenta que la composición de los aceites esenciales varía según composición del suelo, órgano de la planta, edad y ciclo vegetativo. Adicionalmente, se encuentra que el clavo de olor está en concentraciones mínimas, debido a que no se detectó eugenol.

La administración de estos tres componentes antes explicados, ha sido aprobada por la FDA para su uso en alimentos, siempre y cuando sigan las buenas prácticas de fabricación, en donde la cantidad agregada a los alimentos no exceda de forma razonable la cantidad requerida para lograr su efecto físico, nutricional u otro efecto previsto; además se especifica que dichos componentes deben manipularse como ingredientes alimentarios (FDA., 2020).

Se observa que la suplementación de A.E Emerald[®] al 1% aumento en la media del peso total, el día 60 de 20.74% (Gráfico 3), además de observarse diferencias significativas en el la media del ratio específico de crecimiento, peso final y ganancia de peso diario, con respecto al grupo control (Tabla 2). Adicionalmente, el aumento de la ganancia de peso, podría estar vinculado a la adición de una fuente de lípidos, con el aceite de palma. Tal como fue realizado por Ayisi *et al.*, 2017, quien suplementó aceite de palma al 6% en dietas de tilapias con un peso inicial 11 gr, obteniendo una mejora del 11.2 % en el peso final.

Es importante considerar que la suplementación de A.E. en la etapa juvenil, tiene un efecto en el desarrollo de las tilapias, debido a que las mejoras alcanzadas en el crecimiento, influyen directamente en etapas más avanzadas, facilitando un mayor crecimiento de los animales (Freccia *et al.*, 2014). Debido a que en otros estudios cuando se alimenta a peces de mayor edad, no existen mejoras significativas. Esto observaron Giannenas *et al.*, 2012 quienes suplementaron a truchas (*O. mykiss*) de 111.8 gr \pm 10.3 por 56 días con una dieta rica en carvacrol al 1.2 % y otra dieta rica en timol al 0.6%, no encontrando ninguna diferencia en el peso final, ni en la ganancia de peso final, a excepción de la reducción en el FCR. Ambas suplementaciones obtuvieron valores más bajos que el grupo control y de estas, el valor más bajo fue la dieta suplementada con timol.

Por el contrario, la suplementación de A.E, no tiene efecto en peces jóvenes, como es descrito por Aanyu *et al.*, 2020 quienes suplementaron timol al 0.075% a alevinos de tilapia de 1.54 gr por 63 días y no encontraron diferencias significativas en el peso final en el grupo experimental.

Respecto a los parámetros productivos se concluye que el producto Emerald® incrementa el peso final en un 20.74 %, el ratio específico de crecimiento en un 9.1 % y la ganancia de peso diario en un 24.8%, debido a que está siendo administrado a una edad adecuada, lo que permite mejorar la absorción de nutrientes, además de brindar un aporte lipídico que favorece la ganancia de peso.

En los parámetros hematológicos, no se observó diferencias significativas con respecto al grupo control, a excepción del recuento leucocitario, donde se registró un aumento en el grupo experimental (Tabla 3). El comportamiento en los valores

de GR y Hb, a excepción de los valores de LE, concuerdan por lo reportado en estas variables hematológicas por Mabrok y Wahdan., 2018 quienes alimentaron a tilapias Zilii (*Coptodon zillii*) de 180 ± 10.2 gr en un periodo de 15 días con A.E de orégano a una dosis de 1 g/Kg ⁻¹. Se ha propuesto que la suplementación con carvacrol, no podría tener un efecto por separado, dado que Volpatti *et al.*, 2013 no encontraron diferencias significativas en los niveles de lisozima plasmática en robalos (*Dicentrarchus labrax*) de 69.2 ± 0.22 gr suplementados por 8 semanas con carvacrol al 0.025%. Zheng *et al.*, 2009, encontraron una mejora en los índices productivos en *Ictalurus punctatus* de 50 gr a los 56 días suplementados con carvacrol al 0.0015%, sin embargo, no encontraron mejoras en los peces suplementados con concentraciones de timol al 0.0485%, o con la combinación de ambos compuestos, siendo la concentración de carvacrol en este estudio de 0.0028% (tabla 1)

Por otra parte, el aumento en los valores de LE, podría estar relacionado al aumento producido en el óxido nítrico, que previene la adhesión de leucocitos al endotelio, aumentando la concentración de estos en el flujo sanguíneo (Cerqueira y Yoshida., 2002), este aumento fue descrito por Giannenas *et al.*, 2012, en la suplementación de dietas enriquecidas de carvacrol en truchas.

Asimismo, el papel del óxido nítrico como indicador de daño a los tejidos (Ali, *et al.*, 2011) y su posible efecto negativo sobre el desarrollo muscular en las tilapias, no estaría relacionado, debido a que las suplementaciones de carvacrol, timol y cinamaldehído disminuyen los niveles de malondialdehído, indicador de ruptura oxidativa de membrana de lípidos (Giannenas *et al.*; 2012, Amer *et al.*, 2018). Por

último, el aumento de la serie blanca, también podría estar relacionado con una neutrofilia, tal como fue reportado por Hooth *et al* 2004, quien administró cinamaldehído por vía oral por 3 semanas a ratas a una dosis de 1300 mg/kg de peso vivo.

En base a estos resultados, se concluye, que el aceite esencial no proporciona mayor actividad en los peces, pero se sugiere que podría tener un efecto inmunoestimulador.

Debido a la cantidad de colonias encontradas y al propósito del estudio, se limitó a realizar el recuento de UFC a través de una diferenciación morfológica de los agregados celulares en placa, que pudiesen formar colonias en las placas de agar de acuerdo a lo recomendado por Fátima., 2015.

A pesar de que se encuentra una tendencia en la disminución de bacterias gram negativas a partir de contenido entérico y *Bacillus spp.* no se encontró una disminución parecida en las UFC de especies de Enterobacteriaceae (Tabla 4). En un estudio, Valladão *et al.*, 2019., reportaron que el recuento total de bacterias y *Bacillus spp.* no es afectado por la suplementación de A.E de carvacrol en tilapias, pero concluyeron que la ausencia de este efecto, era debido a que el A.E en su estudio no era microencapsulado, a diferencia de este experimento. Por lo que la microencapsulación, podría explicar esta tendencia a la disminución en las UFC afectadas.

Debido a que en el estudio no se observó la presencia de *Aeromonas spp.* en el agar GSP y además de que se quería tener una aproximación de las especies bacterianas encontradas, se seleccionaron colonias al azar y se realizó PCR 16 S, para obtener

una estimación de las bacterias encontradas en el estudio. Se obtuvo como resultado 2 potenciales especies probióticas, *B. megaterium* y *B. cereus* (Afrilasari *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020) y otra especie que era *B. bombysepticus* en el agar Bacillus Hicrome. Adicionalmente en el agar Hektoen y GSP se encontraron *P. stutzeri* y *R. picketti* respectivamente, siendo la primera bacteria, un patógeno en tilapias (Tabla 5).

Se observa que la adición de A.E Emerald ®, podría disminuir la proliferación de bacterias gram negativas, mejorando la cantidad de nutrientes disponibles para otros géneros bacterianos, sin embargo, todavía son necesarios estudios adicionales, por lo que se recomienda repetir el experimento en otras especies probióticas, como *Lactobacillus* spp. *Exiguobacterium*, *Myroides*, *Enterococcus* con el objetivo de observar un posible aumento de peso total y relacionarlo con este género bacteriano (Díaz *et al.*, 2017).

Respecto al análisis de UFC, no se encontró diferencia significativa en el conteo de enterobacteriaceae, pero sí se encontró tendencia a la disminución en el recuento de unidades formadoras de colonias de gram negativos a partir de contenido entérico y de *Bacillus* spp. en un 95 y 87% respectivamente.

Una de las limitantes encontradas por el estudio, fue que no se alcanzó una temperatura ideal de agua, propuesta por Qiang *et al.*, 2012, quienes elaboraron una relación óptima entre la temperatura de agua y el nivel dietario de proteínas siendo de 29.9 C°/40.3, contrario a la temperatura del agua y nivel de proteínas (Anexo 2) en este estudio de 21.3 ±3.2 C°/ 35% , por lo tanto, no se llegó a ver el máximo efecto del A.E Emerald ® sobre los peces, asimismo se debe mencionar que este

estudio contó con un número de muestra inferior que otras investigaciones, por lo se sugiere realizar estudios adicionales con un mayor número de individuos y con temperaturas diferentes.

Otra limitante de importancia que está presente en el estudio, es desconocer las especies presentes en las UFC de gram negativos a partir de contenido entérico, dado que existen diversas especies de enterobacterias relacionadas con patologías en tilapias tales como *E. tarda*, *S. marcescens*, *E. coli* entre otras (Alcaraz., 2010; Sala *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013). Si bien el estudio da una aproximación del efecto del A.E Emerald[®] en la disminución de gram negativos, no se conoce con certeza el género de enterobacterias patógenas en específico que estarían afectadas. Asimismo, la carga de *Bacillus* spp fue inferior en el grupo experimental, en comparación con el grupo tratamiento, por lo que se recomiendan futuros estudios relacionados en determinar la comunidad microbiana a través de estudios en metagenómica. Estos estudios, podrían confirmar el establecimiento de una comunidad probiótica que esté detrás del aumento de peso en los peces.

Con respecto a las limitantes encontradas en el tamaño muestral, en las unidades formadoras de colonias, no se logró encontrar diferencia significativa entre el grupo control y tratamiento, sin embargo, se logró ver una tendencia al aumento en la media, por ello se sugiere repetir el estudio con un mayor nivel de confianza. Asimismo, es importante mencionar que, para la determinación de número de muestras, para los parámetros microbiológicos y hematológicos, se usó un valor previo establecido por Wigraiboon *et al.*, 2016, en donde se eligió el valor que tenía la mayor variación, las unidades formadoras de colonias. Si bien fue posible observar diferencias significativas en los parámetros hematológicos, no se observó

diferencias significativas en las UFC, debido al elevado porcentaje de cambio entre el grupo experimental y grupo control (Tabla 4).

Para la toma de muestra de parámetros productivos, se tomó en cuenta el valor establecido por Wigraboon *et al.*, 2016. Sin embargo, dado que el recojo de muestras de estos parámetros, cuenta con una mayor facilidad de manejo, a diferencia de los parámetros microbiológicos y hematológicos, se recomienda al menos seguir un número de muestra de al menos 30 animales según el teorema de límite central, para que los datos sigan una distribución normal y considerar una mayor validación de estos resultados para aumentar la confiabilidad del estudio (Canal, 2006).

Basándose en estos resultados, se recalca que uno de los principales aportes del estudio, radica en la generación de información relacionada para la toma de muestra de aceites esenciales, especialmente en la toma de muestra de parámetros microbiológicos, por el elevado porcentaje de cambio presentado en la media, por lo tanto, esta investigación, reforzará futuros estudios en aceites esenciales.

Dado que el peso final en los peces suplementados fue significativamente mayor. En una producción normal, se estima que los peces suplementados con A.E Emerald[®], alcanzarían un peso comercial en un menor tiempo, por lo que el costo alimenticio, el cual representa un 40–50% en las producciones acuícolas (Prabu *et al.*, 2019) disminuiría, por lo tanto, habría un mayor retorno económico y permitiría una mayor reinversión en los productores que usen A.E Emerald[®]. Esta disminución en el costo alimenticio al usar A.E, fue demostrada por Seden y Ahmad, 2009, quienes al suplementar A.E. al 1% de *Origanum Vulgare*, lograron disminuir el

costo alimenticio en un 29.72 %. Sin embargo, debe considerarse que las tilapias incluidas en este estudio no alcanzaron un peso comercial (300 gr) y no eran aptas para la venta, por lo tanto, se recomienda repetir el estudio, hasta que las tilapias alcancen el peso deseado para el mercado para poder afirmar estos resultados, debido a que la ganancia del porcentaje de ganancia de peso, podría variar en distintas etapas dentro del ciclo productivo.

Por otro lado, la aplicación del A.E. Emerald® en conjunto con otras medidas de bioseguridad, disminuirían los costos que supone controlar una infección, los cuales son la mortalidad, el tratamiento y el crecimiento estancado de las tilapias (Prabu *et al.*, 2019, Wan *et al.*, 2021). Asimismo, se ha demostrado que el uso de A.E como inmunoestimuladores trae ventajas económicas frente a otros productos, como probióticos, que suelen costar un 33% más y suelen tener una menor duración con respecto al efecto inmunoestimulante (Aly., 2013).

Además del aspecto económico, el uso de A.E. también puede tener ventajas en el área de marketing, debido a que la demanda actual de la sociedad está enfocada en la seguridad alimentaria y una producción acuícola sustentable (Hernández-Contreras y Hernández., 2020).

Este estudio resalta el potencial de una formulación de aceites esenciales para mejorar el manejo productivo en tilapias, debido a que el microencapsulado de los componentes de orégano y canela, mejora su estabilidad, permitiendo una apropiada entrega de estos componentes activos al intestino posterior y potenciando su efecto en la ganancia de peso, modulación microbiana e inmodulación, de modo

que, estos resultados refuerzan la posibilidad de realizar investigaciones en nuevos suplementos naturales, como aceites esenciales o formas de conservación de estos.

Es así, que el estudio en cuestión confirma el efecto del A.E. de cinamaldehído, carvacrol y timol de dichas investigaciones, sin embargo, es discutible si los componentes activos del A.E. Emerald®, tienen un efecto sinérgico o aditivo, debido a que no se realizó la comparación de dichas sustancias microencapsuladas por separado. Se recomienda realizar investigaciones adicionales, para comprobar el efecto aditivo o sinérgico de este aceites esenciales.

La información presentada en este estudio, dio una visión potencial del uso del A.E Emerald ® en la especie *O. niloticus* sobre la suplementación para la mejora de los parámetros productivos, además de su potencial para disminuir la presentación de posibles patógenos en tilapia, contribuyendo en investigaciones relacionadas para la disminución del uso de antibióticos de forma profiláctica en la acuicultura.

XII. CONCLUSIONES

- El efecto del compuesto Emerald[®] al 1% incrementa el peso final de los peces en un 20.74 %, el ratio específico de crecimiento en un 9.1 % y la ganancia de peso diario en un 24.8% en el día 60 del experimento.
- El efecto del compuesto Emerald[®] al 1% puede afectar el recuento leucocitario de los peces aumentando en un 45.7% sin afectar el recuento eritrocitario y hematocrito.
- El A.E Emerald[®] al 1% disminuye el recuento de UFC de gram negativos a partir de contenido entérico y de *Bacillus* spp. en un 95% y 87% respectivamente.

XIII. RECOMENDACIONES

- Repetir el estudio suministrando el A.E Emerald® hasta que las tilapias alcancen el peso comercial deseado.
- Repetir el estudio con una relación de temperatura en el agua de cultivo y nivel de proteína adecuados.
- Realizar un estudio de metagenómica de la totalidad de la comunidad microbiana en el intestino de tilapia o de PCR en tiempo real con respecto a las unidades formadoras de colonias, de los principales géneros de interés, *Aeromonas sp.* y *Bacillus sp.*

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Aanyu, M., 2016. Effects of phytogetic compounds on growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thesis submitted for the degree of doctor of philosophy. Institute of Aquaculture, School of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling, Escocia, Reino Unido.
2. Aanyu, M., Betancor, M. B., y Monroig, Ó. 2020. The effects of combined phytogetics on growth and nutritional physiology of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 734867.
3. Abbas, S.A.; Elseid, A.G. y Ahmed, M.K.A. 2010. Effect of body weight uniformity on the productivity of broiler breeder hens. Int. J. Poult. Sci. 9, 225–230
4. Abdel-Latif, H. M., y Sedeek, E. K. 2017. Diversity of Enterobacteriaceae retrieved from diseased cultured *Oreochromis niloticus*. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 5(1), 29-34.
5. Abdelhamid M, A., Refaey M, Salem, F., y El-Kattan, M. 2019. Factors Affecting Fish Blood Profile: B-Effect of Environmental and Genetic Factors. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 23(2), 443-459.
6. AbdManaf, M., Jai, J., Raslan, R., Subuki, I., y Mustapa, A. N. 2015. Microencapsulation methods of volatile essential oils-a review. In Advanced Materials Research (Vol. 1113, pp. 679-683). Trans Tech Publications Ltd.
7. Absalan, A., Mesbah-Namin, S. A., Tiraihi, T., y Taheri, T. 2016. The effects of cinnamaldehyde and eugenol on human adipose-derived mesenchymal stem cells viability, growth and differentiation: a cheminformatics and in vitro study. Avicenna journal of phytomedicine, 6(6), 643.

8. Afrilasari, W., y Meryandini, A. 2016. Effect of probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the population of intestinal microflora, digestive enzyme activity and the growth of catfish (*Clarias sp.*). HAYATI Journal of Biosciences, 23(4), 168-172.
9. Alagawany, M., El-Hack, M. A., Farag, M. R., Tiwari, R., y Dhama, K. 2015. Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health-a review. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 3(2s), 73-84.
10. Albano, M., Crulhas, B. P., Alves, F. C. B., Pereira, A. F. M., Andrade, B. F. M. T., Barbosa, L. N., ... y Júnior, A. F. 2019. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. Microbial pathogenesis, 126, 231-238.
11. Alcaraz, J. 2010. Caracterización e identificación fenotípica, molecular y patogénica de bacterias aisladas de tilapias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Sinaloa. Tesis de maestría en ciencias. Centro De Investigación en Alimentación Y Desarrollo A.C Sinaloa, México.
12. Ali, E. H., Hashem, M., y Al-Salahy, M. B. 2011. Pathogenicity and oxidative stress in Nile tilapia caused by *Aphanomyces laevis* and *Phoma herbarum* isolated from farmed fish. Diseases of aquatic organisms, 94(1), 17-28.
13. Alohan, F. I., Erhunmwunse, N. O., Ainerua, M. O., y Ewere, E. E. 2014. Haematological indices in fish plasma as indicators of exposure to a commonly used herbicides. Aust. J. Basic & Appl. Sci, 8(6), 245-250.
14. Aly, S. M., Nouh, W. G., y Salem-Bekhit, M. M. 2012. Bacteriological and histopathological studies on Enterobacteriaceae in Nile Tilapia, *Oreochromis*

- niloticus. *J Pharm Biomed Sci*, 2, 94-104.
15. Aly, S.M., 2013. A Review of Fish Diseases in the Egyptian Aquaculture Sector: Working Report. WorldFish, Penang, Malaysia
 16. Aly, S. M., Albutti, A. S., Rahmani, A. H., y Atti, N. M. 2015. The response of New-season Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(3), 4508–4514.
 17. Aly, S. M., Kahlil, W., y Ghaleb, S. 2020. Histopathological and Hematological studies on the effect of Cephalosporin in Treatment of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Suez Canal Veterinary Medical Journal. SCVMJ*, 25(1), 115-128.
 18. Amal MNA, Koh CB, Nurliyana M, Suhaiba M, Nor-Amalina Z, Santha S. *et al.* 2018. A case of natural co-infection of tilapia lake virus and *Aeromonas veronii* a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. *Aquaculture* 485:12–1
 19. Amer, S. A., Metwally, A. E., y Ahmed, S. 2018. The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), 251-256.
 20. Apún J. 2007. Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758), cultivada en el laboratorio. Tesis de maestría para obtener el grado de maestría en recursos naturales y medio ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa Mexico

21. Araújo E, Barbas L, Ishikawa M, Dias D, Sussel R., Almeida L, y Tachibana L. (2017). Prebiotic, probiotic, and synbiotic in the diet of Nile tilapia post-larvae during the sex reversal phase. *Aquaculture International* 26: 85–97.
22. Arteaga J., Gonzáles L., López R., Mogrovejo L. 2017. Planeamiento Estratégico para la Industria Acuicultura. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Católica Del Perú. Lima. Perú.
23. [AVMA] American Veterinary Medical Association. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. [Acceso 12 Dic. 2019]. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Polices/Documents/euthanasia.pdf>
24. Austin B, y Austin D. 2012. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, 5th edn. Springer, Dordrecht, Netherlands
25. Ayisi, C. L., Zhao, J., y Rupia, E. J. 2017. Growth performance, feed utilization, body and fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing elevated levels of palm oil. *Aquaculture and Fisheries*, 2(2), 67-77.
26. Baltazar, P. M. 2007. La Tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. *Revista peruana de biología*, 13(3), 267-273.
27. Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., y Sarmiento, B. 2020. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 1-17.
28. Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., y Liang, L. 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 143-182.
29. Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J. H.,

- ... y Tagami, H. 2005. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients: The RIFM expert panel. *Food and chemical toxicology*, 43(6), 799-836.
30. Bioservice. 2019. Instructivo LBM IN- Bioservice, 98. Lima. Perú.
31. Bosisio, F., Rezende, K. F. O., y Barbieri, E. 2017. Alterations in the hematological parameters of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different salinities. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 12(2), 146-154.
32. Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
33. Canal, N. 2006. Distribuciones de probabilidad. El teorema central del límite, En Guillen, A. y Crespo, M. eds. *Métodos Estadísticos para enfermería nefrológica*. (pp.107-120). Madrid: Sociedad Española de Enfermería Nefrológica.
34. Cerqueira, N. F. Yoshida, W. B. 2002. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17(6), 417-423.
35. [GGA] Aquaculture Facility Certification BAP Farm Standard Best Aquaculture Practices Certification Standards, Implementation Guidelines. 2020 [Acceso 19 Oct. 2020] Disponible en <https://www.aqua.cl/wp-content/uploads/2020/07/encontrar-aqu%C3%AD.pdf>
36. Cama R. 2017. Estudio de factibilidad para la producción de tilapia mediante la diversificación del uso del Agua. Tesis de Ingeniería industrial. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa. Perú

37. Chan, X. Y. *et al.* 2013. Insights of biosurfactant producing *Serratia marcescens* strain W2. 3 isolated from diseased tilapia fish: a draft genome analysis. *Gut Pathogens* 5, 29.
38. Chauhan, A., y Singh, R. 2019. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, 77(2), 99-113.
39. Dal'Bó, G. A., Sampaio, F. G., Losekann, M. E., Queiroz, J. F. D., Luiz, A. J. B., Wolf, V. H. G., ... y Carra, M. L. 2015. Hematological and morphometric blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish. *Neotropical Ichthyology* 13(2): 439-446
40. Derwa, H., Abd El Wahab, M., y Kamal, K. 2017. Role of some biological pollutants in relation to disease occurrence in *Oreochromis Niloticus*. *Suez Canal Veterinary Medical Journal. SCVMJ*, 22(2), 247-257.
41. Díaz, L. M. V., y Rodríguez, D. E. 2017. Enterococcus, Myroides y Exiguobacterium: Géneros bacterianos con potencial probiótico para el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Biológica Colombiana*, 22(3), 331-339.
42. Done, H.Y., Venkatesan, A. K., y Halden, R. U. 2015. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *The AAPS journal*, 17(3), 513-524.
43. Doroteo, A. M., Pedroso, F. L., Lopez, J. D. M., y Apines-Amar, M. J. S. 2018. Evaluation of potential probiotics isolated from saline tilapia in shrimp aquaculture. *Aquaculture International*, 26(4), 1095–1107. doi:10.1007/s10499-018-0270-2
44. Doyle, A. A., y Stephens, J. C. 2019. A review of cinnamaldehyde and its

- derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405.
45. Dugan L., Leech L., Speroni K.G., Corriher J. 2005. Factors Affecting Hemolysis Rates in Blood Samples Drawn From Newly Placed IV Site in the Emergency Department. *J Emerg Nurs* Vol 31. Pp 338-345.
 46. Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308–323. doi:10.1002/ptr.2072
 47. El-Bahar, H. M., Ali, N. G., Aboyadak, I. M., Khalil, S. A. E. S., y Ibrahim, M. S. 2019. Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*. *International Microbiology*, 22(4), 479-490.
 48. El-Houseiny, W., Khalil, A. A., y Mowafy, R. E. 2015. Immunological and pathological studies on (*Oreochromis niloticus*) fed on cinnamon and ox tetracycline in diet and challenged with *Clostridium perfringens*. *Abbassa Int. J. Aqua*, 8(1), 1-19.
 49. Espinosa-Chaurand, D., Aparicio-Simón, B., Cortés-Sánchez, A. D. J., Garza-Torres, R., García-Morales, R., y Maeda-Martínez, A. N. 2019. The productive assessment of two tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) commercial strains in Sinaloa Mexico. *Latin american journal of aquatic research*, 47(3), 440-448.
 50. Ezzat Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., ... y Adel, M. 2016. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 365-382.
 51. [FAO] Transporte de peces vivos. Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura. 1998. [Acceso 3 Marz. 2020] Disponible en

http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6709s/x6709s14.htm#top

52. [FDA] Electronic Code of Federal Regulations (eCFR). Part 182 – Substances Generally Recognized as Safe, Section 182.20 – Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Título 21, Volumen [Acceso 20 Dic. 2020]. Disponible en https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=&SID=c41d86201f066ba0d283f67f12aabf1d&mc=true&n=pt21.3.182&r=PART&ty=HTML#se21.3.182_120
53. Freccia, A., Sousa, S.M, Meurer, F., Butzge, A. J., Mewes, J. K., y Bombardelli, R. A. 2014. Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(1), 1-7.
54. Frierson, E. W., y Foltz, J. W. 1992. Comparison and Estimation of Absorptive Intestinal Surface Areas in Two Species of Cichlid Fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 121(4), 517–523.
55. Gaber, M. 2000. Growth response of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different levels of clove oil. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 4(1), 1-18.
56. Galagarza, O.A., Smith, S. A., Drahos, D. J., Eifert, J. D., Williams, R. C., y Kuhn, D. D. 2018. Modulation of innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary supplementation of *Bacillus subtilis* endospores. *Fish & shellfish immunology*, 83, 171-179.
57. Ghazy, H. A., El-Nahas, A. F., Mahmoud, S. A., Fahmy, H. A., El-Domany, R. A., Mahmoud, H. E., y Omar, A. A. 2020. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* ghost and evaluation of its immune proficiency in Nile tilapia

- (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International*, 28(6), 2517-2529.
58. GLOBEFISH. 2015. Analysis and information on world fish trade. Tilapia - September 2015. Food and Agriculture Organization (FAO). www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/336900/. Reviewed: 25 June 2018.
59. Geraylou, Z., Vanhove, M. P., Souffreau, C., Rurangwa, E., Buyse, J., y Ollevier, F. 2014. In vitro selection and characterization of putative probiotics isolated from the gut of *Acipenser baerii* (Brandt, 1869). *Aquaculture Research*, 45: 341-352.
60. Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., y Karagouni, E. 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350-353, 26–32.
61. Ghosh, B., Nowak, B.F. y Bridle, A.R. 2015. Alginate Microencapsulation for Oral Immunisation of Finfish: Release Characteristics, Ex Vivo Intestinal Uptake and In Vivo Administration in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Mar Biotechnol* 17: 841
62. Ghosh, K., Sen, S. K., y Ray, A. K. 2002. Characterization of Bacilli isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. *Journal of Applied Aquaculture*, 12(3), 33-42
63. Gopalakannan, A., y Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*,

255(1-4), 179-187.

64. Goyal, R., Dhingra, H., Bajpai, P., y Joshi, N. 2012. Characterization of the *Lactobacillus* isolated from different curd samples. *African Journal of Biotechnology*, 11(79), 14448-14452.
65. Grajales-Hahn, S.; Hahn-Von C. y Grajales-Quintero, 2018 A. REPORTE DE CASO DE *Aeromonas salmonicida* EN TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) EN CALDAS, COLOMBIA. Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas. 22: 76-85.
66. Greig, C. J., Zhang, L., y Cowles, R. A. 2019. Potentiated serotonin signaling in serotonin re-uptake transporter knockout mice increases enterocyte mass and small intestinal absorptive function. *Physiological reports*, 7(21), e14278.
67. Grilli, E., Messina, M. R., Tedeschi, M., y Piva, A. 2010. Feeding a microencapsulated blend of organic acids and nature identical compounds to weaning pigs improved growth performance and intestinal metabolism. *Livestock science*, 133(1-3), 173-175.
68. Grul'ová, D., Caputo, L., Elshafie, H. S., Baranová, B., De Martino, L., Sedlák, V., ... y De Feo, V. (2020). Thymol Chemotype *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Selective Bio-Based Herbicide on Monocot Plant Species. *Molecules*, 25(3), 595.
69. Guo, T. Y., He, J. Y., Liao, S. Y., Xie, J. J., Xie, S. W., Masagounder, K., y Niu, J. 2020. Dietary dl-methionyl-dl-methionine supplementation increased growth performance, antioxidant ability, the content of essential amino acids and improved the diversity of intestinal microbiota in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *British Journal of Nutrition*, 123(1), 72-83.

70. Hal, A. M., y Manal, I. 2020. Gene expression and histopathological changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Aquaculture*, 526, 735392.
71. Hallali, E., Kokou, F., Chourasia, T. K., Nitzan, T., Con, P., Harpaz, S., y Cnaani, A. (2018). Dietary salt levels affect digestibility, intestinal gene expression, and the microbiome, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PloS one*, 13(8).
72. Harikrishnan, R., y Balasundaram, C. 2005. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Reviews in Fisheries Science*, 13(4), 281-320.
73. Hassaan, M. S., Soltan, M. A., Jarmolowicz, S., y Abdo, H. S. 2017. Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 24, 83–93.
74. Hassan, S., Abdel-Rahman, M., Mansour, E. S., y Monir, W. 2020. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Pathogens Implicating the Mortality of Cultured Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal for Aquaculture*, 10(1), 23-43.
75. Hastein, T., Scarfe, A.D., y Lund, V.L. 2005. Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 24(2), 529.
76. He, S., Ran, C., Qin, C., Li, S., Zhang, H., De Vos, W. M., ... y Zhou, Z. 2017. Anti-infective effect of adhesive probiotic *Lactobacillus* in fish is correlated with their spatial distribution in the intestinal tissue. *Scientific reports*, 7(1), 1-

- 12.
77. Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Wright, A.v., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gramnegative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590–3595.
78. Hemarajata, P., y Versalovic, J. 2013. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(1), 39-51.
79. Hernández-Contreras, Á., & Hernández, M. D. (2020). Application of aromatic plants and their extracts in aquaculture. In *Feed Additives* (pp. 239-259). Academic Press.
80. Hooth, M. J., Sills, R. C., Burka, L. T., Haseman, J. K., Witt, K. L., Orzech, D. P., ... y Bucher, J. R. 2004. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated trans-cinnamaldehyde in rats and mice. *Food and chemical Toxicology*, 42(11), 1757-1768.
81. Hossain, M. I., Neela, F. A., Hussain, M. A., Rahman, M. H., y Suzuki, S. (2006). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in Swamps and it's Infection to *Oreochromis niloticus*. *Journal of Bio-Science*, 14, 77-81.
82. IGUSOL ADVANCE S.A. (S/F). Emerald, activador de la salud y crecimiento. [Folleto]. La Rioja, España: IGUSOL ADVANCE S.A.
83. Ismail, M., y El Lamei, M. 2017. Studies on *Pseudomonas* Septicemia in Some Tilapia in Ismailia. *Suez Canal Veterinary Medical Journal. SCVMJ*, 22(1), 107-117.
84. Javed, M., Ahmad, I., Ahmad, A., Usmani, N., y Ahmad, M. 2016. Studies on the alterations in haematological indices, micronuclei induction and

- pathological marker enzyme activities in *Channa punctatus* (spotted snakehead) perciformes, channidae exposed to thermal power plant effluent. *SpringerPlus*, 5(1), 1-9.
85. Jenner, P. M., Hagan, E. C., Taylor, J. M., Cook, E. L., Fitzhugh, O. G. 1964. Research section Food flavourings and compounds of related structure I Acute oral toxicity. *Food Cosmet Toxicol*, 2, 327-343.
86. Jimoh, W. A., Sulyman, T., y Taiwo, A. D. 2019. Microbial load and diversity in the gastro-intestinal tract of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and hybrid catfish (*Clarias gariepinus*♀ x *Heterobranchus bidorsalis*♂) in Ilorin Ilorin Metropolis, Nigeria. *International Journal of Aquatic Biology*, 7(5), 271-279.
87. Kang, C. H., Shin, Y., Kim, Y., y So, J. S. 2016. Isolation of *Lactobacillus* strains from shellfish for their potential use as probiotics. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 21(1), 46-52.
88. Kim, N. Y., Trinh, N. T., Ahn, S. G., y Kim, S. A. 2020. Cinnamaldehyde protects against oxidative stress and inhibits the TNF- α -induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(1), 449-457.
89. Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., y Tyler, C. R. 2020. Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
90. Kostrzewa, T., Przychodzen, P., Gorska-Ponikowska, M., y Kuban-Jankowska, A. 2019. Curcumin and Cinnamaldehyde as PTP1B Inhibitors With Antidiabetic and Anticancer Potential. *Anticancer research*, 39(2), 745-749.

91. Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., y Palleroni, N. J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2), 510-547.
92. Lee, A. R., Niu, K. M., Kang, S. K., Han, S. G., Lee, B. J., & Kim, S. K. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of *Lactobacillus*-fermented *Artemisia annua* L. as a potential fish feed additive. *Journal of Life Science*, 27(6), 652-660.
93. Lewis, SM, Bain BJ, Bates I. Hematología práctica de Dacie y Lewis. 10ª. Porto Alegre: Artmed, 2008.
94. Fátima, L. 2015. Comparación de métodos de siembra en análisis microbiológico de pescado Tesis de Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias. Universidad Pública de Navarra. Navarra, España.
95. Lieder, B., Hoi, J., Burian, N., Hans, J., Holik, A. K., Beltran Marquez, L. R., ... y Somoza, V. (2020). Structure-Dependent Effects of Cinnamaldehyde Derivatives on TRPA1-Induced Serotonin Release in Human Intestinal Cell Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(13), 3924-3932.
96. Lin, P., Cheng, T., Jin, S., Wu, Y., Fu, B., Long, R., ... y Xia, Q. 2015. PC, a novel oral insecticidal toxin from *Bacillus bombysepticus* involved in host lethality via APN and BtR-175. *Scientific reports*, 5(1), 1-14.
97. Liu, Y., Song, Z., Zeng, H., Lu, M., Zhu, W., Wang, X., ... y Zhang, Q. 2021. *Pseudomonas eucalypticola* sp. nov., a producer of antifungal agents isolated from *Eucalyptus dunnii* leaves. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
98. Mabrok, M. A. E., y Wahdan, A. 2018. The immune modulatory effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on *Tilapia zillii* following intraperitoneal infection with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture International*,

- 26(4), 1147-1160.
99. Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... y Nabavi, S. M. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 210, 402-414.
100. Marchese, A., Arciola, C. R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., ... y Daglia, M. 2018. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*, 34(6), 630-656.
101. Martínez-Silvestre A, Lavín S, Cuenca R. 2011. Hematología y citología sanguínea en reptiles. 31:131-141. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales* 2011, 31:131-141.
102. Mateen, S., Rehman, M. T., Shahzad, S., Naeem, S. S., Faizy, A. F., Khan, A. Q., ... y Moin, S. 2019. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *European journal of pharmacology*, 852, 14-24.
103. Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A., y Kafil, H. S. 2017. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 28(2), 63-68.
104. Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N., Fremaut, D., Maene, P., y De Smet, S. 2008. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2371-2381.
105. Miranda AM, Barreto RE, Speit G, Valenzuela VA, Volpato GL, Favero DM. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet

- assay results. *Mutat Res.* 534 (1–2):165–72.
106. Mishra, P., Mohanty, S., Samanta, M., y Rath, C. 2012. Reestablishment of Cellulase-Producing Bacteria in the Intestine of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Dynamic Biochemistry, Process. Biotechnology and Molecular Biology.* 6: 102-108
107. Moraes G. ,2018, Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota. Tese apresentada ao programa de pósgraduação do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista.
108. Nuñez M. 2011. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias- Microbiología Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia
109. Ochoa L, Campoverde M y Santacruz-Reyes R. 2017. Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *AquaTIC* 49 :1-7.
110. Okamura D., Araújo, Guedes de Araujo F., Vieira P., Freitas, Fonseca R., Solis M., y Pinto M. 2010. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(5), 971-976.
111. Osman, K. M., da Silva Pires, Á., Franco, O. L., Saad, A., Hamed, M., Naim, H., ... y Elbehiry, A. 2021. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as an aquatic vector for *Pseudomonas* species of medical importance: Antibiotic Resistance

- Association with Biofilm Formation, Quorum Sensing and Virulence. *Aquaculture*, 532, 736068.
112. Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCready, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., ... y Bassler, B. L. 2017. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064-4076.
113. Pakingking R., Palma, P., y Usero, R. (2020). *Aeromonas* load and species composition in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. *Aquaculture Research*, 51(11), 4736-4747.
114. Patel, A. K., Deshattiwar, M. K., Chaudhari, B. L., & Chincholkar, S. B. (2009). Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. *Bioresource technology*, 100(1), 368-373.
115. Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Balcázar J. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends Microbiol* 26:896–903.
116. Pourmortazavi, SM, y Hajimirsadeghi, SS. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163(1-2), 2-24.
117. Prabu, E., Rajagopalsamy, CB., Ahilan, B., Jeevagan, I. J., y Renuhadevi, M. 2019. Tilapia—an excellent candidate species for world aquaculture: a review. *Annual Research & Review in Biology*, 1-14.
118. [PRODUCE] Ministerio de la Producción, 2017. El cultivo de Tilapia y su desarrollo en el Perú. Disponible en:

http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf Fecha de acceso:
25 de diciembre 2019.

119. Qiang, J., Yang, H., Wang, H., Kpundeh, M. D., y Xu, P. 2012. Growth and IGF-I response of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to changes in water temperature and dietary protein level. *Journal of Thermal Biology*, 37(8), 686-695.
120. Razmgah N, Mojgani N, y Torshizi M. 2016. Probiotic Potential and Virulence Traits of Bacillus and Lactobacillus Species Isolated from Local Honey Sample in Iran. *IOSR. J. Pharm. Biol. Sci* 11:87-95.
121. Ren P, Xu L, Yang Y, He S, Liu W, Ringø E, Zhou Z. 2013. *Lactobacillus planarum subsp. plantarum* JCM 1149 vs. *Aeromonas hydrophila* NJ-1 in the anterior intestine and posterior intestine of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂: An ex vivo study. *Fish Shellfish Immun.* 35:146-153.
122. Ren, Z., Cai, Y., Wang, S., Liu, S., Li, A., Xiong, Y., ... y Zhou, Y. 2019. First case of *Aeromonas schubertii* infection in brackish water wild Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. *Aquaculture*, 501, 247-254.
123. Rodríguez, J. M. F., y Hernández, J. A. P. 1998. Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinaria México*, 29(1), 117-119.
124. Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., ... Sharifi-Rad, J. 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*. doi:10.1002/ptr.6109

125. Salvador R, Moraes J, Moraes F., 2014. Hemoparasite and hematological parameters in Nile tilapia. *Comp. Clin. Path.*, 23(2), 437-441.
126. Saranya, SR., y Sudhakaran, R. 2020. Report on prevalence of tilapia lake virus infection in tilapia fishes (*Oreochromis niloticus*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101665.
127. Seden, M. E. A., Abbass, F. E., y Ahmad, M. H. (2009). Effect of origanum vulgare as a feed additive on growth performance, feed utilization and whole body composition of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Animal and Poultry Production*, 34(3), 1683-1695.
128. Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., ... Hun, L. T. 2016. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116–131.
129. Silva, N.C., y Fernandes J.A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous Animals and Toxins including tropical diseases*, 16(3), 402-413.
130. Sönmez, A. Y., Bilen, S., Albayrak, M., Yılmaz, S., Biswas, G., Hisar, O., y Yanık, T. (2015). Effects of dietary supplementation of herbal oils containing 1, 8-cineole, carvacrol or pulegone on growth performance, survival, fatty acid composition, and liver and kidney histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings.
131. Sookchaiyaporn, N., Srisapoome, P., Unajak, S., y Areechon, N. 2020. Efficacy of *Bacillus* spp. isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. on its growth and immunity, and control of pathogenic bacteria. *Fisheries*

Science, 1-13.

132. Sosa, B. D. S., Moro, E. B., Gomes, R. L. M., Cardoso, M. D. S., Cardoso, L. M., Boscolo, W. R., ... y Bittencourt, F. 2020. Essential oils in diets for Nile tilapia juveniles: Productive performance and plasmatic biochemistry. *Aquaculture Research*, 51(7), 2758-2765.
133. Souza, C., Baldissera, M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B., Martos-Sitcha, J. A., y Mancera, J. M. 2019. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. *Frontiers in physiology*, 10, 785.
134. Stojanović, N. M., Stevanović, M., Randjelović, P., Mitić, K., Petrović, V., Sokolović, D., ... y Radulović, N. S. 2019. Low dose of carvacrol prevents rat pancreas tissue damage after L-arginine application, while higher doses cause pancreatic tissue impairment. *Food and chemical toxicology*, 128, 280-285.
135. Tavares-Dias, M. 2006, A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish. Biol.*, 68: 1822-1833.
136. Tavares-Dias, M. 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*, 31, 13.
137. Turek, C., y Stintzing, FC. 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53.
138. Utcharyiakiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P., y Chomnawang, M. T. 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 158.

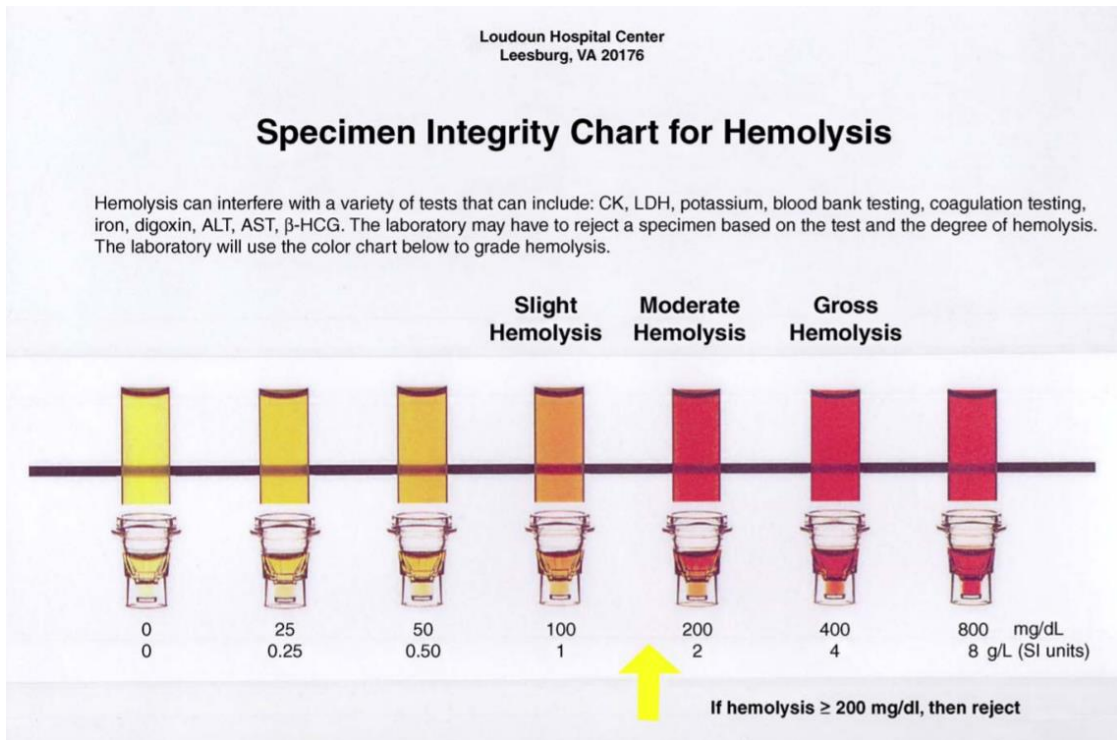
139. Ümit A., Osman S., Sevdan Y., Nejdet G., Ali T., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*, *Aquaculture*. 437: 282-286.
140. Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Kotzent, S., Assane, I. M., y Pilarski, F. 2019. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquaculture International*, 27(2), 399-411.
141. Varshney, A., Das, M., Chaudhary, P., Kumari, R., y Yadav, K. 2017. *Aeromonas Salmonicida* as a causative agent for postoperative endophthalmitis. *Middle East African journal of ophthalmology*. 24(4): 213.
142. Vaseeharan B y Thaya R. 2014 Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquacult Int.*, 22: 1079-1091.
143. Veiga, RD., Aparecida DS., Corso, MP., y Canan, C. 2019. Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 1–17. doi:10.1080/10412905.2019.1612788
144. Wan, W. A. A. Q. I., Taufek, N. M., Thiran, J. P., Rahman, J. F. P., Yerima, G., Subramaniam, K., y Rowan, N. 2021. Investigations on the use of exopolysaccharide derived from mycelial extract of *Ganoderma lucidum* as functional feed ingredient for a
145. Wang, M., Yi, M., Lu, M., Gao, F., Liu, Z., Huang, Q., ... y Zhu, D. 2020. Effects of probiotics *Bacillus cereus* NY5 and *Alcaligenes faecalis* Y311 used as water additives on the microbiota and immune enzyme activities in three

- mucosal tissues in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in outdoor tanks. *Aquaculture Reports*, 17, 100309.
146. Wei, Q. Y., Xiong, J. J., Jiang, H., Zhang, C., y Ye, W. 2011. The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. *International journal of food microbiology*, 150(2-3), 164-170.
147. Wheeler D, Bhagwat M. BLAST QuickStart: Example-Driven Web-Based BLAST Tutorial. In: Bergman NH, editor. *Comparative Genomics: Volumes 1 and 2*. Totowa (NJ): Humana Press; 2007. Chapter 9.
148. Widanarni y Tanbiyaskur. Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for the control of streptococcosis in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pak J Biol Sci* 2015; 18(2): 59-66. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2015.59.66>
149. Wigraiboon S, Nomura N, Whangchai N, 2016. Effect of essential oils from *Houttuynia cordata* Thunb supplemented diets on growth performance and immune response of Hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* Linn. × *Oreochromis niloticus* Linn.) *Int. J. Fish. Aquat. Stud.*, 4: 677.
150. Wilhelm FD., Eble, GJ., Kassner, G., Caprario, FX., Dafré, AL., y Ohira M. 1992. Comparative hematology in marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 102(2), 311-321.
151. Xia, Y., Wang, M., Gao, F., Lu, M., y Chen, G. 2020. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Nutrition*.
152. Yu, Z., Tang, J., Khare, T., y Kumar, V. 2019. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? *Fitoterapia*, 140.

153. Zahran, E., Risha, E., AbdelHamid, F., Mahgoub, H. A., y Ibrahim, T. 2014. Effects of dietary Astragalus polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes, and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 38(1), 149-157.
154. Zheng, Z. L., Tan, J. Y., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., y Wang, K. Y. 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.
155. Zhou, Y., Jiang, W. D., Zhang, J. X., Feng, L., Wu, P., Liu, Y., ... y Zhou, X. Q. 2020. Cinnamaldehyde improves the growth performance and digestion and absorption capacity in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Physiology and Biochemistry*

XV. ANEXOS

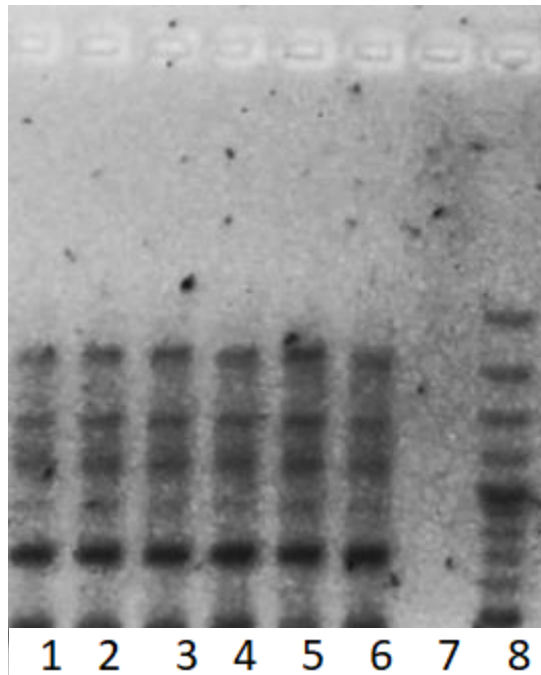
Anexo 1: TABLA DE DESCARTE POR GRADO DE HEMÓLISIS (Dugan et al., 2005).



Anexo 2: Composición del alimento administrado

Nutriente (%)	Tilapia 40	Tilapia 35
Peso correspondiente	10-30 gr	30-80
Días	1-44	45-60
Proteína (MIN)	40	35
Grasa(MIN)	5	4
Fibra(MAX)	4	5
Calcio(MIN)	1.2	1.2
Fosforo(MIN)	0.8	0.8
Ceniza(MAX)	12	12
Humedad(MAX)	12	12
ED(Mcal/Kg(MIN))	3,000	3,000

Anexo 3: Imagen en negativo de PCR 16S



1: *Bacillus*

megaterium

2: *Bacillus cereus*

3: *Bacillus bombysepticus*

4: *Ralstonia picketti*

5: *Pseudomonas stutzeri*

6: Control positivo

7: Blanco PCR

8: Marcador de peso molecular GeneRuler PLUS DNA Ladder

El peso de los fragmentos es de 1600 pb aprox

**Anexo 4: Operacionalización de variables de parámetros productivos y
parámetros hematológicos.**

Descripción	Variable 1	Variable 2	Unidad de medida unidades variable 2
Variables enfrentadas	Tipo de dieta	Ganancia de peso	Porcentaje
		Ganancia de peso diario	(gr/día)
		Ratio específico de crecimiento	(Porcentaje/día)
		Recuento eritrocitario	$10^6/\mu\text{L}$
		Recuento de Hemoglobina	g/dL
		VCM	fL
		CMCH	g/dL
		Ht	Porcentaje
		Recuento leucocitario	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Clasificación variables	Cualitativa dicotómica	Cuantitativa continua	
Relación datos	Dependencia/No pareados		
Pruebas	Kolmogorov Smirnov de una muestra		
Relación de normalidad	No Normal--> U de Mann-Whitney, normal --> T de Student independiente		

Anexo 5: Operacionalización de variables de UFC.

Descripción	Variable 1	Variable 2
Variables enfrentadas	Tipo de dieta	Unidades formadoras de colonias
Clasificación variables	Cualitativa dicotómica	Cuantitativa discreta
Relación datos	Dependencia/No pareados	
Prueba	U de Mann-Whitney	

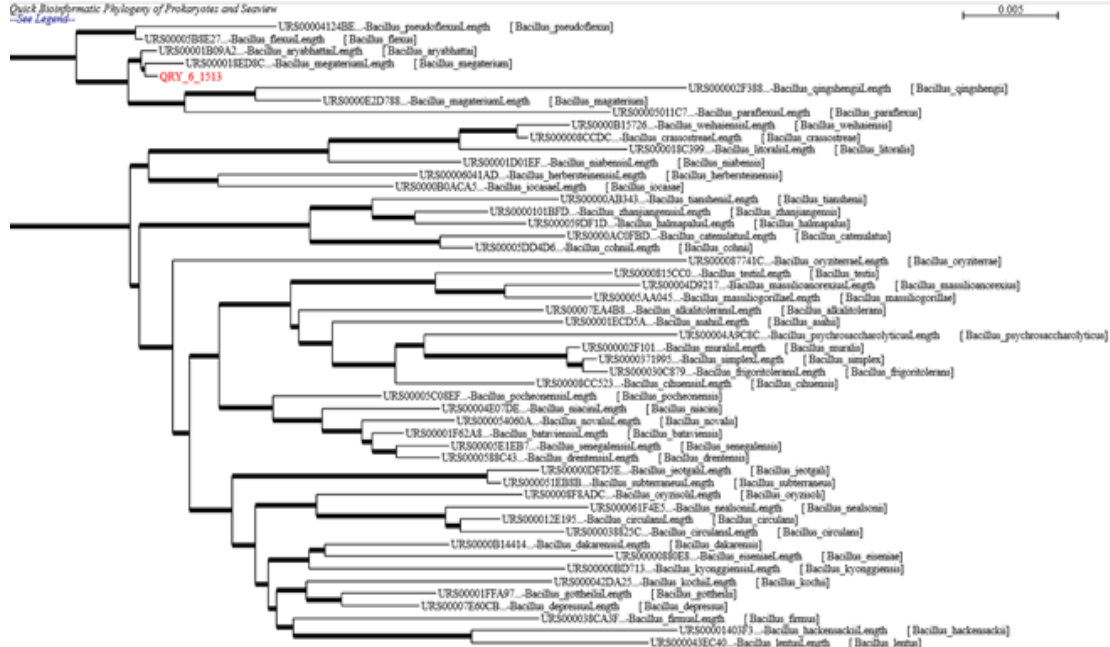
Anexo 6: Componentes activos del aceite esencial Emerald ®.

MICROENCAPSULADO “Sin código”

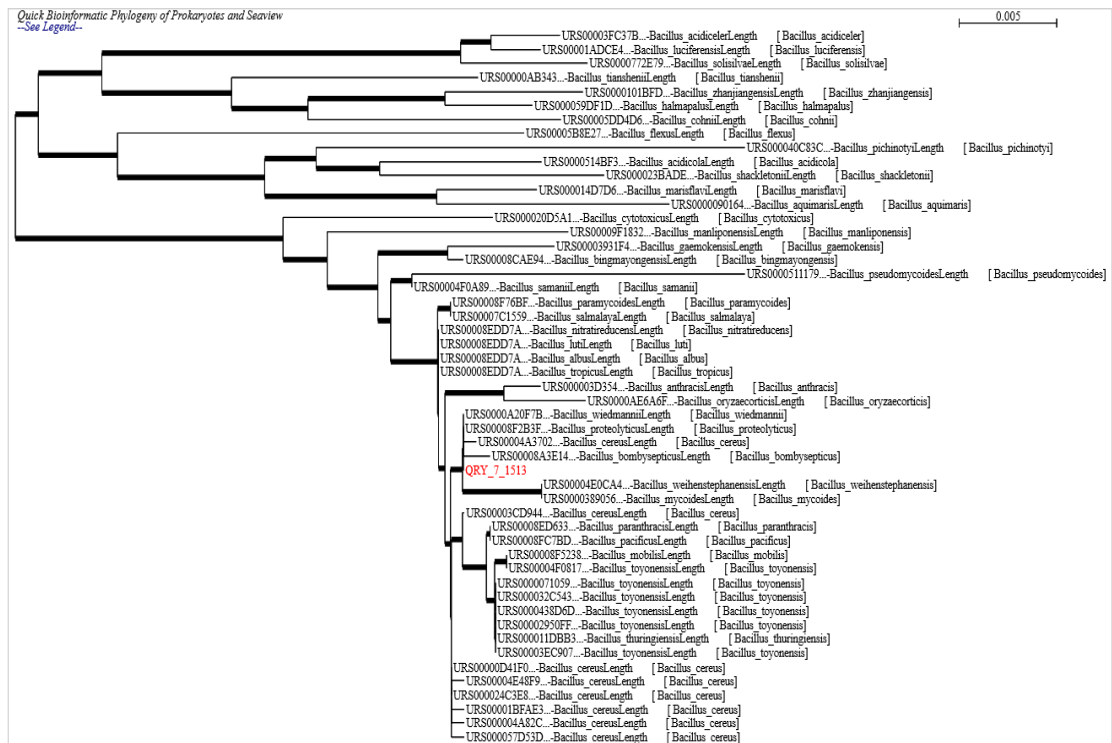
Se identificaron 9 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial.

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	t_R (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	Estireno	14.35	0.29
2	Benzaldehído	15.87	0.73
3	p-Cimeno	17.01	0.81
4	Limoneno	17.09	0.12
5	1-metil-4-(1-metiletetil)-Benceno	18.17	0.09
6	3-fenil-2-Propenal	20.33	1.08
7	Cinamaldehído	21.17	53.93
8	Tymol	21.24	24.22
9	Carvacrol	21.40	18.73

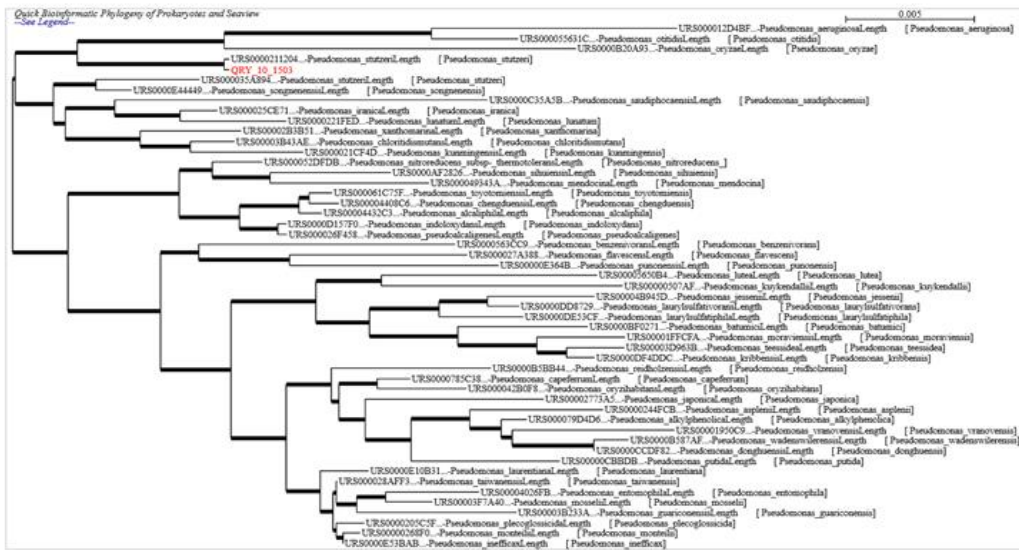
Anexo 7: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Bacillus megaterium*



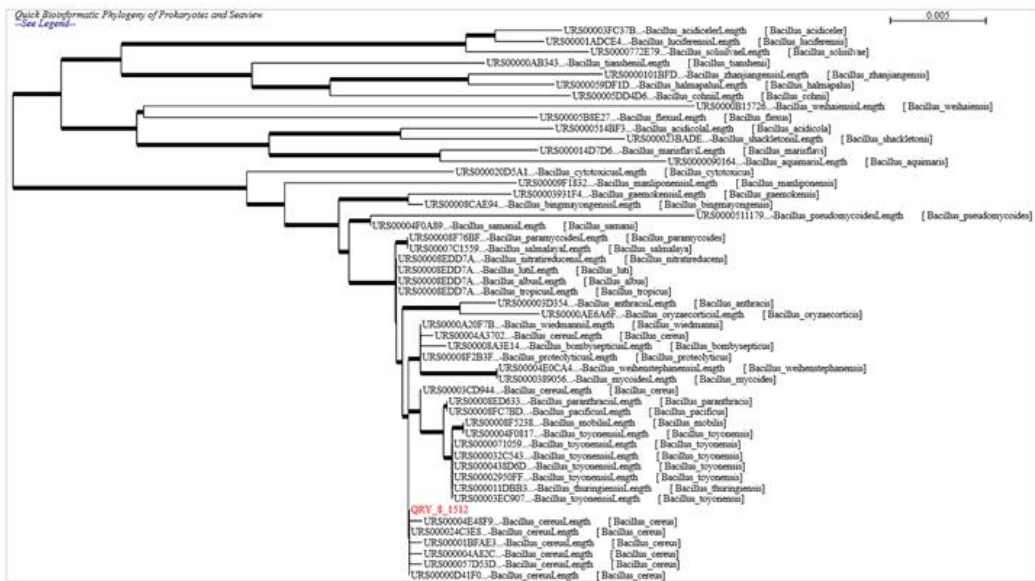
Anexo 8: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Bacillus bombysepticu*



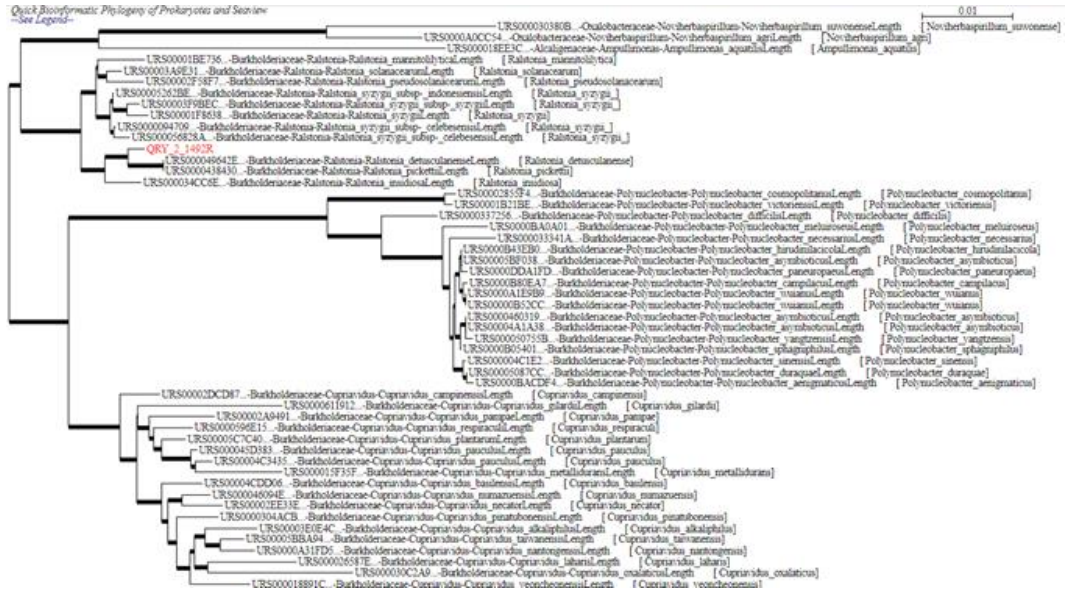
Anexo 9: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Pseudomonas stutzeri*



Anexo 10: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Bacillus cereus*



Anexo 11: Dendograma basado en las secuencias FASTA de cepa de *Ralstonia pickettii*



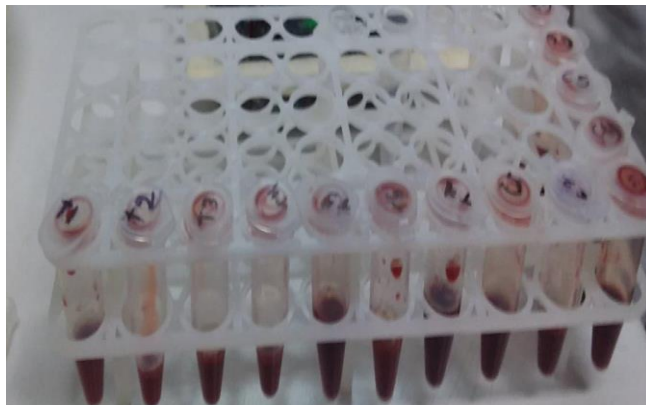
Anexo 12: Procesamiento de muestras microbiológicas



Anexo 13: Procesamiento molecular de muestras microbiológicas



Anexo 14: Procesamiento de muestras hematológicas



Anexo 15: Imagen de piscigranja Hippocampus del Perú



Anexo 16: Crecimiento de unidades formadoras de colonias en medio Bacillus Hicrome.

A la izquierda se observa una placa de grupo tratamiento y a la derecha el grupo control, nótese la diferencia de cantidad de colonias entre las dos placas.

