

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA

TRABAJO DE GRADUACIÓN.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria “in vitro” del extracto de *Eucalyptus globulus*, sobre la bacteria *Pseudomona fluorescens*, causante de enfermedad en animales acuáticos.



PRESENTADO POR
T.A. JOSUE RODOLFO GARCIA PEREZ

PARA CONFERIRLE EL TITULO DE
LICENCIADO EN ACUICULTURA

GUATEMALA, 2010.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

CENTRO DE ESTUDIOS DEL MAR Y ACUICULTURA

CONSEJO DIRECTIVO

Presidente	M.Sc. Pedro Julio García Chacón
Coordinador Académico	M.Sc. Carlos Salvador Gordillo García
Secretaría	M.Sc. Norma Edith Gil Rodas de Castillo
Representante Docente	Ing. Agr. Gustavo Adolfo Elías Ogaldez
Representante del Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas	M.Sc. Estrella de Lourdes Marroquín Guerra
Representante Estudiantil	Br. Jesús Alfredo Guzmán Cáceres
Representante Estudiantil	Br. Sofía del Carmen Morales Navarro

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, casa de estudio en la que hoy culmino una gran parte de mi formación profesional.

Al Centro de Estudios del Mar y Acuicultura por ser mi Institución de formación profesional.

Al Laboratorio de Sanidad Acuícola, del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura y el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por el apoyo brindado durante la realización de la investigación.

ACTO QUE DEDICO

A Dios, por ser mi creador, mi fundamento de vida y por haberme guiado, acompañado y llenado de sabiduría en todo momento.

A mis padres: José García y Guadalupe de García, a quienes amo profundamente y son ejemplo de honradez, rectitud, trabajo y determinación, todo lo que soy, lo soy por ellos y este triunfo se los dedico especialmente a ellos.

A mi hermano: Carlos García que es mi inspiración y apoyo en toda mi vida.

A mi familia en general: agradezco por estar en todo momento conmigo gracias por apoyarme y ser parte de mi vida.

A mi asesor: Dr. Salomón Medina, por haberme guiado en el desarrollo de esta investigación, por su dedicación y confianza depositada en mi persona.

A mis profesores: M.Sc. Carolina Marroquín y Carmela Barrientos por su valiosa colaboración en la revisión de este documento y por el apoyo brindado en el transcurso de la investigación.

A mi novia: Karen por estar siempre allí, acompañándome en las buenas y malas, y deseándome éxitos en todo momento.

RESUMEN

Las infecciones por *Pseudomona fluorescens*, son la causa más frecuente de pérdidas de organismos en los sistemas de producción de tilapia en Guatemala (Medina, 2006), provocando el uso indiscriminado e irracional de distintos fármacos para erradicar dicho patógeno. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos agentes ha llevado a una creciente tasa de resistencia en las cepas bacterianas. Es por eso que se hace necesaria la investigación de alternativas terapéuticas como los productos fito-farmacéuticos, para el control y la prevención de enfermedades en organismos acuáticos. De acuerdo a Silveira (2006), la producción de productos fito-farmacéuticos se han identificado como la terapia del futuro en la patología acuática, debido a su eficacia, seguridad y accesibilidad.

El presente trabajo de investigación evaluó la actividad del extracto etanólico de Eucalipto azul, *Eucalyptus globulus*, como antimicrobiano en cepas de *Pseudomona fluorescens* aisladas de organismos de tilapia *Oreochromis niloticus*, los cuales presentaban la sintomatología de Pseudomonadiosis.

Se selecciono *E. globulus*, por ser una planta popular en Guatemala, a pesar de no ser endémica, su distribución y abundancia esta en todo el territorio guatemalteco. Presenta propiedades antisépticas, desinfectantes debido a sus metabolitos.

La metodología empleada para estimar la actividad antimicrobiana de la planta, fue a través de un bioensayo basado en la técnica de difusión en agar con discos impregnados del extracto vegetal ante la cepa de *P. fluorescens*. El método empleado, fue enfrentando el microorganismo a concentraciones de 0.5 mg/L, 1mg/mL, 3 mg/mL y 5 mg/mL del extracto vegetal.

Los resultados del ensayo mostraron ausencia de actividad inhibitoria contra la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, infiriendo que los metabolitos extraídos del material vegetal no penetraron en los espacios periplásmicos de la pared celular, impidiendo el bloqueo de la síntesis de peptidoglicano y la lisis osmótica de la bacteria. Sin embargo, se recomienda continuar con la búsqueda de actividad antimicrobiana en otras plantas utilizadas popularmente en Guatemala, debido que la infección por *Pseudomonas fluorescens* es un problema vigente en la acuicultura guatemalteca, y sabiendo que el uso de medicamentos naturales son biodegradables y no agresivos al medio. Siendo una alternativa valiosa para la producción acuícola guatemalteca.

ABSTRACT

The infections for *Pseudomona fluorescens*, are the most frequent cause in losses of organisms in the aquatic systems of tilapia in Guatemala (Medina, 2006), causing the indiscriminate and irrational use of different medication to eradicate this microorganism. However, the indiscriminate use of these agents has taken to a growing resistance rate in the bacterial stumps. It is for that reason that it becomes necessary the investigation of therapeutic alternatives as the products fito-pharmacists, for the control and the prevention of illnesses in aquatic organisms. According to Silveira (2006), the production of products fito-pharmacists has been identified as the therapy of the future in the aquatic pathology, due to its effectiveness, security and accessibility.

The present evaluated the activity of the extract ethanolic of *Eucalyptus globulus* as antimicrobial in stumps of *Pseudomona fluorescens* of organisms *Oreochromis niloticus*, which presented the symptoms of Pseudomonadiasis.

Are selects *E. globulus*, to be a popular plant in Guatemala, in spite of not being endemic, their distribution and abundance this in the whole Guatemalan territory. It presents antiseptic properties, disinfectant due to their metabolitos.

The methodology used to estimate the activity antimicrobial of the plant, was through a bio-assay based on the diffusion technique in agar with impregnated disks of the vegetable extract before the stump of *P. fluorescens*. The used method, she/he went facing the microorganism to concentrations of 0.5 mg/L, 1mg/mL, 3 mg/mL and 5 mg/mL of the vegetable extract.

The results of the rehearsal showed absence of activity inhibition against the bacteria *Pseudomona fluorescens*, inferring that the extracted metabolitos of the vegetable material didn't penetrate in the spaces periplasmics of the cellular wall, impeding the blockade of the peptidoglicano synthesis and the osmotic lisis of the bacteria.

However it is recommended to continue with the search of activity antimicrobial in other plants used popularly in Guatemala, due that the infection for

Pseudomona fluorescens is an effective problem in the Guatemala aquaculture, and knowing that the use of natural medications is biodegradable and not aggressive to the means. Being a valuable alternative for the production in aquaculture.

ÍNDICE GENERAL

I	INTRODUCCION.	1
II	ANTECEDENTES	3
III	MARCO TEORICO	5
	3.1 Generalidades.	5
	3.2 Enfermedades bacterianas en tilapia	5
	3.2.1 Enfermedades Septicémicas	5
	3.3 Antimicrobianos de origen natural vegetal	8
	3.3.1 Modo de acción del agente antimicrobiano	8
	3.4 Fitoterapeuta <i>Eucalyptus globulus</i>	10
	3.4.1 Farmacognosia	10
	3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana en plantas	11
	3.5.1 Tamizaje	11
	3.5.2 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	12
	3.6 Métodos de prueba para la eficiencia del agente Antimicrobiano	12
IV.	HIPOTESIS	14
V.	OBJETIVOS	15
	5.1 Objetivo General	15
	5.2 Objetivo Especifico.	15
VI.	METODOLOGIA	16
	6.1 Ubicación geográfica	16
	6.2 Procedimiento	16
	6.2.1 Aislamiento Bacteriano	16
	6.2.2 Siembra de tejidos y obtención de cepa bacteriana	17
	6.2.3 Selección y depuración de los microorganismos	17
	6.2.4 Identificación del microorganismo aislado	18
	6.3 Extracción del agente antimicrobiano de <i>Eucalyptus globulus</i>	18
	6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto <i>Eucalyptus globulus</i>	19
	6.5 Variables	19
	6.6 Materiales y equipo	19
VII.	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	21
VIII.	CONCLUSIONES	23
IX.	RECOMENDACIONES	24
X	BIBLIOGRAFIA	25

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1.	<i>Pseudomona fluorescens</i>	6
FIGURA No. 2.	Sintomatología externa de Pseudomonadiasis.	7
FIGURA No. 3.	<i>Eucalyptus globulus</i>	10
FIGURA No. 4	Extracción del material vegetal <i>E. globulus</i>	22
FIGURA No. 5	Aislamiento bacteriano	23
FIGURA No. 6	Galería de identificación bacteriana API20E V4.0	24

INDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Evaluación de la actividad antibacteriana de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre la bacteria <i>Pseudomona fluorescens</i> .	22
---------------------	---	----

I. INTRODUCCIÓN

Guatemala cuenta con alrededor de 86 granjas acuícolas, de las cuales el 30%, aproximadamente 26 producen tilapia. Se ha observado un aumento en el número de granjas a partir de la década de los 90, por ser un negocio rentable y de fácil manejo. Este aumento se ha dado en su mayoría de manera irresponsable y sin conocimiento de leyes, provocando daños irreparables al ambiente; como la eutrofización de los cuerpos de agua, introducción de nuevas especies a cuerpos de agua naturales y disminución de la población de peces nativos. Con dicho incremento también se ha evidenciado el aumento de enfermedades por una diversidad de patógenos en organismos acuáticos, siendo microorganismos bacterianos los responsables de la mayoría de padecimientos. La proliferación de estos microorganismos ha causado el uso indiscriminado de fármacos, propiciando el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos.

En la actualidad una de las enfermedades bacterianas que más afecta a los sistemas acuícolas en Guatemala es causada por una bacteria del género ***Pseudomona*** específicamente la especie ***Pseudomona fluorescens***. Para tratar dicha enfermedad se ha empleado una variedad de fármacos convencionales, los cuales tienen precios elevados, propician impactos negativos al ambiente cuando se vierte en los efluentes, y sobre todo que provocan que los microorganismos desarrollen resistencia bacteriana por su uso indiscriminado.

Debido a esto la acuicultura guatemalteca ha sido fuertemente criticada y está en busca de nuevas alternativas. Una alternativa que no se ha explorado a fondo, es el empleo de medicamentos de origen natural, inoculos biodegradables, que pueden llegar a ser una alternativa valiosa para tratar enfermedades en la acuicultura.

La herbolaria medicinal para la acuicultura es relativamente nueva, inicia en los años noventa y países latinoamericanos como Cuba y México han trabajado alrededor de 50 plantas medicinales, para combatir enfermedades de distintas etiologías, tanto en peces como crustáceos, determinando que dicha terapéutica es accesible, segura, económica y eficaz para enfermedades de distinta etiología.

La presente investigación buscó alternativas para tratar las enfermedades en la acuicultura, evaluando la herbolaria medicinal, a través del extracto etanólico de Eucalipto azul *Eucalyptus globulus*, como antimicrobiano de *Pseudomona fluorescens*.

II. ANTECEDENTES

Los productos fito-farmacéuticos, para el control y la prevención de enfermedades de organismos acuáticos, se han identificado como la terapia del futuro en la patología acuática. Sin embargo, las investigaciones en este campo y el empleo de los mismos por el sector productivo son aún insuficientes (Silveira, 2006).

En Guatemala no existen investigaciones sobre el uso de productos fito-farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades acuícolas. Países como Cuba, México, Taiwán y China entre otros, son los promotores de la herbolaria medicinal para la acuicultura.

En México y Cuba se realizaron estudios sobre el empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos. Estos evaluaron los efectos terapéuticos y profilácticos de por lo menos 40 productos vegetales en especies acuáticas, tanto de consumo como de ornato (Prieto, 2005).

En Cuba se realizó una evaluación de la actividad terapéutica con fines antiparasitarios de extractos obtenidos a partir de plantas con propiedades medicinales, en el control y prevención de la parasitosis por protozoos *Cryptocaryon irritans* y *monogeneos*, *Pempheris schomburgkii* en peces marinos. Los extractos fueron obtenidos de *Momordica charantia* y *Melia azedarach*, se probaron cinco concentraciones a diferentes tiempos de exposición. El comportamiento de la mortalidad de *Pempheris schomburgkii* expuesto a los tres extractos en concentraciones entre 0 y 35 mL/L evidenció un incremento de la mortalidad para las dos concentraciones mayores a partir de las 12 horas de exposición.

Para protozoos y monogéneos todos los extractos muestran un efecto letal en la medida que aumenta el tiempo de exposición; aunque de forma general a partir de 15 mL/L es efectiva la dosis para tiempos de exposición entre 2-6 horas. Esto permitió determinar la efectividad en el control de las parasitosis por *Cryptocaryon irritans* y *Neobenedenia melleni* del extracto de *Momordica charantia* 15-25 mL/L, 2-6 horas y el extracto de *Melia azedarach* 15-20 mg/L, 2-6 horas (Fernández, 2003).

Otro estudio determina la concentración inhibitoria mínima de extractos de *Eucalyptus sp.*, *Schinus terebintifolius* y *Cassia alata* frente a tres especies bacterianas del género *Aeromonas*, patógenas de peces. Se empleó el método de diluciones seriadas dobles en medio líquido con una concentración bacteriana de /mL. Los resultados demostraron que *Aeromonas salmonicida atípica* tuvo la mayor sensibilidad al actuar con los tres extractos con valores de CIM entre 0.19 mg/mL y 0.32 mg/mL. Todos los extractos evaluados tuvieron actividad bactericida sobre al menos una de las especies ensayadas. El extracto de *Eucalyptus sp.*, mostró esta actividad sobre el 100 % de las cepas probadas (Núñez, 2002).

En México se determinó la concentración mínima Letal (CML) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de ajo, para bacterias del género ***Escherichia coli*** y ***Listeria innocua***. Los resultados demostraron que la concentración mínima inhibitoria fue de 0.25 gramos de ajo/ mL de etano. Para la bacteria ***Escherichia coli***, mientras que ***Listeria innocua*** tuvo un concentración mínima inhibitoria de 0.125 g/mL (González, 2004).

III. MARCO TEORICO

3.1 Generalidades

La intensificación de la producción acuícola ha sido acompañada por el desarrollo de problemas ecológicos y patológicos. La prevención y control de las enfermedades son ahora la prioridad para la sostenibilidad de esta industria. El tratamiento tradicional para enfermedades ha girado alrededor de productos farmacológicos químicos, sin embargo, el uso de antibióticos puede presentar riesgos para la salud humana y medioambiental por el desarrollo de cepas resistentes (Rodríguez, 2003).

Como alternativa al control químico, se encuentra los fitoterapeuta. Los fitofarmacéuticos al ser productos de origen vegetal, cien por ciento naturales, generan una resistencia de las cepas bacterianas menor. Por su farmacología son idóneos para el tratamiento y profilaxis de las enfermedades en la acuicultura, siendo esta una estrategia de control, para el futuro (Silveira, 2006).

3.2 Enfermedades bacterianas en tilapia

Las enfermedades en los peces especialmente en el caso de tilapia, provienen de una interacción entre el medio ambiente, el agente etiológico y el factor estrés. El estrés provoca un desorden fisiológico, deprimiendo el sistema inmunológico del organismo, provocando así en muchas de las ocasiones lesiones que son la puerta de entrada para gran diversidad de patógenos que puedan causar enfermedades (Medina, 2009).

3.2.1 Enfermedades Septicémicas

Las enfermedades Septicémicas en tilapia, al igual que en otros peces pueden ser ocasionadas por bacterias del género *Aeromonas*, *Pseudomona*, *Edwardsiella*, *Streptococo* y *Vibrio*. La *Pseudomonas* son las bacterias que con mayor frecuencia se encuentran en los centros de producción acuícola en Guatemala (Medina, 2009).

Pseudomonadiasis

Esta enfermedad es provocada por la bacteria *Pseudomona fluorescens*, reportada como la principal patógena en tilapia y en peces de agua dulce. La infección ocurre cuando se deprime el sistema inmunológico, por acción de un mal manejo de producción, relacionado a altas densidades, mala calidad de agua, y baja calidad del alimento, entre otra serie de factores (Jiménez, 1988).

P. fluorescens es un bacilo corto, Gram negativo (Figura No.1), que mide aproximadamente 0.5 x 4 µm, no esporulado y se mueve por flagelos polares. Una de las características más importantes es que fermenta y utiliza hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio en el que el oxígeno actúa como aceptor terminal de electrones. Aunque se define como aerobio estricto, puede crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina como aceptor terminal de electrones, produce un pigmento verde amarillento que se difunde en el medio de cultivo tripticasa soja agar TSA y es fluorescente bajo la luz ultra violeta. Es oxidasa positiva y actúa sobre la glucosa en forma oxidativa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 25°C, pero se desarrolla muy bien a temperaturas de 4 a 6° (Jiménez, 1988).



Figura No. 1: *Pseudomona fluorescens* (Todar, 2009).

Sintomatología

Es muy similar a la que presenta cuando la enfermedad es causada por *Aeromonas* móviles. Externamente pueden aparecer manchas rojas en la piel, boca, base de las aletas y ano. En sus aletas se puede observar desilachamiento y en algunos casos hasta su pérdida (Figura No.2). A la necropsia puede observarse eritema en órganos internos, especialmente en bazo, hígado y riñón, ascitis, hiperemia en los vasos de la dermis que pueden penetrar hasta el músculo. Además los peces pierden apetito y tienden agruparse en las fuentes de desfogue o entrada de agua (Melgar, 2006).

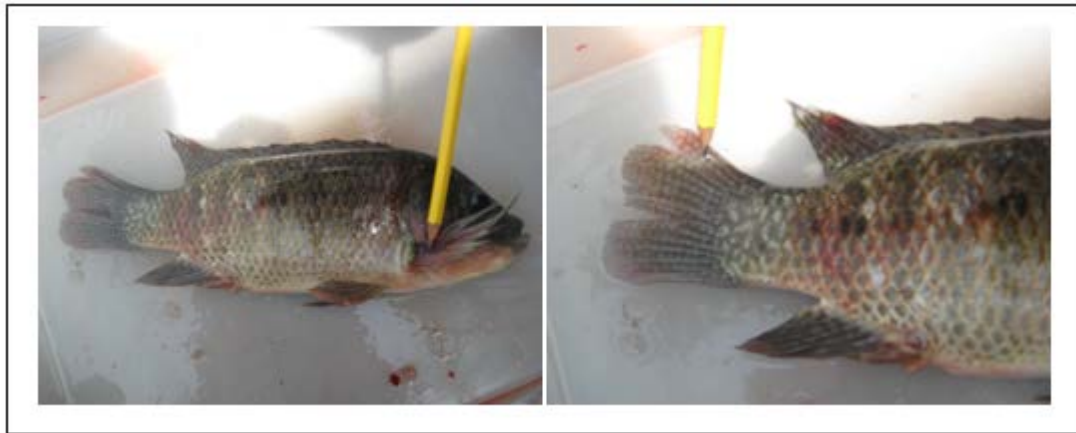


Figura No. 2: Sintomatología externa de Pseudomonadiazis (Trabajo de Campo, 2009).

Prevención y control

Para prevenir la enfermedad se recomienda mantener la calidad de agua en óptimas condiciones y regular todos aquellos factores que pueden causar estrés. Cuando la terapia es a base de un antimicrobiano para su control, se han obtenido buenos resultados con oxitetraciclina en una concentración de 50 a 57 mg/kg de peso del pez, durante 10 días (Jiménez, 1988).

3.3 Antimicrobianos de origen natural vegetal

Plantas, hierbas, especias, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y hongos. Existen más de 40 extractos esenciales que sirven como fitoterapeutas para el tratamiento de las enfermedades acuícolas. Los compuestos antimicrobianos de las plantas, se encuentran generalmente en el aceite esencial y extractos secos, obtenidos a partir de hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (Prieto, 2005).

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana, incluyen a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, terpenoides, simarubalidanos, melicianinas, limonoides, lactosas y lignamos entre otro (Conner, 1993).

- Quinonas: son anillos aromáticos con dos funciones ceto, son causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Miskovsky, 2002).
- Taninos: constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados. Se han descrito más de 30 que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Cruz, 2001).
- Cumarinas: son compuestos derivados de la benzo-alfa-pirona, como la cumarina, esculetina, umbeliferota y escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadora.

Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante la interacción con el ADN eucariota, lo que explica su actividad antiviral (Yildirim, 2000).

- Flavonas y compuestos relacionados con estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo: su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forma complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Yildirim, 2000).
- Alcaloides: son compuestos nitrogenados heterocíclicos. A este grupo pertenecen la morfina, heroína y cocaína. El mecanismo de acción parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Yildirim, 2000).
- Aceites esenciales: son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas y especias comercializadas para su administración en el alimento como conservantes y aditivos alimentarios. Estos compuestos pueden ser letales para las células bacterianas o servir como inhibidores de la producción de metabolitos (Huerta, 2000).

Son mezclas líquidas, volátiles de propiedades aromáticas, extraídos de las plantas. Se encuentran casi exclusivamente en las fanerógamas y en especial en algunas familias: rosáceas, labiadas, umbelíferas, lauráceas, etc. Se extraen por métodos diversos, predominando el de arrastre con vapor de agua. La composición de los aceites es muy diversa, pero casi todos sus componentes pertenecen al grupo de los terpenos, ya sean hidrocarburos, y a productos de oxidación (alcanfores); principalmente entre los últimos se encuentran los productos odoríferos más importantes y característicos de las esencias (Font, 1982).

Los compuestos activos de los aceites esenciales y extractos, pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Smid; Gorris, 1999).

3.3.1 Modo de acción del agente antimicrobiano

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones, a través de ella afectando así la actividad celular (Conner, 1993).

3.4 Fitoterapeuta *Eucalyptus globulus*

Eucalyptus globulus (Figura No. 3), es un árbol 75 a 90 m de alto, de la familia *Mytaceae*, con corteza azul grisácea, de hojas con capa cerosa blanca. Las hojas jóvenes, son opuestas, oblongas de 7 a 15 cm de largo, cuando adultas son alternas. Esta especie proviene de Australia y Tasmania. En América se cultivan en climas tropicales, subtropicales y templados (INAB, 1980).



Figura No. 3: *Eucalyptus globulus* (Rafael, 2008).

3.4.1 Farmacognosia

La farmacognosia estudia básicamente el origen, composición y características químicas y anatómicas de las drogas provenientes de los vegetales y animales. (Urroz, 2000).

En el *Eucalyptus globulus* microscópicamente se observa una construcción equifacial y grandes orificios oleíferos. El aceite esencial y extracto son antisépticos, que actúa sobre bacterias del genero Gram negativa. La acción antibacteriana se atribuye al cineol (Cáceres, 1996).

Además contiene hidrocarburos monoterpénicos (10% a y b-pineno, g-hrpineno, p-cimeno, camfeno, a-felandreno, b-felandreno, limoneno, mirceno), hidrocarburos sesquiterpénicos (1 % de aromadendreno, b-cariofileno, a-gurjuneno), alcoholes monoterpénicos (borneol, linalol, terpineno, a-terpineol, 1.2% de transpinocarveol, geraniol), alcohol sesquiterpénico (6.9% de globulol; epiglobulol, trazas de eudesmol, ledol, viridiflorol), aldehidos alifáticos (butírico, valeriánico, caproico), citronelal, carvona, acetato de citronelilo, acetato de geranilo, 3.6% de acetato de a-terpinil.

Otros fitoconstituyentes de las hojas son: flavonoides (rutósida, quercitrósido, hiperósido e hidroxí-5-dimetoxi-7,4'dimetil-6,8-fléivona), un heterósido fenólico (caliptósido que contiene glucosa), ácidos (caféico, gentísico, ferúlico), taninos (ácidos: protocatéquico, gálico, elágico) y un principio antibiótico no determinado, resinas, ácidos grasos, ácido fórmico y acético. El fruto y la corteza contienen taninos.

3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana en plantas

Puede dividirse en 2 fases: el tamizaje y la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

3.5.1 Tamizaje

Para la determinación de la actividad antimicrobiana en extractos vegetales, el ensayo de elección es el de dilución en agar. En este proceso una determinada cantidad del extracto a estudiar es mezclado con agar nutritivo.

El microorganismo se mantiene en medio tripticasa soja y luego es recuperado para la prueba mediante incubación por 24 horas. Se prepara una dilución 1:100 y se incuba en placas de agar conteniendo el extracto vegetal en cuadruplicado siguiendo un patrón radial en orden aleatorio. Después de un tiempo de incubación se realizan las lecturas evaluando la presencia o ausencia de crecimiento. Una completa supresión del crecimiento bacteriano es requerida para declarar que el extracto es activo (Mitscher, 1987).

3.5.2 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Consiste en la cuantificación de la concentración mínima de un extracto, fracción o compuesto que previene el crecimiento visible de un microorganismo. Para su realización se emplean diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evalúa el crecimiento en un ensayo estandarizado. Es importante destacar que una gran proporción de los productos sintetizados con carácter antimicrobiano muestran en las pruebas de sensibilidad *in vitro*, concentraciones inhibitorias mínimas establecidas (Tegos, 2000).

3.6 Métodos de prueba para la eficiencia del agente antimicrobiano

Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad de los antimicrobianos, se pueden dividir en: pruebas “*in vitro*” y pruebas de aplicación o bioensayos.

Las pruebas *in vitro*, incluyen pruebas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto, es decir la cepa bacteriana a estudiar (Davidson; Parish, 1989). El método más recomendado es el de punto final, en el cual se siembra la cepas bacterias en diversos medios de cultivo, hasta obtener la cepa bacteriana pura para realizar las pruebas de inhibición bacteriana.

Este método es utilizado para la evaluación de los antimicrobianos naturales. También se conoce como “Zona de Inhibición” (Zaika, 1988). Se trata de un método sencillo, sin embargo el efecto inhibitorio del compuesto que se va a evaluar dependerá de su habilidad para difundirse en el medio.

IV. HIPOTESIS

El extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* presenta actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Determinar la concentración mínima inhibitoria “in vitro” del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus*, sobre la bacteria *Pseudomona fluorescens*, causante de la enfermedad Pseudomonadiasis en tilapia (*Oreochromis niloticus*).

5.2. Objetivos Especificos

- Evaluar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Eucalyptus globulus* por el método de difusión en disco.
- Determinar la eficiencia de los rendimientos de *Eucalyptus globulus* por el método de extracción continua en rotavapor.

VI. METODOLOGIA

6.1 Ubicación geográfica

El estudio se realizó en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura CEMA/USAC.

6.2 Procedimiento

6.2.1 Aislamiento Bacteriano

El aislamiento bacteriano se realizó a partir de un cultivo de tilapia *Oreochromis niloticus* ubicado en Estación Experimental de Monterrico CEMA/USAC, del municipio de Taxisco, departamento de Santa Rosa. Para el proceso de toma de muestra, se realizó un muestreo sesgado o por conveniencia donde se colectaron 15 peces adultos (tilapia) los cuales presentaban la sintomatología de la enfermedad Pseudomonadiosis. Se transportaron vivos en contenedores de plástico de 400 litros con aireación constante, hacia el Laboratorio de Sanidad Acuícola; donde se procedió a realizar la necropsia y colecta de tejidos.

Para la necropsia se utilizó una modificación de la metodología de Pozo, Quesada, Plasencia, (2006), tal y como se describe a continuación:

- Esterilización física del equipo a utilizar, posterior a ello se trabajó bajo un mechero de bunsen para que las condiciones fueran asépticas.
- Preparación de campo estéril de trabajo mediante un mechero bunsen.
- Corte profundo entre la cabeza y la columna vertebral del pez para inmovilizarlo.
- Primer corte en la región ventral del pez desde el ano hasta zona inferior del opérculo.
- Segundo corte perpendicular al primero, desde el ano, hasta la altura de la aleta dorsal, sosteniendo el fragmento de músculo cortado.

- El tercer corte en forma de semicírculo hasta la aleta dorsal.
- Preparación de anamnesis incluyendo signos clínicos y lesiones encontradas en los órganos internos.
- Extracción de hígado, bazo y riñón, teniendo cuidado de no arrastrar bacterias intestinales con los instrumentos.
- Colecta y transporte de órganos en cajas de petri estériles.

6.2.2 Siembra de tejidos y obtención de cepa bacteriana

Las muestras colectadas se sembraron en agar sangre. Los fragmentos de los órganos internos, se maceraron con 500 μ L de agua destilada estéril, con ayuda de un mortero y pistilo. La siembra fue a través de dos técnicas de raspado:

- Estrías: Se realizó en cajas petri pasando el asa bacteriológica sobre la superficie del medio realizando un zigzag.
- Diseminación: Se realizó en cajas petri colocando el fragmento de órgano en la superficie, y se frotó con unas pinzas estériles.

Se incubó las muestras a 37°C por 24 horas, y se clasificaron las colonias que crecieron por su morfología (Pozo; Quesada; Plasencia, 2006).

6.2.3 Selección y depuración de los microorganismos

La selección de los microorganismos se realizó a través de los crecimientos positivos en las placas de crecimiento común. Se evaluaron macroscópicamente las colonias bacterianas que posean características morfológicas uniformes y se sembraron en agar selectivo *Pseudomona* y *Centrimida*, para la purificación de las colonias bacterianas.

6.2.4 Identificación del microorganismo aislado

Para determinar a qué género pertenecía el microorganismo cultivado, se empleó una tira de análisis API 20E. Un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas. Que consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez (Holmes; Holmes; Lapage, 2009).

6.3 Extracción del agente antimicrobiano de *Eucalyptus globulus*

La preparación de extractos se hizo con la metodología del Manual de Operaciones del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, -LIPRONAT-, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -FCCQQ-, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, -USAC-, la cual se describe a continuación.

- Se pesó 200 g de materia seca vegetal tamizada.
- Se colocó algodón en la parte inferior de un percolador, y un pedazo de papel filtro para cubrir el fondo.
- Se humedeció la materia vegetal con 50 mL de alcohol etílico al 70%
- Se transfirió todo el material vegetal al percolador y se cubrió con el disolvente, dejando reposar por 24 horas.
- Se recolectó en un erlenmeyer todo el disolvente agregado y se colocó en un balón de destilación de 1000 mL.
- Se colocó un balón con la muestra en el rota vapor a 57°C, a presión de 115mB y una rotación de 50%
- Se inició la destilación del extracto con la recuperación del disolvente, hasta que su consistencia fue semisólido.
- Se agregó el disolvente recuperado al percolador contenido el material vegetal (esta operación se repitió 4 veces antes de iniciar la concentración)
- Una vez concentrado el extracto se retiró el balón, y el extracto obtenido se colocó en un cristalizador de vidrio previamente pesado.

- El extracto se colocó en la desecadora durante 9 días
- Se verificó la consistencia sólida del extracto y se colocó en frascos ámbar previamente tarados que se almacenaron en refrigeración a 4°C
- Se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto obtenido.

6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Eucalyptus globulus*, sobre la cepa bacteria *Pseudomona fluorescens*

El ensayo de actividad inhibitoria *in vitro* se realizó por el método de difusión en agar. Este consistió en enfrentar la bacteria, con los extractos de la planta vegetal, mediante discos impregnados por el extracto de eucalipto, utilizando el medio agar MullerHilton (PEO, 2005).

- Se preparó el extracto a concentraciones conocidas de 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 3 mg/mL y 5 mg/mL, cada concentración fue tratada en 4 replicas.
- Se impregnó discos estériles de difusión, con 50 µL del extracto.

6.4.1 Preparación del inóculo de *Pseudomona fluorescens*

Se inóculó 50 µL de *Pseudomona fluorescens* en agar Centrimida y Muller Hilton y se colocó un máximo de 6 discos con los extractos de eucalipto por caja, adicionalmente se incluyó 1 disco de oxitetraciclina de acción antimicrobiana como control positivo.

Interpretación de resultados

- Se consideraron activos aquellas concentraciones de extracto que tengan un halo de inhibición de crecimiento mayor o igual a 12 mm.
- Se consideraron inactivos aquellas concentraciones de extracto que no produjeron halo de inhibición o que presentan un halo menor de 12 mm.

6.5 Variables

Dependiente

- Área de inhibición.
- Porcentaje de rendimiento del *Eucalyptus globulus*.

Independiente

- Concentración de extracto etanólico de *Eucalyptus globulus*.

6.6 Material y equipo.

Material y reactivos

- Etanol a 95%
- Papel filtro
- Papel mayordomo
- Cajas petri
- Asas bacteriológicas
- Espátulas
- Beackers de 100 ml.
- Beackers de 50 ml.
- Beackers de 25 ml.
- Micropipeta 125 μ L
- Puntas de micropipeta
- Agar Sangre
- Agar Pseudomona
- Agar Centrimida
- Agar Miller Hilton
- Caldo Infusión Cerebro Corazón
- Sensidisco de Oxitetraciclina
- Organismos vivos Tilapia

- Tubos de ensayo
- Erlenmayer 125 mL.
- Erlenmayer 50 mL.
- Etanol 70%
- Jabón desinfectante
- Extran
- Kit de pruebas bioquímicas bacterianas API 20E
- Kit de tinciones diferenciales Gram
- Aceite de inmersión
- Caja de porta objetos
- Caja de cubre objetos
- Viales ½ dragma
- Xilol
- Recina entellante
- Agua destilada
- Solución salina
- Guantes de latex
- Materia vegetal seca

Equipo.

- Microscopio
- Refrigerador 4°C
- Campana Bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Balanza analítica
- Percolador
- Rotavapor
- Desecadora
- Contador de colonias electrónico
- Incubadora

VII. PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

7.1 Eficiencia del rendimiento de *Eucalyptus globulus*.

El criterio de selección de *E. globulus*, fue el ser una planta popular en Guatemala, a pesar de no ser endémica, su distribución y abundancia esta por todo el territorio guatemalteco. Presenta propiedades antisépticas, desinfectantes debido a sus principios activos. El extracto fue obtenido por el método de extracción continua con etanol al 70%, por percolación y concentrados en rotavapor (Figura No.3), en condiciones de temperatura de 50°C, presión de 115 mB y una rotación del 50%. A partir de 200 gramos de materia vegetal seca se obtuvo un rendimiento de 47%, que equivale en peso a 94 gramos de extracto.



Figura No. 3: Extracción del material vegetal *E. globulus* (Trabajo de campo, 2009)

7.2 Perfil bacteriano.

La actividad antibacteriana del extracto etanólico de *E. globulus* sobre *P. fluorescens*, fue analizada con una cepa bacteriana aislada de organismos de tilapia *Oreochromis niloticus*, los cuales presentaban la sintomatología de Pseudomonadiasis. La confirmación de la cepa bacteria obtenida, fue a través del kit de pruebas bioquímicas API 20E. El perfil numérico de la bacteria *P. fluorescens* fue 224300443, reflejado en la base de datos de la galería API 20E V4.0, con un porcentaje de identificación del 87.7% (Figura No.5).

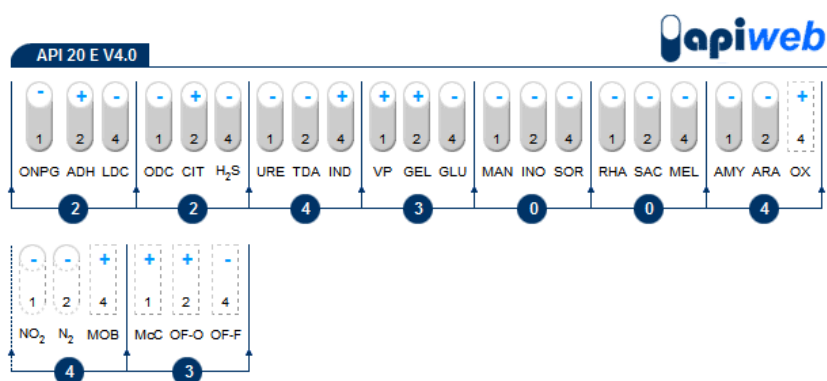


Figura No. 5: Galería de identificación bacteriana API20E V4.0 (trabajo de campo, 2009).

7.3 Evaluación del antimicrobiano

No se encontró actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* contra *Pseudomonas fluorescens* (Cuadro No.1), debido a que el extracto no produjo área de inhibición a las distintas concentraciones probadas. Se infiere que los metabolitos extraídos del material vegetal no penetraron en los espacios periplásmicos de la pared celular, impidiendo el bloqueo de la síntesis de peptidoglicano y la lisis osmótica de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

Cuadro No. 1. Evaluación de la actividad antibacteriana de *Eucalyptus globulus* sobre la bacteria *Pseudomona fluorescens*

Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre la bacteria <i>Pseudomona fluorescens</i>				
Concentración del extracto <i>Eucalyptus globulus</i> .	0.5 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
Actividad	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Área de inhibición	0 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.

Fuente: Trabajo de campo, 2009.

Aunque en la investigación el extracto no presento actividad antimicrobiana, y siendo la infección con *Pseudomona fluorescens* un problema vigente en la acuicultura guatemalteca, es importante continuar investigando sobre la actividad terapéutica que pueden proporcionar la gran diversidad de plantas de nuestro país, principalmente para este tipo de enfermedad que afectan de manera considerable a la piscicultura.

VIII. CONCLUSIONES

- 8.1 La hipótesis planteada se rechaza debido a que el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* no demostró actividad antimicrobiana sobre la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.
- 8.2 La eficiencia de la planta *Eucalyptus globulus* por el método de extracción continua con etanol al 70%, en percolación y concentrados en rotavapor, a temperatura de 50°C y una presión de 115 mB, fue de 47% en 200 gramos de materia vegetal.

IX. RECOMENDACIONES

- 9.1 Realizar pruebas *in vivo* sobre el efecto de aceites esenciales y extractos como antibacteriano para enfermedades en peces.
- 9.2 Utilizar cepas bacterias ATCC de *Pseudomona fluorescens*, para pruebas in vitro del extracto de eucalipto.
- 9.3 Utilizar distintos solventes apolares en la extracción de los metabolitos del *Eucalyptus globulus*, para la realización de pruebas de concentraciones inhibitorias en distintos agentes patógenos.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Cruz, JM; Martinez CJ; Herrera L. 2001. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts form hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal Agriculture Food Chemistry* 2001 (49): 2459-2464.
2. Cáceres, A. 1996. *Plantas de uso medicinal de Guatemala*. Guatemala, Editorial Universitaria. 402 p.
3. Díaz, BS; Jiménez, EM; Auro, OA. 2000. Evaluación del efecto parasiticida de los extractos acuosos y metanolico de *Budleja cordata* HBK (Tepozan) sobre *Costia necatrix* en *Tilapia (Oreochromis sp)*. *Veterinaria. Mexicana*. 31: 189 – 194.
4. Fernández, A. 2003. Evaluación de extractos de plantas medicinales con actividad antiparasitante. Mexico, CIVA. Consultado 13 agosto. 2009. Disponible en <http://.civa2003>.
5. Huerta, B. Aceites esenciales en el control de las patologías aviares. Colombia, Universidad de Córdoba. 8 p
6. Jiménez, F. 1988. *Parásitos y enfermedades de la tilapia*. México, UANL. 109 p.
7. Robles, P. 2005. Manual de operaciones del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales: PEO extracción fraccionada, PEO concentración usando rotavapor, PEO extracción de aceites esenciales por Neoclevenger. Guatemala, USAC. p. 1-3.
8. Miskovsky, P. 2002. Hypericin: a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Drug Targets* 2002 (3):55-84.
9. Mitscher LA; Darker, S; Gollapudi, A. 1987. A modern look at folkloric use of anti infective agents. *Journal Nature* 1987 (5):1025-1041.
10. Núñez, M; Pozo, M; Valladares, J. 2002. Concentraciones inhibitorias de tres extractos de plantas medicinales sobre bacterias del género *Aeromona*, causantes de enfermedades en peces. *Aqua TIC* 14: 23-28

11. Oberhelman, RA; 2000. Taylor DN: *Campylobacter* infections in developing countries. Washington, American Society for Microbiology. 402 p.
12. Pozo, M. 2006. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología para el curso de diagnóstico de enfermedades en organismos acuáticos. CIVA 2006: 1065 – 1086.
13. Prieto, A; Ocampo, A; Fernandez, A; Perez, M. 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potenciales de uso en Cuba y México. Revista Especializada en Ciencias Químicas y Biológicas 8 (001): 38-49 p.
14. Reichenbach, H. 1982. Enfermedades en los peces. España, Acribia. 133 p.
15. Silveira, R. 2006. Los productos fito-farmacéuticos en la acuicultura. REDVET 08: 1-8.
16. Silveira, R. 2000. Actividad terapéutica de extractos naturales de origen vegetal para el control de parásitos y bacterias de organismos acuáticos de cultivo. Guatemala, Memorias de II simposio Nacional de Acuicultura y Pesca. 23 p.
17. Tegos, G. 2000. Multidrug puma inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrobial Agents 46:3133-3141.
18. Villamar, CA. 2000. Acuicultura orgánica ecológica: aplicación de productos naturales en sustitución de químicos en los procesos de cría de camarones en cautiverio. AquaTIC 10:27-30
19. Yildirim, A. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC) sage (*Salvia triloba* l) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. Journal Agriculture Food Chemistry 48:5030-5034.
20. Zarzuelo, EP. 1981. Principales enfermedades infecciosas de los peces. España, Aedos. 52.

ANEXO