

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EFFECTO DEL EXTRACTO DE “AJO” *Allium sativum* COMO FUNGICIDA
NATURAL DE *Saprolegnia sp* AISLADO DE OVAS DE “TRUCHA ARCO IRIS”
Oncorhynchus mykiss EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. ALLAN STEVE ÑAHUINCOPA VERGARA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LINCENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
 FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
 ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

EFFECTO DEL EXTRACTO DE “AJO” *Allium sativum* COMO FUNGICIDA NATURAL DE *Saprolegnia sp* AISLADO DE OVAS DE “TRUCHA ARCO IRIS” *Oncorhynchus mykiss* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

PRESENTADA POR:

Br. ALLAN STEVE ÑAHUINCOPA VERGARA
 PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
 LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACION: 21 DE JULIO DEL 2017

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE

:

Ing. M.Sc. Félix Rodolfo Meza Romualdo

PRIMER MIEMBRO

:

M.Sc. Dante Joni Choquehuanca Panclas

SEGUNDO MIEMBRO

:

Blgo. Herminio Rene Alfaro Tapia

DIRECTOR DE TESIS

:

M.Sc. Alfredo Ludwig Loza del Carpio

ASESOR DE TESIS

:

Ing. M.Sc. Edwin Federico Orna Rivas

ASESORA DE TESIS

:

Blgo. Maritza Sosa Ugarte

Área: Pesquería.
 Línea: Acuicultura.
 Tema: Sanidad pesquera.

DEDICATORIA

A mi padre Serafín Ñahuincopa García por darme la vida y por sus consejos, cariño y enseñanzas en un determinado tiempo.

A mi madre Ana Graciela Vergara Almonacid a quien le estaré eternamente agradecido por estar a mi lado en mis mejores y peores momentos y a quien le debo ser el profesional que soy hoy en día, quien siempre está a mi lado confiando, apoyándome y guiándome es este camino tan difícil llamado vida para hacer de mí la persona que siento que soy lleno de valores y principios éticos y morales.

A mis hermanos Lourdes María, Ana del Carmen y Jean Pierre quienes a pesar de la distancia siempre están pendientes de lo que acontece en mi vida y en la familia.

A mis sobrinos Emily, Linda, Wendy, Gina, José, Dayana, Kevin y Josue por su cariño.

A mis amigos Alfredo Loza, Edwin Orna, Maritza Sosa, Milton García, Laura Alcon, José Salazar y Mariela Carpio por su constante apoyo y cariño.

A Emma por su amor sincero, por ser la persona ideal y el complemento en mi vida que por mucho tiempo espere, gracias por compartir los mismos sueños de una hermosa vida.

Allan Steve.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia por su constante apoyo y preocupación en el desarrollo de mi tesis.
- A los docentes de la FCCBB a quienes les debo mi formación académica y por quienes aprendí a diferenciar a lo largo de mis estudios a los buenos de los malos profesionales.
- A mis ex docentes y ahora amigos Alfredo Loza, Edwin Orna, Rene Alfaro, Sabino Atencio y Belisario Mantilla a quienes les debo mi admiración y respeto, agradeciendo gran parte de mi formación profesional y a sus consejos brindados de manera desinteresada a lo largo de estos años.
- A la Blgo. Maritza Sosa quien además de ser una gran amiga gracias a sus consejos, conocimientos y apoyo constante se pudo ejecutar en su laboratorio clínico la parte experimental de mi tesis.
- A la técnico de laboratorio Sra. Dominga Enriquez, quien labora en el Laboratorio de Análisis Clínicos MEDILAB, agradecido por su apoyo en los procedimientos de laboratorio para el desarrollo de mi tesis.
- A mis amigos Milton, José, Omar, Wilman, Laura y Mariela por su constante apoyo desinteresado en la elaboración y ejecución de mi tesis.
- A todos mis amigos que laboran como trabajadores administrativos de la FCCBB, en especial a Irma y Jacinto por su preocupación, y apoyo constante en el desarrollo de mi tesis.
- A una amiga muy especial, Evenly a quien le tengo un gran cariño y aprecio, muchas gracias por todo.

Mil Gracias...

Allan Steve.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	9
I. INTRODUCCION	10
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 ANTECEDENTES.....	12
2.2 MARCO TEÓRICO.....	14
2.2.1 Características de la Bioecología de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	14
2.2.2 Características de la Bioecología de <i>Saprolegnia</i>	16
2.2.3 Características de la bioecología de <i>Allium sativum</i>	21
2.3 MARCO CONCEPTUAL.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 METODOLOGÍA	24
3.1.1 Ubicación de estudio.....	24
3.1.2 Método para la obtención del extracto de <i>Allium sativum</i>	24
3.1.3 Método para la obtención y cultivo de <i>Saprolegnia</i>	26
3.1.4 Método para la preparación de los medios de cultivo.....	27
3.1.5 Método para la preparación de las concentraciones del extracto de ajo .	28
3.1.6 Aplicación de los tratamientos del extracto de ajo.....	29
3.1.7 Determinación del tiempo de inhibición del extracto de ajo en <i>Saprolegnia</i>	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO EFICIENTE FRENTE A <i>Saprolegnia</i>	32

4.2.	EVALUACIÓN DE LA DOSIS MÁS ADECUADA PARA EL CONTROL DE <i>Saprolegnia</i>	33
4.3.	EVALUACIÓN DEL TIEMPO QUE REQUIERE EL EXTRACTO DE <i>Allium sativum</i> PARA MANIFESTAR SU EFECTO CONTROLADOR EN <i>Saprolegnia</i>	41
V.	CONCLUSIONES	43
VI.	RECOMENDACIONES	44
VII.	BIBLIOGRAFÍA	45
	ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Método de preparación de las concentraciones <i>Allium sativum</i> en porcentajes (%)	29
Tabla 2. Concentraciones porcentuales (%) utilizadas para las cinco repeticiones. ..	30
Tabla 3. Efecto de la inhibición de <i>Saprolegnia sp</i> por <i>Allium sativum</i>	32
Tabla 4. Cantidades de extracto de ajo obtenidas de un Kg por las tres metodologías.	33
Tabla 5. Efecto del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Saprolegnia sp</i> , a las 24 horas....	33
Tabla 6. Efecto del extracto de <i>Allium sativum</i> en <i>Saprolegnia sp</i> , a las 48 horas....	34
Tabla 7. Estadísticos descriptivos de la inhibición de <i>Saprolegnia</i> (mm) por <i>Allium sativum</i> a 24 horas.	35
Tabla 8. Estadísticos descriptivos de la inhibición de <i>Saprolegnia</i> (.mm) por <i>Allium sativum</i> a 48 horas.	35
Tabla 9. ANOVA 24 horas.	35
Tabla 10. ANOVA 48 horas.	35
Tabla 11. Prueba de Tuckey para la significancia entre concentraciones a 24 horas. .	36
Tabla 12. Prueba de Tuckey para la significancia entre concentraciones a 48 horas. .	36
Tabla 13. Parámetros de confianza utilizando el modelo Probit a 24 horas.	37
Tabla 14. Parámetros de confianza utilizando el modelo Probit a 48 horas.	37
Tabla 15. Chi cuadrado a 24 horas.....	37
Tabla 16. Chi cuadrado a 48 horas.....	38
Tabla 17. Estadísticas de grupo para mostrar diferencias entre 24 y 48 horas.	41
Tabla 18. Prueba T para igualdad de medias.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación gráfica para la determinación de DL50 a 24 horas de evaluación.	38
Figura 2. Regresión polinómica entre la inhibición y las concentraciones de ajo a 24 horas.	39
Figura 3. Representación gráfica para la determinación de DL50 a 48 horas de evaluación.	39
Figura 4. Regresión polinómica entre la inhibición y las concentraciones de ajo a 48 horas.	40
Figura 5. Grafica diferencial entre promedios de inhibición a las 8, 16, 24 y 48 horas.	42

RESUMEN

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción de Bienes y Servicios - Chucuito (CIPBS), Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad de la Facultad de Ingeniería Química de Nacional del Altiplano-Puno y la experimentación se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos MEDILAB de la ciudad de Puno durante los meses de Marzo a Octubre del 2015, siendo el objetivo principal: Evaluar el efecto que produce el extracto de “ajo” *Allium sativum* en el control del crecimiento de *Saprolegnia sp* en condiciones de laboratorio. Una vez obtenidos los extractos y para descartar que no resultaron eficientes en la investigación se experimentaron las concentraciones puras es decir al 100% de las tres metodologías utilizadas, obteniendo la metodología eficiente se consideraron en total 05 tratamientos con 05 repeticiones, adicional a ello se tuvo una placa control por cada repetición, y para medir el tiempo en el cual causa efecto inhibitor se procedió a observar el crecimiento de *Saprolegnia* en la placa Petri desde iniciado el cultivo durante 8,16,24 y 48 horas, se validaron los resultados utilizando la prueba estadística de ANOVA, mediante el programa SPSS V24. Los resultados indican que la mejor solución para inhibir el crecimiento del hongo en condiciones de laboratorio fue el que corresponde al tratamiento con el extracto obtenido mediante el método convencional, se experimentaron 9 concentraciones porcentuales(6.25, 12.5, 25, 50, 60, 70, 80, 90 y 100) obteniendo como resultados positivos las concentraciones a partir del 60% y superiores en el control del crecimiento del hongo *Saprolegnia*, logrando un promedio del diámetro total del halo de inhibición de 44.48mm en la concentración del 100% , mediante la prueba probit se determinó la DL50 (Dosis Letal Media), se obtuvo como resultado una concentración del extracto de ajo de 70.36%, a las 24 horas y de 68.34% a las 48 horas de efecto inhibitor, con base en los resultados el ajo resulta tener un efecto inhibitor eficiente en el hongo en las primeras 24 horas, la concentración más eficiente de acuerdo al diámetro total del halo de inhibición fue la de 100% considerándose la *Saprolegnia* sensible frente a este tratamiento.

Palabras clave: Concentración, tratamiento, halos de inhibición, diámetro total.

I. INTRODUCCION

El uso de la medicina tradicional ha tenido altas y bajas en el mundo occidental, sin embargo, a pesar del empuje de la medicina moderna, siempre hay un regreso a los orígenes, resurgiendo la medicina natural en forma de medicina homeopática, naturista, herbolaria y medicina tradicional o alternativa. Si bien el uso de plantas medicinales en el ser humano está muy bien documentado en la literatura científica, en animales la información es más escasa y más aún en animales acuáticos.

La Saprolegniasis ejerce una importante pérdida en la truchicultura especialmente en el estadio de ovas, provocando esencialmente afecciones en el corion o huevo causando la mortalidad de los mismos (Klauer y Zevillanos, 2004), sin menospreciar el daño que causa en todo el proceso productivo de la trucha arco iris, teniendo como resultados daños visibles en la piel y tejidos adyacentes, esta situación da lugar a una pérdida que sin tratamiento alguno pudiera ser considerable en la producción de trucha arco iris.

El departamento de Puno es el mayor productor de truchas en el país estimándose un promedio de 42,155.380 Tn en el año 2016, y también el mayor importador de ovas embrionadas del país estimándose en 176,921.000 millares (DIREPRO 2016) al ocupar estos primeros lugares es que continuamente tropieza con dificultades que disminuyen la producción y productividad; también los factores socioeconómicos y medioambientales repercuten con efectos negativos al incrementar los costos de producción.

La investigación adquiere importancia al permitir evaluar el efecto del extracto de ajos en el control del crecimiento de *Saprolegnia sp* en condiciones de laboratorio, los resultados coadyuvaran al conocimiento actualizado e importancia acerca de este controlador natural de *Saprolegnia sp*; razón por la cual uno de los componentes de la estrategia global se basa específicamente en cultivar cierta cantidad de ovas con aparentes signos de *Saprolegnia sp* en condiciones de laboratorio, para luego poder aislar al hongo y en las condiciones más estrictas de asepsia poder causar un efecto que permita neutralizar su crecimiento o inhibirlo por completo, por tanto también servirá de soporte para posteriores investigaciones y atenuar la infestación de este hongo oportunista de esta manera se evitaban pérdidas de producción y productividad en nuestro departamento.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto que produce el extracto de *Allium sativum* “ajo” en el control del crecimiento de *Saprolegnia* cultivada en condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cuál método del extracto de ajo (Arrastre de Vapor, Hidrodestilación, Convencional) tiene efecto controlador en el crecimiento de *Saprolegnia sp* cultivada en condiciones de laboratorio.
- Establecer las dosis porcentuales más adecuadas y el método más eficiente para el control de *Saprolegnia sp* cultivada en condiciones de laboratorio.
- Determinar el intervalo de tiempo que requiere el extracto de ajo para manifestar su efecto en el control de *Saprolegnia sp* cultivada en condiciones de laboratorio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES

Bergner (2005), asevera que el ajo es utilizado para prevenir y tratar infecciones, siendo objeto de investigación en el siglo pasado debido a su poder antimicrobiano, y descubrieron que es efectivo contra muchos microorganismos. También han encontrado que el ajo no solo inhibe, sino que también fortalece y activa el sistema inmunológico. Algunos hongos, mohos que el ajo o sus componentes inhiben son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Candida lipolitica*, *Cryptosporidium sp*, *Histoplasma capsulatum*, Rhinovirus, *Mycobacterium pblei*, *Micobacterium tuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae*; del mismo modo, Domingo (2003) indica que las sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado, a lo largo de la historia existen ejemplos documentados, como son las figuras de Hipócrates en la medicina griega, Avicena en la árabe y Paracelso en la centroeuropea, que fueron auténticos especialistas en la aplicación de las plantas en la medicina.

Apaza y Medina (1992), en el proceso de incubación de ovas, determinaron que el 70% se encontraban contaminados por *Saprolegnia*, determinaron como principales fuentes de contaminación, la manipulación, el agua y la temperatura, para el tratamiento profiláctico se consideraron tres productos químicos dando como resultado ovas viables, el Verde de Malaquita a concentraciones de 2ppm, alcanza un 64.98% de inhibición; Cloruro de Sodio 44.85%; Formalina 48.01%, con un coeficiente de variabilidad del 6.67%; para el caso anteriormente expuesto, Condori (2007), realizó estudios en jaulas del PETT-Puno y estanques del CIPP-Chucuito de Puno, donde encontró que los hongos patógenos más prevalentes en estos sistemas de crianza de reproductores de trucha arco iris son los hongos de la especie *Saprolegnia spp* con un 97.9% y los hongos de la especie *Penicillium piscium* con 2.1%, para el tratamiento, Condori (2015), quien hizo estudios en el CIPP-Chucuito y el laboratorio de Microbiología de los alimentos de la FCCBB de la UNA-Puno, afirma que la eficacia del *Allium sativum* frente a *Saprolegnia* fue con la concentración de 6% con un 70% de mortandad, la de 8% obtuvo 55% de mortandad y la de 10% obtuvo un 41.66% de mortandad.

Gundogdu *et al.*, (2009), probaron la adición de diferentes concentraciones de ajo a yogurt asentado y batido para determinar el efecto de éste en los parámetros físicos, químicos, microbiológicos y sensoriales durante su almacenamiento, los resultados reflejaron una ausencia de mohos y levaduras en el yogurt, además, la adición de ajo no provocó cambios significativos en la acidez, contenido de grasa, proteínas ni acetaldehído y mejoró su conservación hasta por 18 días; Harris *et al.*, (2001), indica efectivamente que los extractos de ajo disminuyen su absorción de oxígeno, reducen su crecimiento, inhiben la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y dañan sus membranas y refiere que el componente principal del ajo que inhibe el crecimiento de los hongos es la alicina.

Ledezma *et al.*, (2000), afirman que en los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del ajo tienen un importante efecto antimicótico, atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como contra dermatofitos y *Paracoccidioides brasiliensis*; la alicina, aunque es efectiva, ve limitado su uso por su inestabilidad, en contraste, el ajoeno, producto de la degradación de la alicina, es un compuesto más estable y la formulación tópica para el tratamiento de *Tinea pedis*, *cruris* y *corporis* ha mostrado resultados importantes. Prieto *et al.*, (2005), recomienda el ajo machacado fresco, ya que la presencia de átomos de azufre en las moléculas, tanto de la fracción liposoluble (aleína) como en la hidrosoluble (alicina), son utilizadas como fungicidas en las dermatomicosis por *Saprolegnia parasitica* en dosis de 200 mg/L de agua, en tratamientos de 5 días con una efectividad del 100%, o bien deshidratado con una efectividad del 80%.

Santos (2010), En Brasil demostró que el extracto de ajo, tuvo un efecto de inhibición significativa en el crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en un 99% y a una concentración de 50000 mg/L, con una reducción de hasta 90%, en la inhibición de las colonias cultivadas in vitro. Viegas *et al.*, (2005), comprobaron que el aceite esencial de ajo promovió zonas de inhibición que oscilaban entre 7,0 y 15,0 mm; pero el 34% de los aislamientos, los halos eran mayores a 12,0 mm de diámetro, inhibiendo el crecimiento in vitro de las colonias de *Aspergillus flavus*.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Características de la Bioecología de *Oncorhynchus mykiss*

2.2.1.1 Clasificación taxonómica de la trucha arco iris (Ruiz 1995; Froese & Pauly 2011; y Skelton, 2001)

DOMINIO	: Eucarya
REYNO	: Animalia
PHYLUM	: Chordata
SUBPHYLUM	: Vertebrata
SUPERCLASE	: Gnathostomatha
CLASE	: Osteichtia
SUBCLASE	: Actinopterygii
SUPERORDEN	: Teleostei
ORDEN	: Salmoniformes
FAMILIA	: Salmonidae
GÉNERO	: <i>Oncorhynchus</i>
ESPECIE	: <i>Oncorhynchus mykiss</i>
NOMBRE CIENTÍFICO	: <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Smith, Gerald, Stearley, 1989)
NOMBRE COMÚN	: “Trucha arco iris

2.2.1.2 Biología de *Oncorhynchus mykiss*

Especie de aguas continentales que vive en ambientes loticos y lenticos, presenta un cuerpo fusiforme, de color plateado y la parte ventral de color crema; en el dorso como en los flancos presenta manchas y lunares negros y marrones, en la línea lateral tiene el color rojizo iridiscente, de ahí el nombre arco iris, sexualmente se les diferencia porque el macho es de cuerpo más delgado, la cabeza de forma triangular con la mandíbula inferior más prolongada y en forma de pico invertido mientras que la hembra tiene la cabeza ovalada y el cuerpo más voluminoso (Mantilla, 2004; Pérez, 1982). Los machos de *Oncorhynchus mykiss* siempre son de mayor tamaño, la reproducción de los salmónidos es cíclica, (una vez al año) y en una época determinada (Blanco, 1994), es un pez mandibulado, el borde principal del maxilar se extiende hasta detrás del ojo en el adulto. Su piel consta de una fina epidermis con la presencia de escamas cicloideas,

glándulas y cromatóforos; el dorso es de color azulado-oscuro, debido a la presencia de melanóforos, la parte ventral es de color blanco por la presencia de guanóforos o iridocitos, a su vez influenciado por el medio en el que vive (Silvera, 1997).

El modo de cultivo de trucha arco iris, la calidad del agua (saturación de oxígeno, ausencia de contaminantes), la cantidad y calidad de los alimentos distribuidos, influirán en la calidad de los gametos, de la que dependerá la supervivencia embrionaria y pos embrionaria, e incluso la calidad del alevín (supervivencia y aptitud para el crecimiento) (Barnabé, 1991); se reproduce entre enero y marzo (algo después que la trucha común) y su alimentación se basa en larvas de invertebrados, aunque también puede comer otros peces de pequeño tamaño. En lo que respecta a su origen, es autóctona de ríos afluentes del río Sacramento, en Norteamérica. Su área natural son las aguas vertientes al Pacífico desde el sur de Alaska hasta California. Fue introducida por primera vez en Europa en el año 1860 en Dinamarca y en España en 1885. Se reproduce en libertad solo de forma esporádica y puntual por lo que se conocen pocos datos (Sánchez, 2004).

2.2.1.3 Proceso de reproducción

El proceso de reproducción de la trucha dependiendo del tiempo de vida puede ser clasificado dos formas: la reproducción natural en la cual se encuentran libres en la naturaleza, emigran a las cabeceras de los ríos donde encuentran aguas más limpias para poder reproducirse, las hembras cavan un hoyo para depositar los huevos que son fecundados por el macho y luego estos son cubiertos con arena hasta su eclosión (Blanco, 1994); la reproducción artificial, en la cual se debe tener un buen plantel de reproductores, se extraen los gametos sexuales en un ambiente adecuado y con poca presencia de luz, se contemplan dos métodos, el seco y el húmedo, una vez fecundadas se espera en promedio 30 días dependiendo principalmente de la temperatura para que puedan eclosionar las larvas (Alcon, 2014).

Los peces que muestren mayor desarrollo en la etapa de crecimiento serán considerados los más idóneos para mantener una buena calidad de reproductores, cuando son alevines y juveniles es difícil diferenciar hembras de machos, (a este fenómeno se denomina gonocorismo indiferenciado), a partir de los 200 gr y con tallas de 23 cm comienza el dimorfismo sexual, presentándose características específicas en cada uno, para el procedimiento de desove, la cabeza del pez debe estar apoyada sobre el antebrazo derecho del técnico, y así presionar el abdomen tanto del espécimen macho como de la hembra

para obtener los gametos, normalmente la proporción de hembras desovadas por macho es de 3 a 1, pudiendo aumentar o disminuir este dato (Klauer y Zevillanos, 2004), en el proceso de maduración sexual los machos tienden a una coloración más acentuada durante la época de reproducción que en las hembras, especialmente en la franja iridiscente. El poro genital en las hembras es de forma redonda de color rojizo-turgente y el vientre se nota abultado por los huevos; mientras que el poro genital de los machos es de forma ovoidal (Mantilla, 2004).

Existen dos métodos que se aplican actualmente para realizar la fecundación artificial: El método seco o de Wvaski y el método mixto aplicando solución salina; en el primero no se adiciona agua y por ende el porcentaje de fecundación es elevado; todo depende de un buen manejo por parte del personal técnico, ya que cualquier tipo de contaminación interna o externa pueden ocasionar la obstrucción del ingreso de los espermatozoides a los ovulos y la no fecundación de estos. Por este inconveniente es recomendable aplicar el método mixto con solución salina (permite lavar las impurezas) y que ofrece mejores resultados (Klauer y Zevillanos 2004). Los huevos tardan en eclosionar entre 3 a 15 días dependiendo de la temperatura en este lapso se va extrayendo los huevos muertos con una bombilla para evitar la contaminación de los huevos sanos luego pasan a la fase larvaria (Mendoza y Palomino, 2004).

2.2.2 Características de la Bioecología de *Saprolegnia*

2.2.2.1. Clasificación taxonómica (Guarro *et al.*, 1999)

DOMINIO	: Eucaryota
REINO	: Protista
DIVISION	: Oomycota
PHYLUM	: Heterodonta
CLASE	: Oomycotea
ORDEN	: Saprolegniales
FAMILIA	: Saprolegniaceae
GENERO	: <i>Saprolegnia</i>
ESPECIE	: <i>Saprolegnia sp</i>
NOMBRE CIENTIFICO	: <i>Saprolegnia sp</i> (Seymour 1970)

2.2.2.2 Descripción de *Saprolegnia*

Es un patógeno secundario porque invaden las lesiones producidas por un manejo inadecuado, por lesiones ocurridas en su medio o asociados a enfermedades víricas o bacterianas (Roberts, 1981), es una enfermedad infecciosa producida por varios hongos, principalmente oomicetos representantes del grupo de los Saprolegniales. Las especies más frecuentemente son: *Saprolegnia* (*S. parasítica*, *S. diclina* y *S. ferax*, principalmente), *Achlya* y *Aphanomyces* (Pasquel, 2001), son los hongos de mayor importancia en la patología de los peces de agua dulce (Roberts, 2001; Perez, 2002). La saprolegniasis es una enfermedad cutánea, cuyo agente patógeno es el más importante en la patología de la trucha arco iris (Mantilla, 2004), esta especie de hongos se encuentran distribuidos en ambientes acuáticos, puede ser tanto saprófito como parasitoide, alimentándose así de células muertas o parasitando a peces como la trucha y el salmón, instalándose así en sus agallas, son tolerantes a grandes rangos de temperatura desde 3 a 33°C y se encuentra preferentemente en el agua, aunque también puede habitar en suelo húmedo (Bruno *et al.* 2010).

Su ciclo de vida diploide el cual incluye la reproducción sexual y asexual. En la fase asexual, se produce la diferenciación de esporangios en el extremo de las hifas somáticas. Una espora de *Saprolegnia* liberará una primaria zoospora a los pocos minutos, esta zoospora se enquistará, germinará y liberará otra zoospora. Esta segunda zoospora tiene un largo ciclo durante el cual ocurre la mayor dispersión; esta continuará enquistada y liberará una nueva espora en un proceso llamado poliplanetismo hasta que ella encuentre un sustrato conveniente, Cuando un medio conveniente, es encontrado, las hifas alrededor de la espora se sueltan sobre el sustrato comenzando así la fase sexual (Pasquel, 2011), en esta fase es el momento en el cual puede causar la infección. Una vez que esté firmemente atada, la reproducción sexual empieza con la producción de gametangios femeninos y masculinos, oogonia y anteridia respectivamente, estas se unen y se fusionan a través de la vía de fertilización en tubos y el ciclo producido se denomina oospora (Mamani, 2011).

2.2.2.3 Forma de infección y características de la enfermedad

La *Saprolegnia* es considerada generalmente un patógeno secundario, también puede actuar como primario, atacando a través de sus esporas los tejidos epidérmicos, comenzando generalmente por la cabeza y las aletas, extendiéndose por toda la superficie

del cuerpo, causando necrosis celular con daño cutáneo y epidérmico; atacan a ovas de peces en incubación, cuando se presentan mortalidades por ovas débiles o no fecundadas, el hongo penetra la membrana afectando la ova, y se produce la proliferación a través del agua a otras más cercanas, causando la muerte (Romero, 2003), la enfermedad presenta una distribución mundial que afecta principalmente a los peces de agua dulce y es diagnosticada con frecuencia en los países de la mitad norte del hemisferio boreal, que es el hábitat natural de los salmónidos, no obstante se ha encontrado esta infección en peces que viven en agua de baja salinidad (Wood y Willoughby, 1986), en los peces afectados por saprolegniasis ocurre depleción del número de leucocitos circulantes, heterofilia y cierta inmunodepresión lo que favorecería el curso de esta enfermedad (Alvarez *et al.*, 1988).

En las ovas, la infección se inicia en ovas infértiles o no viables, desde la cual se traspa a ovas sanas pudiendo llegar a producirse una pérdida total de ellas (Stoskopf, 1992; Perez, 2002), los daños externos producidos por heridas, parásitos o enfermedades que afectan a la piel puede abrir la vía de infección por el hongo *Saprolegnia*, a peces de cualquier edad y a cualquier temperatura. Los síntomas incluyen manchas o “copos”, masas blancas o filamentos sobre la piel, pueden ser pequeños o estar confinados en la base de la aleta o pueden ser extensivas; en casos graves la trucha puede volverse apática, perder el apetito y morir, pero generalmente no es una enfermedad grave (Stevenson, 1985).

2.2.2.4 Tratamientos

Para la profilaxis, desinfección y control de infecciones micóticas en peces criados en sistemas controlados, los más utilizados en algún momento fueron el verde de malaquita, formalina, peróxido de hidrogeno permanganato de potasio, ácido acético y yodo; el más eficaz fue el verde malaquita pero por su toxicidad y efectos secundarios su uso en la actualidad es inviable, lo que incentiva investigaciones en productos eficaces no tóxicos para animales y el medio ambiente (Fuangsawat *et al.*, 2011), el uso de productos químicos o no químicos son necesarios cuando se diagnostica a tiempo el patógeno; en la industria salmonera y otros peces, existe amplia variedad de antifúngicos, pero pocos productos químicos fueron aprobados para el uso en la acuicultura en los Estados Unidos y por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) (Meyer, 1991), existen baños de corta duración en disoluciones concentradas y de larga duración en disoluciones diluidas,

las truchas permanecerán sumergidas en una disolución de verde malaquita de 1gr/180 litros de agua. El tratamiento más frecuente para las ovas ojo es preparar una disolución al 2% y utilizar la dilución adecuada de esta añadiendo directamente al agua que pasa a través de las bandejas de incubación (Godoy, 2002).

Chakroff (1983), al contacto con el aire libre la infestación fúngica por *Saprolegnia* produce alteraciones en los huevos y crías de peces, produciendo: muerte de los huevos por fungosis incipiente, revestimiento algodonoso de los huevos que se ponen en contacto con el aire e infestación fúngica por saprolegniasis, manchas blancas de vitelo, reblandecimiento de los huevos y formación de huecos. Si la materia en suspensión constituye un problema, las condiciones de la sala de incubación son importantes antes de que se produzca la eclosión, la cubierta de los huevos pueden servir como foco de infección para la multiplicación de hongos y parásitos si no se extrae con regularidad; del mismo modo Del Valle (1990), menciona dos métodos para prevenir esos ataques de hongos: uno se basa en la extracción de los huevos muertos y el otro en la adición al agua de incubación de una sustancia con efectos fungicidas a modo de tratamiento y así evitar la proliferación de hongos, se debe iniciar desde el primer día hasta el momento de la eclosión, el tratamiento se realiza en forma inter diaria.

Huet (1983), efectivamente la mortalidad de peces puede ser provocada por enfermedades, por la contaminación del agua, la saprolegniasis son unas manchas algodonosas de color gris-blanco o ligeramente parduzco sobre la piel, aletas, boca, branquias y huevos totalmente blancos; del mismo modo Laura *et al.*, (1991), refiere la existencia de dos géneros: *Saprolegnia* en un 70% y *Achlya* en 30%, no descartándose la existencia de otros géneros. El índice de infestación en ovas embrionadas sin profilaxis alcanzo el 81.97%. La temperatura es el factor más importante que influye en la proliferación de hongos saprolegniaceos, la cual es de 12.38°C como promedio. En los ensayos de tratamiento profiláctico, la obtención de ovas viables fue de 64.98% para la solución de verde malaquita a 2 ppm, siendo el más recomendable para la desinfección durante la incubación, reiterando que este producto fue retirado debido a sus propiedades cancerígenas.

Leodo (2000), es un hongo que pertenece a la clase de los ficomicetos. Tiene un cuerpo formado por filamentos. Este hongo tiene dos formas de reproducirse: Una sexual y otra asexual. En el proceso asexual se producen esporas dentro de un receptáculo llamado

esporangio el cual está ubicado en la punta de una de las hifas. Estas esporas son desnudas, ciliadas, móviles y reciben el nombre de zoosporas; así comenta Mantilla (2004), es frecuente la infección en todo el ciclo productivo, los hongos invaden las ovas muertas y se extienden hasta asfixiar y matar los huevos adyacentes, también este hongo puede invadir cualquier pequeña herida en los peces lo que continuamente sucede en la manipulación, se reportaron dos principales enfermedades micóticas en la trucha arco iris: La saprolegniasis, que es una enfermedad cutánea, y la Ictiofonus que se constituye como una enfermedad sistémica.

Manzano *et al.*, (2008), la farmacoterapia eficaz contra los hongos plantea problemas especiales; dado que éstos pertenecen a los eucariotes, por lo que la mayor parte de su maquinaria celular es similar a la del hombre y los animales, los agentes farmacológicos que afectan rutas metabólicas en hongos a menudo interfieren con las correspondientes rutas en las células hospederas, de ahí la toxicidad de estos medicamentos; es así que Marking *et al.*, (1994), da como principales problemas en la acuicultura el tratamiento contra la *Saprolegnia sp* en trucha arco iris, desde que el verde de malaquita ha sido prohibido en la mayoría de los países productores de salmones, debido a sus propiedades cancerígenas. Actualmente se está sustituyendo su uso por un compuesto denominado bronopol, sin embargo, sigue la búsqueda de compuestos alternativos de menor contenido químico.

Meyer (1991), indica que la micosis de los peces constituyen uno de los aspectos más confusos y menos explorados de la ictiopatología, las cuales producen grandes pérdidas económicas en acuicultura, menores solo a las pérdidas producidas por bacterias; es por ello que Perez (1982), manifiesta que las lesiones se presentan como crecimiento algodonoso grisáceo. El crecimiento del hongo puede ser leve en la superficie pero en casos extremos puede llegar hasta la masa muscular. La duración del proceso del desarrollo del hongo en los huevos depende de muchos factores, entre los cuales predomina la temperatura, durante la incubación, con frecuencia y regularidad debe eliminarse aquellos que vayan muriendo de no ser así atacaran a los huevos sanos.

Pettranchini (2002), los hongos son eucariotas heterótrofas constituidas por hifas o filamentos que pueden juntarse formando un tallo, característica semejante a las algas. Los grupos de hifas se denominan micelio, su alimentación se da por saprofitismo, parasitismo o simbiosis, el tamaño es muy variable desde visibles por microscopio a

centímetros, la reproducción puede ser sexual o asexual; Romero (2003), toda causa de mortalidad, se puede evitar utilizando medidas profilácticas adecuadas desde el inicio del proceso de incubación, así como mantener desinfectados los sistemas de incubación y materiales a utilizar.

Ronald (1981), manifiesta, que la *Saprolegnia* es invasor habitual de los huevos de peces, en la incubación, infección que normalmente se establece sobre los huevos muertos y que se extienden desde ellos a los huevos sanos más próximos; Santiago y De Ambrosio (2000), manifiestan que las ovas muertas deben ser retiradas diariamente de las bandejas de incubación moviendo las propias ovas lo menos posible para evitar incrementar la mortalidad. La retirada diaria de ovas muertas evita tener que utilizar baños químicos para el tratamiento y previene posibles efectos negativos en la tasa de eclosión; Yukiya y Zevallos (1994), indica que toda una serie de ficomicetos y de hongos imperfectos, forman parte en ciertas enfermedades de los peces, aunque en muchos no se haya comprobado su papel etiológico primario. No obstante las enfermedades micóticas, mas importantes de los peces teleósteos son aquellas micosis tegumentarias que provocan los hongos del orden saprolegniales que existen en el agua, algunas clases pueden ser parasitadas en los peces.

2.2.3 Características de la bioecología de *Allium sativum*

2.2.3.1 Clasificación taxonómica del ajo (Fonnegra, y Jiménez (2007)

DOMINIO	: Eukarya
REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Liliopsida
ORDEN	: Asparagales
FAMILIA	: Amaryllidaceae
SUBFAMILIA	: Allioideae
TRIBU	: Allieae
GÉNERO	: <i>Allium</i>
ESPECIE	: <i>Allium sativum</i>
NOMBRE CIENTIFICO	: <i>Allium sativum</i> (Linnaeus, 1753)
NOMBRE COMÚN	: ajo, ajos

2.2.3.2 Descripción del ajo

Su origen se ubica en Asia Central, en donde se utilizaba desde la más remota antigüedad. En China se conocía como componente medicinal importante. También se sabe que en Egipto alimentaban con ajos a los esclavos que construían las pirámides, porque se pensaba que les aportaba energía (López, 2007), en la actualidad se cultivan diversas variedades de ajos en numerosos países del mundo, entre los cuales se encuentran China, España, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Chile y Perú, el género *Allium* contiene más de 300 especies de plantas; entre ellas se encuentra el *Allium sativum*, que es un bulbo perteneciente a la familia *Liliaceae* y subfamilia *Allioideae*. Sus características olorosas le permiten su denominación con el uso del término *Allium* que significa “oloroso” en latín. Se caracteriza por tener una raíz bulbosa compuesta, de 6 a 12 bulbillos, reunidos en su base por medio de una película delgada para formar la “cabeza del ajo”. Cada bulbillo se encuentra envuelto por una hoja protectora blanca o rojiza, membranosa muy delgada. Los tallos de la planta crecen desde 40 a más de 55 centímetros de largo, terminando por las flores (Greco, 2011).

2.2.3.3 Propiedades antimicóticas del ajo

Arteche (1998), indica que hace más de 30 años se realizan estudios sobre la química y la farmacología del ajo, atribuyéndole numerosas propiedades entre las que destacan su acción antioxidante, hipolipemiente, antiterogénica, antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e inmunomoduladora; y todas estas propiedades se atribuyen principalmente a sus principios activos; según Bhandari (2012), El ajo contiene por lo menos 33 compuestos azufrados, varias enzimas, 17 aminoácidos y algunos minerales que contribuyen a su actividad antimicrobiana. De todas las especies de *Allium*, el ajo es el que contiene la mayor concentración de compuestos azufrados, lo que le da una actividad antimicrobiana muy potente. Los principales compuestos azufrados son la aliína, alicina, ajoeno, entre otros. Entre las enzimas importantes en la actividad antimicrobiana se encuentran la alinasa, peroxidasa y mirosinasa, el compuesto biológico más activo en el ajo es la alicina, que se genera por reacciones enzimáticas cuando el ajo se tritura o se corta como consecuencia de la ruptura celular causada por la trituración o el corte.

2.3 MARCO CONCEPTUAL

- **Antiséptico.** son sustancias antimicrobianas que se aplican a un tejido vivo o sobre la piel para reducir la posibilidad de infección, sepsis o putrefacción (Kinkelin, 2015).
- **Desove.** Extracción de gametos sexuales (Klauer y Zevillanos, 2004).
- **Etiología.** puede referirse al origen de la enfermedad. La palabra se usa para referirse a las causas de los fenómenos (Barnabe, 1991).
- **Infección.** el organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped, por lo que se califica al microorganismo como patógeno (Kinkelin, 2015).
- **Infestación.** Se denomina infestación a la invasión de un organismo vivo por agentes parásitos externos o internos, causando en muchas ocasiones la muerte del mismo (Kinkelin, 2015).
- **Inhibición.** disminución o ausencia de la respuesta inmunitaria del cuerpo (Barnabe, 1991).
- **Patógeno.** Un patógeno o agente biológico patógeno es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, un ser humano o un vegetal (Kinkelin, 2015).
- **Saprolegnia.** Hongo perteneciente a la clase de los Oomicetos, oportunistas que causan enfermedades micóticas a los peces produciendo una masa algodonosa alrededor del tejido dañado (Mantilla, 2004).
- **Saprolegniasis.** Enfermedad de origen fúngico (Blanco, 1994).
- **Teratógeno.** Agente capaz de causar un defecto congénito (Kinkelin, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Ubicación de estudio

a. Fase de laboratorio

Los estudios en base a la obtención de los extractos de ajo se realizaron en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno (Figura 7), así también la preparación de las diluciones, aislamiento y cultivo del hongo y de las pruebas experimentales con el extracto de ajos se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos MEDILAB también ubicado en la ciudad de Puno (Figura 8).

b. Fase de campo

Los estudios para la obtención de las ovas con aparente infección por *Saprolegnia* se llevaron a cabo en el Centro de Investigación y Producción de Bienes y Servicios-Chucuito (CIPBSCH), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno, ubicado en el distrito de Chucuito. El distrito de Chucuito se encuentra ubicado al Sur de la provincia y departamento de Puno, tiene como capital a la ciudad de las Cajas Reales de Chucuito, situada en la gran meseta del Collao a orillas del lago Titicaca y se encuentra sobre la carretera Panamericana Sur, entre las coordenadas: 69°53'21'' de longitud oeste y 15°53'15'' de latitud sur del meridiano de Greenwich, a una altitud de 3871 msnm y a una distancia de 18 Km. de la ciudad y capital del departamento de Puno (Figura 6).

3.1.2 Método para la obtención del extracto de *Allium sativum*

Se experimentaron tres metodologías para la extracción de los principios antifúngico del ajo, los que incluyeron:

a. Método para la obtención del extracto de ajo por arrastre de Vapor

Se procedió al armado del equipo de extracción por arrastre de vapor(Figura 14), luego al descascarado o pelado de los ajos posteriormente a ello se pesaron en una balanza y se lavaron con abundante agua destilada, la cantidad que se utilizó fue de 1 kg, los cuales se cortaron a la mitad y se procedió a colocarlos en la bandeja interior del equipo de

extracción por arrastre de vapor al cual se le adicionó en la base 4 litros de agua desionizada, luego se cerró herméticamente y se encendió el equipo para que alcance un punto de ebullición (90°C) y comience la extracción mediante un proceso de condensación, el extracto resultante fue el conocido como agua floral acompañado de aceite esencial en mínima proporción, se colocó en frascos de color ámbar estériles para evitar el contacto directo con la luz. Para esta metodología así como para la segunda se dispuso la utilización de la indumentaria e implementos necesarios, es decir mandil blanco, guantes estériles, mascarilla nazobucal, mecheros conteniendo alcohol, agua destilada, agua desionizada, probeta de 100ml, frascos color ámbar, balanza, cuchillo, ajos, cámara fotográfica de 18mp y libreta de apuntes,

b. Método para la obtención del extracto de ajo por Hidrodestilación

Se procedió a armar el equipo de hidrodestilación (Figura 15) y posterior a ello se comenzó a descascarar o pelar los ajos y del mismo modo que el proceso anterior se pesaron en una balanza 250 gr. Los ajos se cortaron a la mitad y se colocaron en un matraz de capacidad de 1 litro al cual se le adiciono 500ml de agua desionizada, este procedimiento se repitió hasta llegar al total de 1 Kg. de ajo y 2 litros de agua desionizada, cabe resaltar que para este procedimiento también los ajos se lavaron con abundante agua destilada previo al corte, se dejó a fuego lento hasta alcanzar un punto de ebullición (75°C) y de esta manera el extracto resultante por el proceso de condensación se colocó en frascos de color ámbar estériles para evitar el contacto directo con la luz.

c. Método para la obtención del extracto de ajo convencional (extractor eléctrico)

Se procedió ordenar los materiales a usar (Figura 16), luego procedimos a pelar los ajos para luego pesar 1 kg se lavaron con abundante agua destilada y se introdujeron en un extractor eléctrico, de esta manera se obtuvo el zumo del ajo, luego pasó por un doble proceso de colación separando el bagazo restante del procedimiento anterior y así obtener el extracto más líquido posible que se colocó de inmediato en frascos de color ámbar estériles para evitar el contacto con la luz. En este tercer proceso se utilizaron mandil blanco, mascarilla nazobucal, guantes estériles, mecheros conteniendo alcohol, encendedor, probeta de 50ml, vaso de precipitado o Becker de 150ml, un extractor eléctrico de 800wt de potencia y dos coladores metálicos.

Para estos procedimientos no se realizaron diluciones, y se utilizaron solo concentraciones puras, es decir 100% para diferenciar y asegurarnos del efecto inhibitor de cada metodología de extracción.

Variables.

En este caso las variables a analizar fueron:

V.I.= Metodologías de extracción de ajo (3).

V.D= Inhibición en el crecimiento de *Saprolegnia*.

3.1.3 Método para la obtención y cultivo de *Saprolegnia*

Se procedió a colectar ovas muertas de trucha arco iris (figura 9) con aparentes signos de infestación por causa del hongo *Saprolegnia*, las muestras obtenidas se colocaron en un frasco estéril con agua de su mismo medio, es decir agua de la piscicultura que abastece a la sala de incubación (figura 10), luego mediante un proceso específico de cultivo in vitro en condiciones de laboratorio se procedió a la utilización de asas de kolle en argolla no calibrada y así cultivar las ovas en tres placas Petri que contenían el medio de cultivo agar Dextrosa Sabouraud + Cloranfenicol solidificado en razón de tres ovas por cada placa (Figuras 11,12), Para este método y para garantizar la mayor asepsia, se utilizó un mandil blanco, guantes estériles, mascarilla nazobucal, frascos de vidrio estériles, pipeta Pasteur, mecheros conteniendo alcohol, encendedor, cámara fotográfica de 18 mp y libreta de apuntes.

Para optimizar el tiempo en el desarrollo del hongo se utilizó una campana anaerobia de vidrio a la cual se le extrajo el oxígeno utilizando dentro de ella una vela encendida, dejando solo CO₂ y se dejó reposar durante 48 horas para acelerar el desarrollo, se mantuvo en observación durante 48 horas (Figura 13).

Una vez obtenido el crecimiento en el tiempo esperado se procedió a realizar un repicado para aislar y obtener la cepa pura de *Saprolegnia* y posterior a ello se realizó la coloración utilizando el reactivo azul de lactophenol para su completa identificación en el microscopio (Figura 22, 23).

3.1.4 Método para la preparación de los medios de cultivo

Se siguieron protocolos regidos por el Instituto Nacional de Salud (INS) para la preparación de los medios de cultivo específico para hongos y para el procedimiento de antibiograma, utilizando la indumentaria adecuada para para ingresar a un laboratorio, se detallan los procedimientos a continuación:

a. Método para la preparación del medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud cloranfenicol

Para la preparación del medio de cultivo se siguió el protocolo que rige al Instituto Nacional de Salud (INS), el cual es estandarizado, se eligió este agar ya que los nutrientes que tiene en sus compuestos son los ideales para el crecimiento del hongo, además de que inhibe el crecimiento de otras bacterias ajenas a nuestra investigación.

Previamente teniendo los materiales de vidrio a usar es decir probeta de 50ml, matraz de 250ml completamente esterilizados, se utilizó el medio de cultivo específico Agar Dextrosa Sabouraud Cloranfenicol, la utilización según estándares regidos por el Instituto Nacional de Salud (INS) son de 65 gr/l de agua destilada, se procedió a pesar un total de 7.15 gr. de agar los cuales se mezclaron con 110 ml de agua destilada en un matraz de 250ml se homogenizó hasta disolver por completo la mezcla, se colocó un tapón al matraz y se llevó al autoclave por 15 minutos hasta alcanzar una temperatura de 120°C y una presión de 15 lbs.

Una vez obtenido el medio de cultivo después de pasar por el proceso de autoclavado, se procedió a colocar mecheros conteniendo alcohol los cuales se encendieron con un encendedor y se colocaron alrededor de las placas y tubos a los cuales se distribuirá el agar, en 4 placas Petri de 15 x 100 mm a razón de 20 ml para cada placa y los 30 ml restantes de agar se distribuyeron de manera equitativa en dos tubos de tapa rosca, la distribución fue en forma de pico de flauta o ángulo de 45° para guardar la cepa pura (cepario). Una vez vaciado el agar en las placas y tubos en las más estrictas condiciones de asepsia y esterilidad, se dejó enfriar a temperatura ambiente para su solidificación (Figura 23).

b. Método para la preparación del medio de cultivo Agar Muller Hinton

Para la preparación del medio de cultivo, se eligió este agar ya que para seguir el protocolo de antibiograma es esencialmente específico para este tipo de procedimiento.

Previamente teniendo los materiales de vidrio a utilizar esterilizados es decir matraz de 250ml y probeta de 50ml, se utilizó el medio de cultivo específico Agar Muller Hinton, la utilización según estándares regidos por el Instituto Nacional de Salud (INS) son de 65 gr/lit de agua destilada, para la preparación en un matraz de 1000 ml se colocó previo pesaje 27.56 gr para 424 ml de agua destilada, se homogenizó hasta disolver, una vez que la mezcla estaba completamente disuelta se colocó un tapón al matraz y se llevó al autoclave por 15 minutos hasta alcanzar una temperatura de 120°C y una presión de 15 lbs.

Una vez obtenido el medio de cultivo después de pasar por el proceso de autoclavado, se procedió a distribuirlo en 53 placas Petri de 60 x 15 mm a razón de 8 ml para cada placa. En las más estrictas condiciones de asepsia y esterilidad, se vació el agar líquido en las placas Petri y se dejó enfriar a temperatura ambiente para su solidificación.

Método estadístico.

La estadística que se aplicó para estos procedimientos fue descriptiva que incluyó promedios y porcentaje de eficiencia.

3.1.5 Método para la preparación de las concentraciones del extracto de ajo

Para la preparación de concentraciones se tomó en consideración la cantidad obtenida por la metodología convencional la cual fue de 460ml y fue puesta a prueba en la investigación, se utilizaron 5 matraces de 100ml, una probeta de 50ml, guastes estériles, mandil blanco, mascarilla nazobucal, mecheros conteniendo alcohol, encendedor y agua destilada. Se procedió a mezclar las concentraciones establecidas de la metodología eficiente con agua destilada hasta que cada una alcance un total de 100ml, para lo cual se detalla en la tabla 1:

Tabla 1. Método de preparación de las concentraciones *Allium sativum* en porcentajes (%)

Cantidad Obtenida ml	6.25	12.5	25	50	60	70%	80	90	100	Control
460	6.25ml de extracto de ajo- 93.75ml de agua destilada	12.5ml de extracto de ajo- 87.5ml de agua destilada	25ml de extracto de ajo- 75ml de agua destilada	50ml de extracto de ajo- 50ml de agua destilada	60ml de extracto de ajo- 40ml de agua destilada	70ml de extracto de ajo- 30ml de agua destilada	80ml de extracto de ajo- 20ml de agua destilada	90ml de extracto de ajo- 10ml de agua destilada	Extracto puro	Sin extracto

Fuente: Elaboración propia.

3.1.6 Aplicación de los tratamientos del extracto de ajo

a. Tratamiento con el extracto convencional

Para este tratamiento se prepararon un total de 53 placas Petri conteniendo agar Muller Hinton a las cuales se les añadió utilizando un hisopo estéril la cepa de *Saprolegnia sp.* por el método de estrías y posteriormente con una micropipeta calibrada se inoculó una gota equivalente a 20µl conteniendo las concentraciones porcentuales específicas de 6.25, 12.5, 25, 50%, 60, 70, 80, 90 y 100 a cada placa respectivamente, se dejó reposar 10 minutos hasta que el inóculo se absorba y se colocaron las placas en la incubadora a una temperatura de 37°C (Figuras 17, 18), se observó a las 8h, 16h, 24h y 48h para verificar el efecto inhibitor del extracto de ajo en el hongo, este procedimiento es llamado antibiograma en laboratorio clínico. Adicionalmente se tuvo una placa control o testigo por cada repetición. Se realizaron 5 repeticiones para este procedimiento.

El efecto inhibitor se realizó a través de la medición del crecimiento del halo de inhibición (mm) alrededor del inóculo, contemplando también la medida del radio del inóculo es decir la consideración final fue del diámetro total.

Tabla 2. Concentraciones porcentuales (%) utilizadas para las cinco repeticiones.

Primera Repetición									
Conc. 6.25	Conc. 12.5	Conc. 25	Conc. 50	Conc. 60	Conc. 70	Conc. 80	Conc. 90	Conc. 100	Control
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Segunda Repetición									
Conc. 6.25	Conc. 12.5	Conc. 25	Conc. 50	Conc. 60	Conc. 70	Conc. 80	Conc. 90	Conc. 100	Control
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tercera Repetición									
Conc. 6.25	Conc. 12.5	Conc. 25	Conc. 50	Conc. 60	Conc. 70	Conc. 80	Conc. 90	Conc. 100	Control
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cuarta Repetición									
Conc. 6.25	Conc. 12.5	Conc. 25	Conc. 50	Conc. 60	Conc. 70	Conc. 80	Conc. 90	Conc. 100	Control
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Quinta Repetición									
Conc. 6.25	Conc. 12.5	Conc. 25	Conc. 50	Conc. 60	Conc. 70	Conc. 80	Conc. 90	Conc. 100	Control
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fuente: Elaboración propia.

Variables.

Las variables utilizadas para este procedimiento fueron:

V.I.= Concentraciones diferentes de extracto de ajo (9)

V.D.= Diámetro total del halo de inhibición

Método estadístico.

Se utilizaron en primer lugar estadística descriptiva que incluyo promedios, desviación estándar, error estándar e intervalos de confianza para los resultados de las diferentes concentraciones experimentadas. Adicionalmente para determinar cuál o cuáles concentraciones fueron las más efectivas se utilizó el Análisis de varianza, Diseño completamente al azar, además la prueba de media de Tuckey.

Para la determinación de la concentración letal media (DL50) se utilizó el análisis de regresión Probit y la prueba de Chi cuadrado para determinar su significancia.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software SPSS V24.

3.1.7 Determinación del tiempo de inhibición del extracto de ajo en *Saprolegnia*

Se verifico el crecimiento del diámetro total en mm (inóculo y halo de inhibición) desde el momento del cultivo y observándolo a las 8h, 16h, 24h y 48h.

Variables.

Se tomaron en consideración las siguientes:

V.I.= Tiempo (4)

V.D.= Inhibición del crecimiento de *Saprolegnia*

Estadística.

La estadística utilizada para este procedimiento fue ANOVA de promedios.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO EFICIENTE FRENTE A *Saprolegnia*

De las tres metodologías utilizadas, el único extracto de *Allium sativum* obtenido a través del método convencional y en la concentración al 100% resultó causar efecto controlador en el crecimiento de *Saprolegnia sp.*

El extracto de “ajo” obtenido mediante el método convencional inhibió el crecimiento del cultivo en placa de *Saprolegnia sp.*, siendo el método que propició un halo antimicótico natural en el centro de la muestra.

El hecho de que no se obtuvieran resultados positivos con las dos metodologías mencionadas se debe a que al estar el *Allium sativum* “ajo” expuesto a temperaturas mayores a 75°C, llegando hasta 90°C, provoca que se desnaturalice las propiedades antimicrobianas en general, sin embargo se obtuvo un buen resultado con la tercera metodología ya que el extracto fue obtenido a temperatura ambiente (Tabla 03).

Tabla 3. Efecto de la inhibición de *Saprolegnia sp* por *Allium sativum*.

Métodos de extracción	Prueba al 100%		
	1	Total	%
Arrastre de vapor	(-)	-1	0
Hidrodestilación	(-)	-1	0
Convencional	(+)	1	100

Prieto *et al.*, (2005), recomienda el ajo machacado fresco, ya que la presencia de átomos de azufre en sus moléculas, tanto de la fracción liposoluble (aleína) como en la hidrosoluble (alicina), son efectivos fungicidas en las dermatomicosis por *Saprolegnia parasitica* en dosis de 200 mg/l de agua, en tratamientos de 5 días con una efectividad del 100%, o bien deshidratado con una efectividad del 80%. Sin embargo el hecho de usar ajo machacado implica que no se obtenga todo el concentrado puro ya que también trae consigo el bagazo y sólidos propios del ajo que no se pueden triturar por completo, a diferencia del proceso de extracción eficiente que se utilizó en la investigación, que nos da como resultado el concentrado líquido puro.

La cantidad de extracto obtenido por las tres metodologías no tiene variación significativa, sin embargo el aprovechamiento del extracto eficiente es considerable ya

que como se puede apreciar en la tabla 04, da como resultado casi un 50% de extracto líquido. Se resalta que para las dos primeras metodologías se adiciono agua desionizada, y para la tercera solo fue el Kg de ajo puro.

Tabla 4. Cantidades de extracto de ajo obtenidas de un Kg por las tres metodologías.

Metodología	Ajo (kg)	Agua desionizada (lt)	Cantidad obtenida (ml)
Arrastre de Vapor	1	2	420
Hidrodestilación	1	2	405
Convencional	1	0	460

4.2. EVALUACIÓN DE LA DOSIS MÁS ADECUADA PARA EL CONTROL DE *Saprolegnia*

La evaluación en este caso se realizó con el extracto convencional, se determinó que as dosis menores a 50% no lograron inhibir el crecimiento de *Saprolegnia* y la dosis más óptima fue la concentración del 100%, que inhibió en un halo más amplio (44 mm a las 24 horas), pero a partir de las concentraciones superiores al 60% se obtuvieron inhibición en el crecimiento de *Saprolegnia*, con una micropipeta calibrada se inocularon 20 μ l en cada una de las 45 placas conteniendo el hongo *Saprolegnia sp* y a diferentes concentraciones respectivamente, teniendo una placa control o testigo sin concentración alguna para cada una de las cinco repeticiones. De acuerdo a las diferentes concentraciones se obtuvieron los resultados a las 24 y 48 horas (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Efecto del extracto de *Allium sativum* en *Saprolegnia sp*, a las 24 horas.

Repeticiones	Diámetro total del halo de inhibición (mm) en diferentes concentraciones (%) de extracto de <i>Allium sativum</i> a 24 horas									
	Control	6.25	12.50	25	50	60	70	80	90	100
1	0	0	0	0	0	14.83	17.29	42.01	43.51	44.04
2	0	0	0	0	0	14.71	19.28	34.98	41.25	42.57
3	0	0	0	0	0	13.4	14.65	35.33	35.63	44.07
4	0	0	0	0	0	14.89	18.73	37.67	38.49	45.67
5	0	0	0	0	0	15.52	16.51	38.17	41.53	46.07
Promedio	0	0	0	0	0	14.67	17.29	37.63	40.08	44.48
DE	0	0	0	0	0	0.78	1.84	2.82	3.06	1.41
EE	0	0	0	0	0	0.35	0.82	1.26	1.37	0.63
CV	0	0	0	0	0	5.29	10.67	7.49	7.65	3.17

Las concentraciones eficientes fueron a partir del 60% propiciando halos de inhibición en las placas, por lo cual se puede afirmar que *Saprolegnia sp* es sensible a estos tratamientos, sin embargo se observa que el promedio de inhibición es más elevado a las

24 horas, se utilizaron cinco placas control una para cada repetición respectivamente conteniendo el agar Muller Hinton en donde se aprecia el crecimiento en la totalidad de la placa del hongo *Saprolegnia* (Figura 19).

Tabla 6. Efecto del extracto de *Allium sativum* en *Saprolegnia sp*, a las 48 horas.

Repeticiones	Diámetro total del halo de inhibición (mm) en diferentes concentraciones (%) de extracto de <i>Allium sativum</i> a 48 horas									
	Control	6.25	12.50	25	50	60	70	80	90	100
1	0	0	0	0	0	13.43	17.68	34.34	32.47	35.29
2	0	0	0	0	0	10.31	16.03	30.00	31.98	32.5
3	0	0	0	0	0	10.15	11.4	32.7	33.73	34.34
4	0	0	0	0	0	10.48	16.36	35.56	31.75	35.8
5	0	0	0	0	0	11.24	12.37	26.78	33.61	31.73
Promedio	0	0	0	0	0	11.12	14.77	31.88	32.71	33.93
DE	0	0	0	0	0	1.36	2.72	3.53	0.92	1.76
EE	0	0	0	0	0	0.61	1.22	1.58	0.41	0.79
CV	0	0	0	0	0	12.19	18.45	11.07	2.80	5.19

Las concentraciones eficientes fueron a partir del 60% propiciando halos de inhibición en las placas, por lo cual se puede afirmar que *Saprolegnia sp* es sensible a estos tratamientos, al hacer la comparación con la tabla anterior se observa una disminución en el promedio de inhibición a las 48 horas, se utilizaron cinco placas control una para cada repetición respectivamente en las cuales se aprecia el crecimiento del hongo *Saprolegnia* en la totalidad de la placa conteniendo el agar Muller Hinton (Figura 19).

Condori (2015), demostró que la concentración de *Allium sativum* de 6% fue la más eficaz con un 70% de mortandad de colonias de *Saprolegnia spp*, en la concentración de 8% se obtuvo 55% y la concentración de 10% se obtuvo un 41.66% de mortandad. Los resultados obtenidos con base a nuestra investigación difieren de manera contundente debido a que se utilizaron concentraciones similares y superiores (6.25%, 12.5%, 25%, 50%), en las cuales no se obtuvo ningún efecto inhibitorio, resulta poco probable que una concentración menor sea más eficiente que una mayor. Es recomendable no realizar la inhibición de un hongo en un agar específico para cultivo del mismo, ya que crea una contradicción entre el inhibidor y el medio de enriquecimiento.

Efectivamente, los resultados evidenciaron que a partir de la concentración de extracto de ajo al 60% propicia inhibiciones en el crecimiento del hongo, tal como se aprecia en las

tablas 7 y 8. Cabe resaltar que no se consideraron concentraciones menores al 60% esto debido a que su inhibición fue nula.

Tabla 7. Estadísticos descriptivos de la inhibición de *Saprolegnia* (mm) por *Allium sativum* a 24 horas.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
60%	5	14,67	0,77	0,34	13,70	15,63	13,40	15,52
70%	5	17,29	18,44	0,82	15,00	19,58	14,65	19,28
80%	5	37,63	28,19	12,61	34,13	41,13	34,98	42,01
90%	5	40,08	30,64	13,70	36,27	43,88	35,63	43,51
100%	5	44,48	14,10	0,63	42,73	46,23	42,57	46,07
Total	25	30,83	12,75	25,51	25,56	36,09	13,40	46,07

Tabla 8. Estadísticos descriptivos de la inhibición de *Saprolegnia* (.mm) por *Allium sativum* a 48 horas.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
60%	5	11,12	1,36	0,60	9,44	12,80	10,15	13,43
70%	5	14,77	2,72	1,22	11,38	18,15	11,40	17,68
80%	5	31,88	3,53	1,58	27,49	36,26	26,78	35,56
90%	5	32,70	0,91	0,41	31,57	33,85	31,75	33,73
100%	5	33,93	1,76	0,79	31,74	36,12	31,73	35,80
Total	25	24,88	10,25	2,05	20,65	29,11	10,15	35,80

Para conocer si las cinco concentraciones tienen similar eficiencia en la inhibición del crecimiento de *Saprolegnia* se procesaron los datos con un ANOVA en DCA, detallándose los resultados a las 24 y 48 horas en las tablas 08 y 09. En estas se observa diferencias significativas entre las concentraciones ($p < 0.00001$).

Tabla 9. ANOVA 24 horas.

	Inhibición				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3813,607	4	953,402	204,300	0,000
Intra-grupos	93,334	20	4,667		
Total	3906,941	24			

Tabla 10. ANOVA 48 horas.

	Inhibición				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2418,477	4	604,619	117,825	0,000
Intra-grupos	102,630	20	5,132		
Total	2521,107	24			

Las pruebas de significancia para 24 y 48 horas, se aprecia en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Prueba de Tuckey para la significancia entre concentraciones a 24 horas.

Concentración	N	Inhibición		
		Subconjunto para alfa (α) = 0.05		
		1	2	3
60%	5	14,6700		
70%	5	17,2920		
80%	5		37,6320	
90%	5		40,0820	
100%	5			44,4840
Sig.		0,340	0,404	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Como se aprecia a las 24 horas, la concentración al 100% es la más eficiente en inhibir el crecimiento de *Saprolegnia*, en segundo lugar las concentraciones que causan efecto inhibitor son las de 90% y 80% mostrando similares condiciones entre estas dos; finalmente las menos efectivas son las concentraciones de 70% y 60%. Se recomendará el uso de las concentraciones al 90% (por el menor gasto que implica) o al 100%.

Tabla 12. Prueba de Tuckey para la significancia entre concentraciones a 48 horas.

Concentración	N	Inhibición	
		Subconjunto para alfa (α) = 0.05	
		2	1
60%	5	11,1220	
70%	5	14,7680	
80%	5		31,8760
90%	5		32,7080
100%	5		33,9320
Sig.		0,120	0,613

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

A las 48 horas, las concentraciones al 80, 90 y 100% son las más eficientes en inhibir el crecimiento de *Saprolegnia*, entre las tres se muestran igualdad de condiciones; luego las siguientes son la concentración al 70% y finalmente la menos efectiva es la de 60%. Se recomendará el uso de las concentraciones preferentemente al 80%, 90% (por el menor gasto que implica) o al 100%. Sin embargo se observa que a las 48 horas, la letalidad del

ajo pierde efecto, debido a que los halos empiezan a disminuir, por lo que se infiere que *Saprolegnia* empieza nuevamente a colonizar la placa.

Para la estimación de los parámetros de confianza se utilizó el modelo Probit a 24 y 48 horas como se aprecia en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Parámetros de confianza utilizando el modelo Probit a 24 horas.

Estimaciones de los parámetros							
	Parámetro	Estimación	Error estándar	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT(a)	Concentración	0,080	0,005	14,729	0,000	0,070	0,091
	Intersección	-5,663	0,395	-14,326	0,000	-6,059	-5,268

a Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX

Tabla 14. Parámetros de confianza utilizando el modelo Probit a 48 horas.

Estimaciones de los parámetros							
	Parámetro	Estimación	Error estándar	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT(a)	Concentración	0,098	0,007	14,087	0,000	0,084	0,111
	Intersección	-6,667	0,482	-13,825	0,000	-7,150	-6,185

a Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Intersección + BX

Tabla 15. Chi cuadrado a 24 horas.

Contrastes de chi-cuadrado				
		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	26,010	4	0,000 ^a

- a. Puesto que el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.
- b. Las estadísticas basadas en casos individuales difieren de las estadísticas basadas en casos agregados.

PROBIT 24 HORAS

DL50 = 70.36

IC = 63.27 – 76.90

Tabla 16. Chi cuadrado a 48 horas.

Contrastes de chi-cuadrado				
		Chi-cuadrado	gl(a)	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	25,535	4	0,000(b)

- a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.
- b. Como el nivel de significación es menor que, 150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

PROBIT 48 HORAS

PROBIT: DL50 = 68.34

IC = 62.05 – 74.32

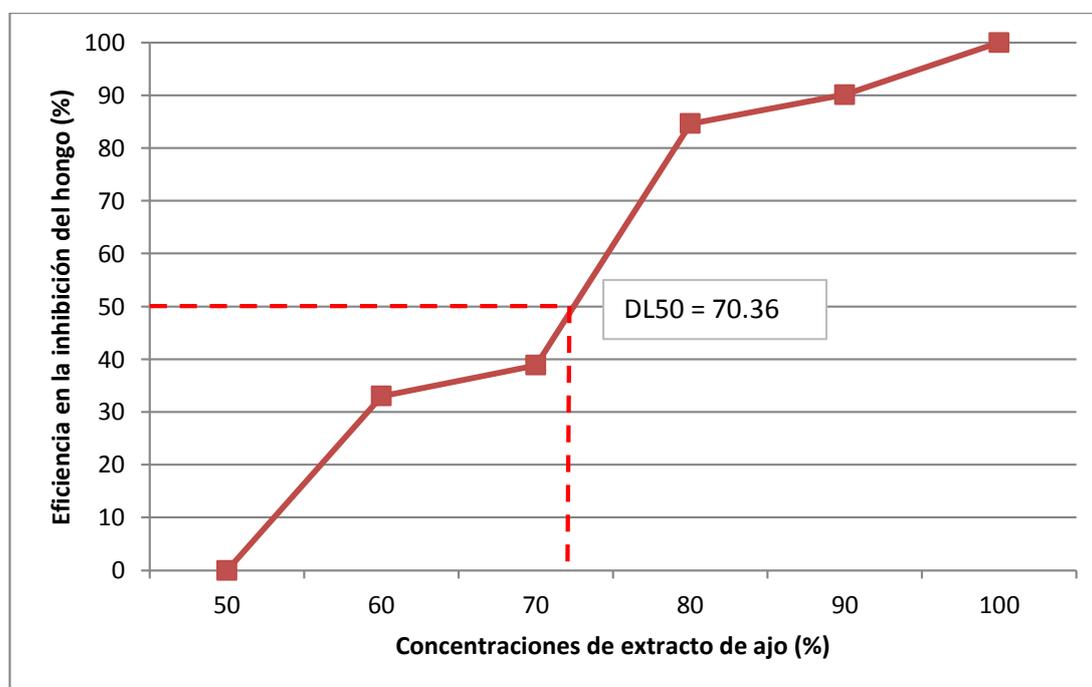


Figura 1. Representación gráfica para la determinación de DL50 a 24 horas de evaluación.

Como se aprecia en la figura anterior a pesar de que la concentración del 100% fue la más efectiva, teniendo en cuenta la dosis letal media (DL50), la cual nos da como un resultado óptimo para lograr la inhibición de *Saprolegnia* una concentración de 70.36% en un tiempo de 24 horas.

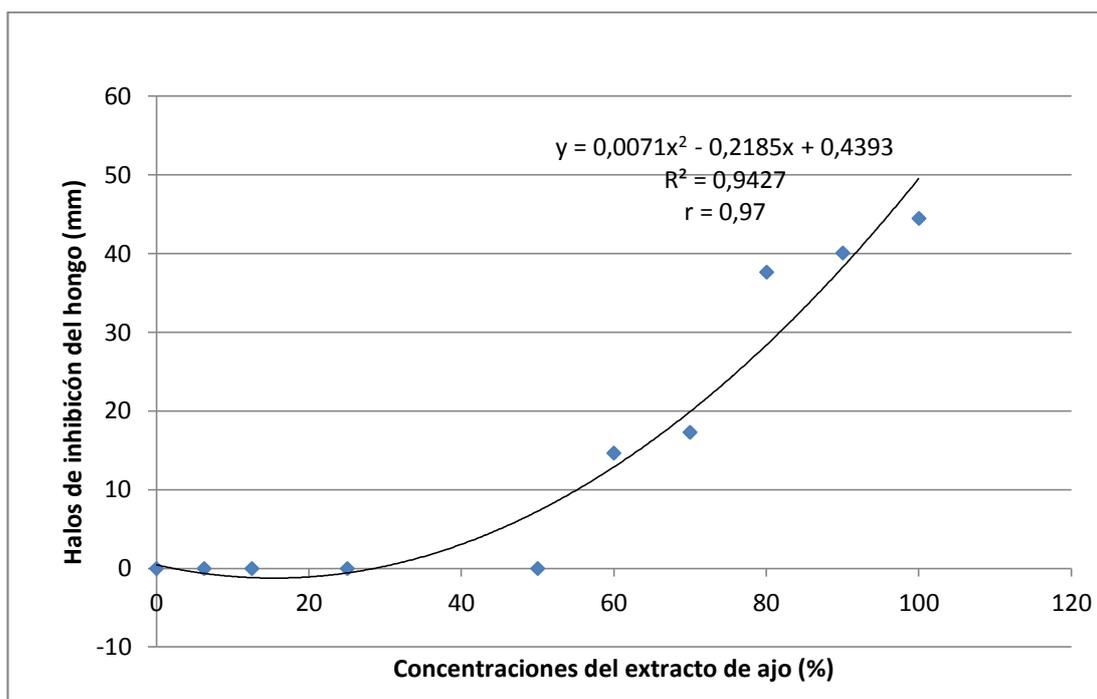


Figura 2. Regresión polinómica entre la inhibición y las concentraciones de ajo a 24 horas.

En la figura anterior se observa el grado de influencia que tiene las concentraciones de ajo para inhibir el crecimiento del hongo, presenta una $r = 0.97$, lo que significa la fuerte asociación al respecto, además las concentraciones del ajo determinan en 94% la inhibición del hongo.

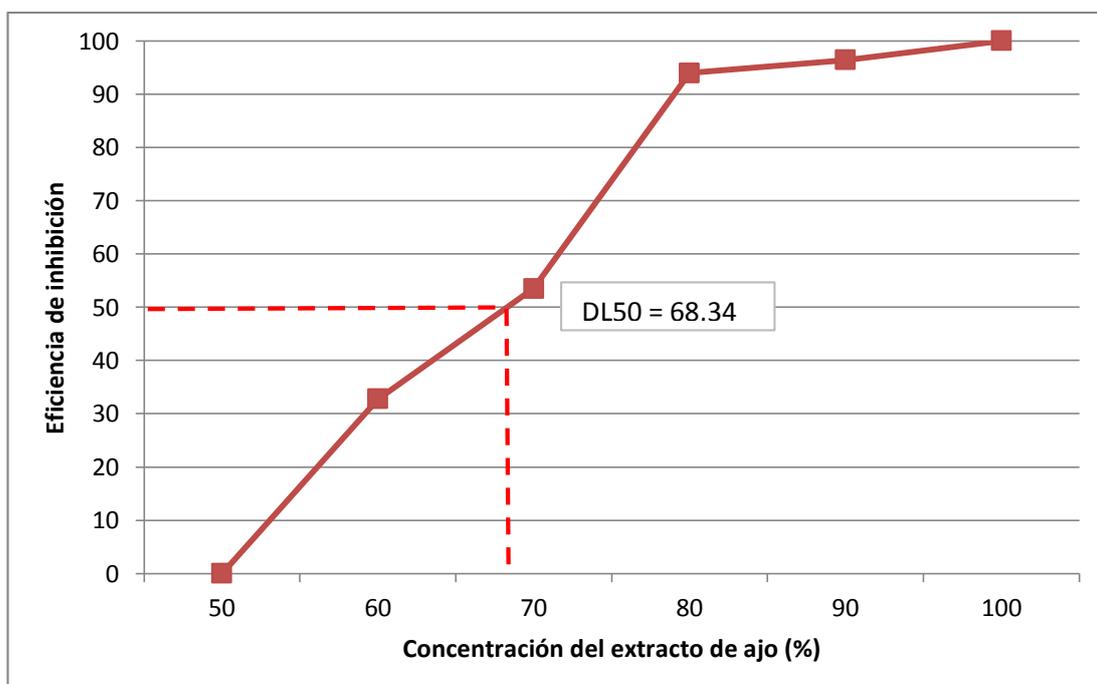


Figura 3. Representación gráfica para la determinación de DL50 a 48 horas de evaluación.

Como se aprecia en la figura anterior a pesar de que la concentración del 100% fue la más efectiva, teniendo en cuenta la dosis letal media (DL50), la cual nos da como un resultado óptimo para lograr la inhibición de *Saprolegnia* una concentración de 68.34% en un tiempo de 48 horas.

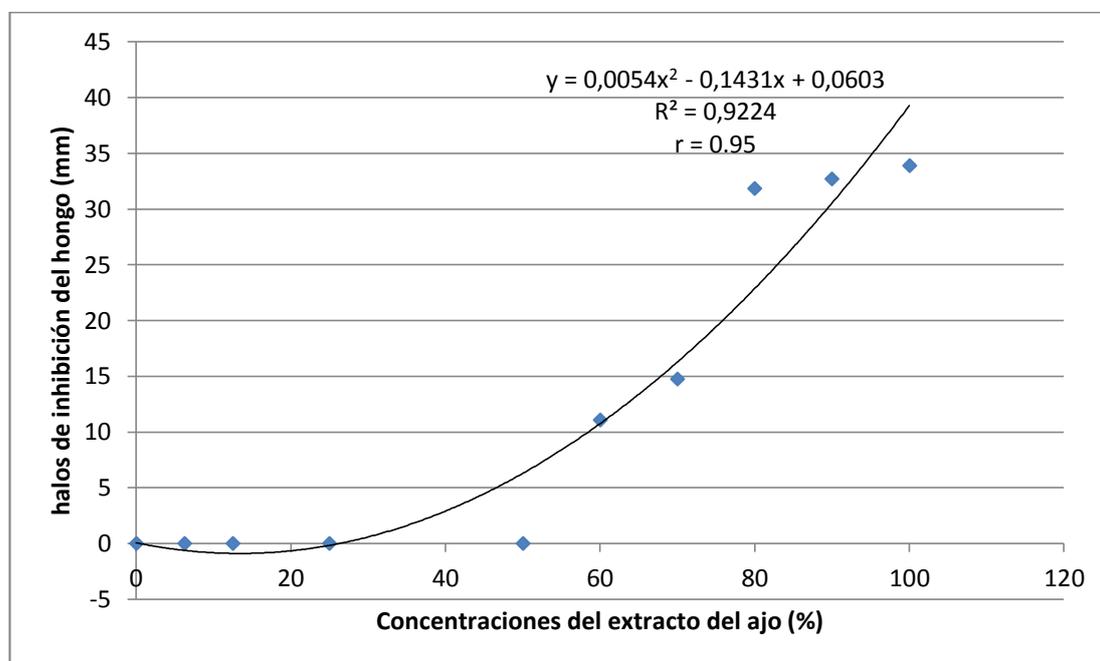


Figura 4. Regresión polinómica entre la inhibición y las concentraciones de ajo a 48 horas.

En la figura anterior se aprecia el grado de influencia que tiene las concentraciones de ajo para inhibir el crecimiento del hongo, presenta una $r = 0.95$, lo que significa la fuerte asociación al respecto, además las concentraciones del ajo determinan en 92% la inhibición del hongo.

Según Santos (2010), En Brasil demostró que el extracto de ajo, tuvo un efecto de inhibición significativa en el crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en un 99% y a una concentración de 50000 mg/L, con una reducción de hasta 90%, en la inhibición de las colonias cultivadas in vitro; del mismo modo Viegas *et al.*, (2005) comprobaron que el aceite esencial de ajo promovió zonas de inhibición que oscilaban entre 7,0 y 15,0 mm; pero el 34% de los aislamientos, los halos eran mayores a 12,0 mm de diámetro, inhibiendo el crecimiento in vitro de las colonias de *Aspergillus flavus*. Estas afirmaciones coinciden con nuestro reporte dando a conocer que el ajo es un potente fungicida natural para el control específico de *Saprolegnia*.

4.3. EVALUACIÓN DEL TIEMPO QUE REQUIERE EL EXTRACTO DE *Allium sativum* PARA MANIFESTAR SU EFECTO CONTROLADOR EN *Saprolegnia*

El tiempo más óptimo en el cual el extracto de *Allium sativum* ha manifestado su efecto controlador o inhibidor sobre el hongo *Saprolegnia sp* fue de 24 horas llegando a crear un halo de inhibición a simple vista considerable catalogando al hongo altamente sensible al tratamiento, sin embargo en la verificación a las 48 horas se nota un decrecimiento del halo de inhibición y crecimiento de *Saprolegnia* (Figura 5), se aplicaron estadísticas de grupo (Tabla 17) y la prueba T (Tabla 18) para evidenciar diferencias, sin embargo el resultado fue la igualdad de medias como se evidencia:

Tabla 17. Estadísticas de grupo para mostrar diferencias entre 24 y 48 horas.

Estadísticas de grupo					
	horas	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Inhibición	24 horas	5	30,8300	13,80763	6,17496
	48 horas	5	24,8820	10,99728	4,91814

Tabla 18. Prueba T para igualdad de medias.

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
								Inferior	Superior	
Inhibición	Se asumen varianzas iguales	1,282	0,290	0,753	8	0,473	5,94800	7,89419	-12,2560	24,15202
	No se asumen varianzas iguales			0,753	7,619	0,474	5,94800	7,89419	-12,4158	24,31185

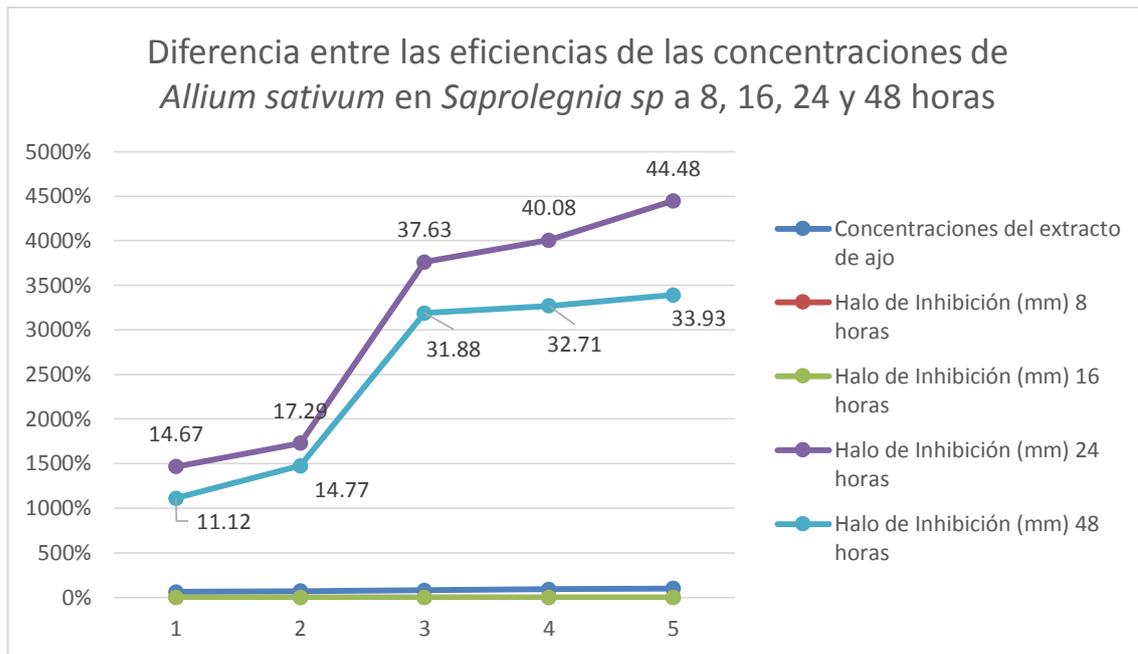


Figura 5. Grafica diferencial entre promedios de inhibición a las 8, 16, 24 y 48 horas.

Como se observa en la figura anterior existe diferencia significativa entre la inhibición de promedios producida a las 24 horas (Figura 20) y la inhibición producida a las 48 horas (Figura 21). Esto se ve reflejado en la disminución del efecto que produce el ajo y el desarrollo de colonias en el agar Muller Hinton a diferentes intervalos de tiempo de incubación.

Bruno *et al.*, (2010), reporta que el género *Saprolegnia*, agrupa a especies de hongos que se encuentran principalmente distribuidos en ambientes acuáticos, puede ser tanto saprófito como parasitoide, alimentándose así de células muertas o parasitando a peces como la trucha y el salmón, instalándose así en sus agallas. Este último caso es llamado micosis, son tolerantes a grandes rangos de temperatura desde 3 a 33°C, manifestando que se encuentra generalmente en el agua, aunque también puede habitar en suelo húmedo. Esta afirmación respecto a las temperaturas toleradas difiere de nuestra investigación ya que se ha demostrado que *Saprolegnia* puede tolerar y desarrollarse de manera normal a temperaturas superiores a los 33°C llegando a 37°C las cuales se comprobaron en un ambiente artificial de cultivo (incubadora).

V. CONCLUSIONES

- El extracto de ajo que causa efecto inhibitor frente al crecimiento del hongo *Saprolegnia sp* es el obtenido por la metodología convencional.
- Se estableció como dosis más adecuadas las concentraciones iguales o superiores al 60%, sin embargo esta no causa un efecto significativo, la eficiencia del extracto como inhibitor del hongo se da en las concentraciones del 80, 90 y 100%.
- El tiempo en el cual el extracto de *Allium sativum* requiere para manifestar el mayor efecto inhibitor frente a *Saprolegnia* cultivado en condiciones de laboratorio se da a las 24 horas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con otros extractos pertenecientes al género *Allium* y de esta manera propender a que se utilicen extractos naturales en beneficio de la acuicultura.
- Al ser el extracto de ajo eficiente en la inhibición del hongo *Saprolegnia*, se debe realizar estudios de otros compuestos naturales específicos para la preservación del mismo, solo de esta manera se garantizará un compuesto completamente natural exento de preservantes químicos que puedan influir de alguna manera en la trazabilidad del producto trucha arco iris.
- Realizar estudios en laboratorio para diferenciar a las especies de hongos del genero *Saprolegnia* y de esta manera utilizar los extractos obtenidos en nuestra investigación para comprobar su potencial inhibidor en cada una de ellas.
- Se recomienda utilizar los resultados obtenidos en laboratorio y aplicarlos en campo para el tratamiento de las afecciones causadas por hongos en trucha arco iris, y de esta manera confirmar la efectividad del ajo in situ como fungicida natural.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alcon, L. (2014). *Evaluación de la fecundación artificial en ovas de trucha arco iris (oncorhynchus mykiss) utilizando soluciones activadoras espermáticas (nacl y cao) en el cipp-chucuito*. Tesis de pre grado para optar el grado de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Altiplano. Perú. 84p.
- Alvarez, F., Razquin, B., Villena, A., Lopez, P. y Zapata, A. (1988). *Alterations in the peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in Saprolegnia infected brown trout Salmo trutta fario*. Vet immunool Immunopathol. Vol. 18: 93-181 pp.
- Apaza, R. y Medina, E. (1992). *Estudio de la micosis y sus factores que influyen en la fase de incubación de ovas de trucha en el CECH*. Tesis Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Altiplano Puno, Perú. 67p.
- Arteche, A., Vanaclocha, B., Guenechea, J. (1998). *Fitoterapiia. 3ra edición Vademecum de prescripción. Plantas medicinales*. Barcelona: Masson.
- Barnabé, G. (1991). *Acuicultura*. Traducido de la segunda edición francesa por: Pilar Álvarez Pellitero, Fernando de la Gandara Garcia, Rafael Oltra Crespo, Jesús Ramos Jara, José San Feliu Lozano, Silvia Zanuy Doste. Volumen II. Ediciones Omega, S.A./Plató, 26/08006 Barcelona. 1099 p.
- Bhandari, R. (2012). *Garlic (Allium sativum L.) A review of potential therapeutic applications*. International journal of green pharmacy.2:118.
- Bergner, P. (2005). *El poder curativo del ajo*. Editorial Prima, México, 159pp.
- Blanco, C. (1994). *La trucha cría industrial*. 2ºda edición. Impreso en España. Ediciones Mundi-prensa. 503 p.
- Bruno, D. ,Van west, P. y Beakes, G. (2010). *Saprolegnia and other Oomycetes*. En: Bruno, D W. y Woo, P. T. K., fish diseases and disorders. Vol 3 Viral, bacterial and fungal infections. 2nd edn. CABI international, pp 669-720.
- Chakroff, M. (1983). *Piscicultura. Cultivo de peces en agua dulce*, Editorial México. México 201pp.

- Condori, H. (2007). *Hongos patógenos en reproductores de trucha arco iris en jaulas del PETT-Puno y estanques del CIPP-Chucuito y su tratamiento*, Tesis Pre grado Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú.
- Condori, E. (2015). *Eficacia de Allium sativum “ajo” y Cloruro de sodio “sal”, en la eliminación in vitro de Saprolegnia Spp. De Oncorhynchus mykiss “trucha arco iris del CIPP-Chucuito – UNA-Puno*, Tesis Pre grado Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú.
- Del Valle, A. (1990). *“Bases para la Salmonicultura”*. Provincia de Neuquen República de Argentina, Subsecretaría de Asuntos Agrarios, Dirección General de Bosques y Parques Provinciales, Dirección de Ecología, Editorial Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires Argentina. 199pp.
- Dirección Regional de la Producción Puno – DIREPRO (2016). *Producción Anual de truchas en la Región Puno*. Dirección de Acuicultura e Investigación. Informe anual.
- Domingo, D. (2003). *Revista Especializada en Quimioterapia*, Vol. 16, 393pp (385-389).
- Fonnegra, R. y Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2da edición. Ed. Universidad de Antioquia. Medellin, p. 368.
- Fuangswat, W., Fuangswat, N. y Abking, O.(2011). *Sensitivity comparison of pathogenic aquatic fungal hyphae to sodium chloride, hydrogen peroxide, acetic acid and povidone iodine*. v Kasetart Journal of Natural Science, v 45, p. 84-89.
- Godoy, M. (2002). *Truchicultura*. Editorial Gama. Ayacucho, Perú. 247p.
- Greco, F. (2011). *Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina. 60p.
- Guarro, J. y Gené, A. (1999). *Developments in Fungal Taxonomy*. Clin. Microbiol. Rev. 12: 454-500.
- Gundogdu, E., Kacmakci, S. y Dagdemir, E. (2009). *The effect of garlic (Allium sativum L.) on some quality properties and shelf-life of set and stirred yoghurt*. Turkish journal of veterinary and animal sciences. 33(1):27-35.

- Harris, C., Cottrell, L., Pummer, S. y Lloyd, D. (2001). *Antimicrobial properties of Allium sativum (Garlic)*. *Applied microbiology and biotechnology*. 57:282-286.
- Huet, M. (1983). *“Tratado de Piscicultura”*, Editorial Mundi Prensa Madrid España 725pp.
- Kinkelin, P. (2007). *“Tratado de las enfermedades de los peces”*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 353p.
- Klauer, B. y Zevillanos, R. (2004). *Manuel de crianza de truchas en jaulas flotantes*. Impreso en Cusco –Perú. Primera edición. 128 p.
- Laura, E., Heckmann, R. y Meza, R. (1991). *“Factores que influyen en la infección micótica en la fase de incubación de ovas de trucha arco iris (Oncorhynchus mikkys) en el centro experimental de Chucuito U.N.A Puno*. (Artículo de investigación).
- Ledezma, E., Marcano, K., Jorquera, A. y col., (2000). *“Effi cacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: A doble-blind and comparative study with terbinafine”*. *Journal of the American Academy of Dermatology*; 43: 829-832.
- Leodo, S. (2000). *“Saprolegniosis” Atlas de Peces La Atlantida*. Capital Federal Argentina.
- López, T. (2007). *El ajo, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas*. *Fitoterapia*. 26(1): 78-81.
- Mamani, Y. (2011). *Evaluación del formaldehido en el tratamiento de saprolegniasis en ovas de carachi amarillo (Orestias luteus) durante el periodo de incubación*. Tesis de grado para optar el título de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Perú. 73pp.
- Mantilla, B. (2004). *Acuicultura. Cultivo de Truchas en Jaulas Flotantes*. Editora Palomino EIRL, Lima Perú 124pp.
- Manzano, P., Méndez, J., Hernández, F. y López, R. (2008). *“Antifungal resistance an emerging problem in México”*. *Gac. Med. Mex.*, 144(1):2326.
- Marking, L., Rach, J. y Schreier, M. (1994). *Search for antifungal agents in fish culture*, *In: G.J. Mueller, ed., Salmon Saprolegniasis. Bonneville Power administration, Div. Fish and Wildlife, Portland, OR.* p 131-148.

- Mendoza, R. y Palomino, A. (2004). *Manual de Cultivo de Trucha Arco Iris en Jaulas, Acuerdo de Colaboración Institucional AECI / PADESPA – FONDEPES*. 123pp.
- Meyer, P. (1991). *Aquaculture disease and health management*. J. Anim. Sci. 69: 4201-4208.
- Pasquel, A. (2011). *Control de la saprolegniosis en ovas de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) aplicando un desinfectante químico*. Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Acuacultor. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Acuicultura. Ecuador. 66 pp.
- Peres, L. (1982). *“Piscicultura, Ecología, Explotación e Higiene”*. Editorial Manual Moderno S.A. Lima Perú 69pp.
- Perez, R. (2002). *Evaluación de la eficacia y seguridad de bronopol durante un periodo de incubación de 90 a 170 U.T.A. en ova verde de Salmo salar*. Tesis de titulación. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 41pp.
- Pettranchi, R. (2002). *“Enfermedades de los Peces”* <http://www.aaa.org.ar>.
- Prieto, A., Auró de Ocampo, A., Fernández, A. y Pérez, M. (2005). *El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México*, Revista Especializada en Ciencias Químico - Biológicas, 8(1):38-49.
- Roberts, R. (1981). *Micología de los teleósteos. En Patología de los peces*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Pp 235-247.
- Romero, J. (2003). *Uso y comparación de tratamientos profilácticos en ovas de Galaxias maculatus (Jenyns, 1842), para mejorar la sobrevivencia embrionaria a eclosión*. Tesis de pre grado para optar el grado de Licenciado en Ciencias de la Acuicultura facultad de acuicultura y CS. Veterinarias Universidad Católica de Temuco Chile 52 pp.
- Ronald, R. (1981). *“Patología de los Peces”*, Primera edición, Editorial Mundi Prensa Madrid España 368pp.
- Ruiz, V. (1995). *Peces. Generalidades sobre su biología y clasificación. En: Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos*. Universidad La Plata, Argentina. p: 255 – 286.

- Sanchez, C. (2004). *Crianza y Producción de Truchas*. Ediciones Ripalme, Lima Perú 135pp.
- Santiago, J. y De Ambrosio, L. (2000). *Cría de truchas en Jaulas, Manual de Capacitación, AECI Agencia Española de Cooperación Internacional*, Editorial Industrial Papiros S.A. Miraflores Lima Perú 73pp.
- Santos, M., Santos, C., Almeida, M., Sant'Anna, H., Santos, O., Silva, F. y Martins, G. (2010). *Efeito inibitorio in vitro de extracto vegetal de Allium sativum sobre Aspergillus niger Tiegh*, *Rev. bras. Plantas med.* Vol.12 no 1.
- Silvera, S. (1997). "La Truchicultura en el Centro Piscícola el Ingenio". Boletín Técnico Huancayo – Junín Perú 30pp.
- Stevenson, P. (1985). *Manual de Crias de la Trucha*". Editorial Acribia. Zaragoza, España. 219pp.
- Viegas, E., Soares, A., Gorete, F. y Rossetto, C. (2005). *Toxicidade de oleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo Aspergillus flavus, hortic.* Bras. Vol 23 n°. 4 Brasilia.
- Wood, S. y Willoughby, L. (1986). *Ecological observations on the fungal colonization of fish by Saprolegniaceae in windermere.* *J Appl Ecol*, 23:737-749.
- Yukiyasu, N. y Zevallos, O. (1994). *Guía de Enfermedades de la Trucha Arco Iris* Edic. El Grafico. Bolivia. 69pp.

ANEXOS

ANEXO 1

ARCHIVO FOTOGRÁFICO

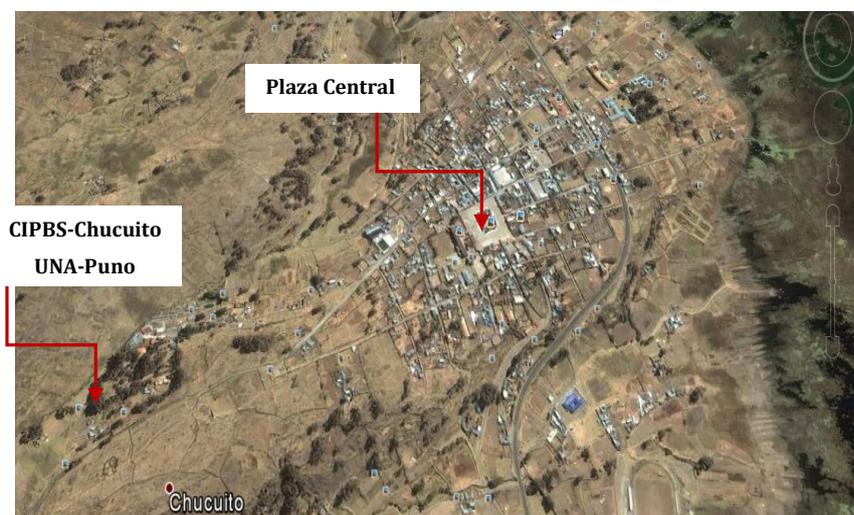


Figura 6. Ubicación del CIPBS, en la ciudad de Chucuito (Fuente: Google Earth,2017).

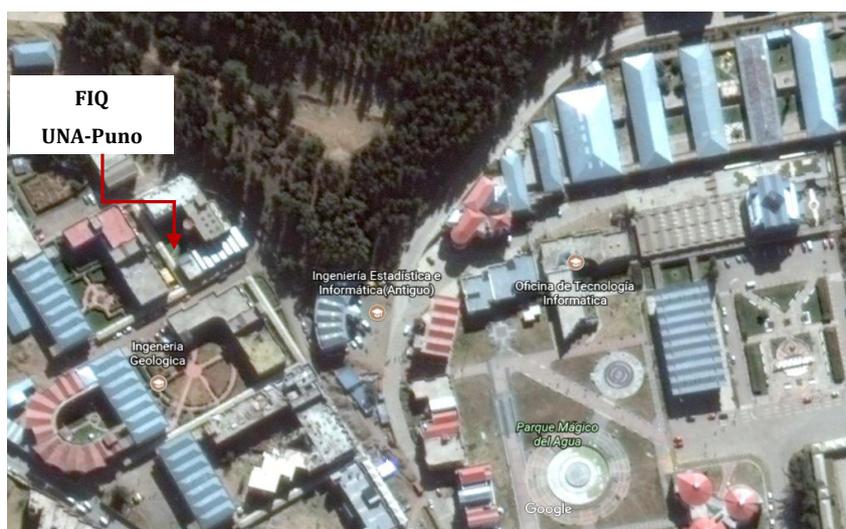


Figura 7. Ubicación de la FIQ de la UNA-Puno (Fuente: Google Earth,2017).



Figura 8. Ubicación del Laboratorio MEDILAB de Puno (Fuente: Google Earth,2017).



Figura 9. Colección de ovas con aparente infestación de *Saprolegnia*.



Figura 10. Ovas muertas colectadas con aparente estado de *Saprolegnia*.

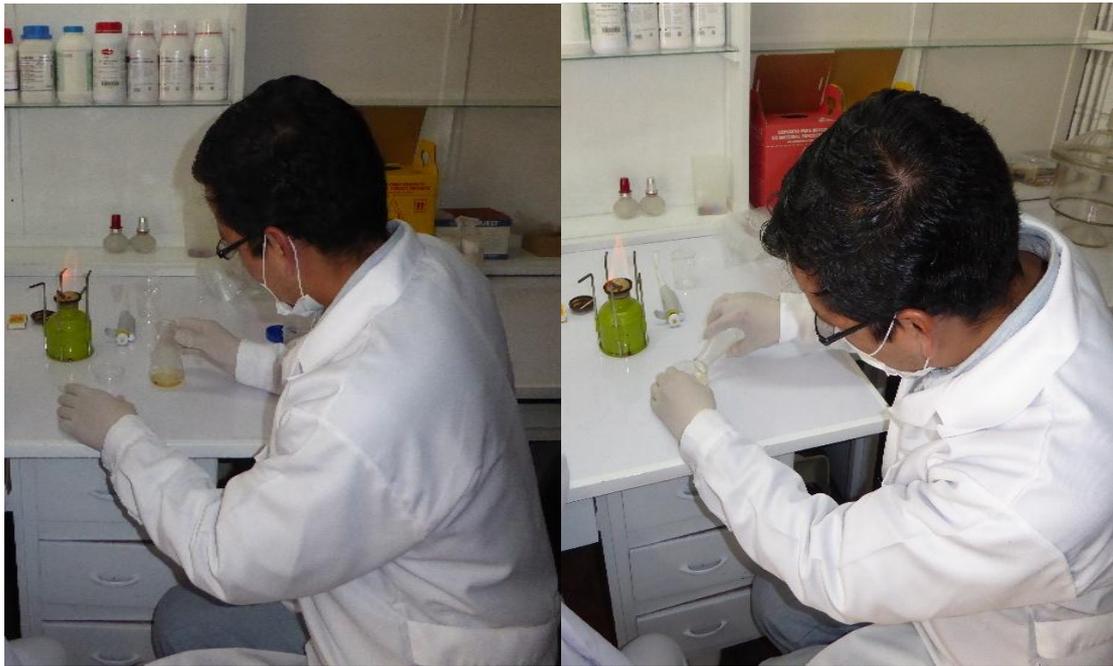


Figura 11. Vaciado del agar Dextrosa Sabouraud cloranfenicol en las placas Petri.



Figura 12. Cultivo de las ovas muertas en agar Dextrosa sabouraud cloranfenicol.

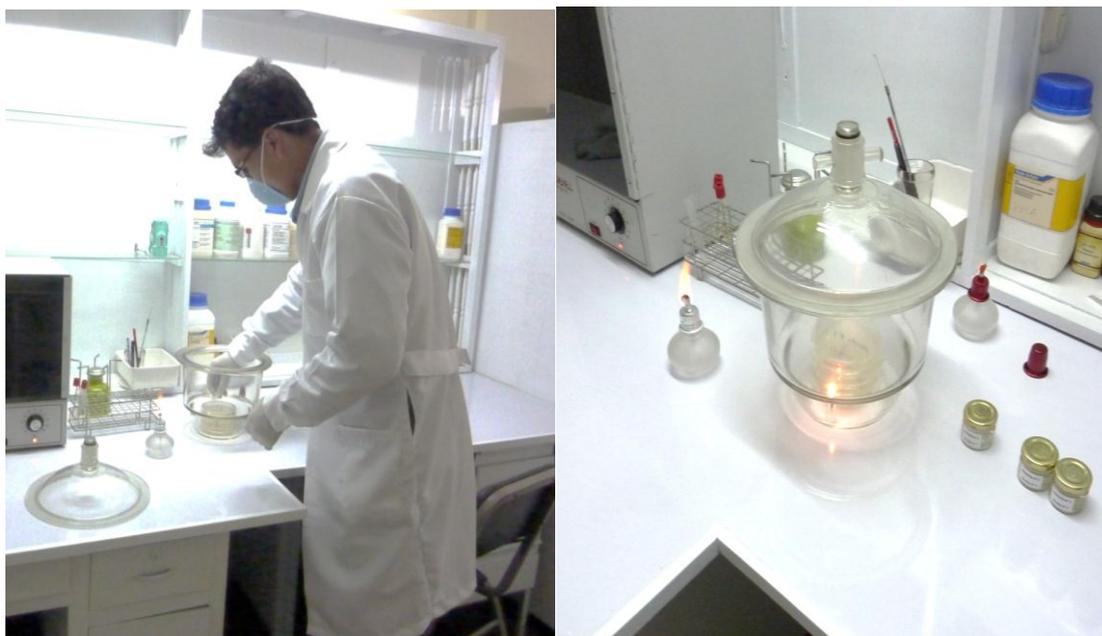


Figura 13. Placas Petri inoculadas depositadas en la campana anaerobia de vidrio para acelerar el crecimiento del hongo



Figura 14. Armado del Equipo de extracción por arrastre de vapor “Super Champion nsda-vs-01 Anoka minn. U.S.A.”



Figura 15. Frascos color ambar, balanza y Equipo de extracción por Hidrodestilación.



Figura 16. Extractor eléctrico marca Professional 800w de potencia.



Figura 17. Colocación por el método de estría de la sepa de *Saprolegnia* y luego el inoculo (20 μ) de extracto a diferentes concentraciones (la fila 6 es de testigos).

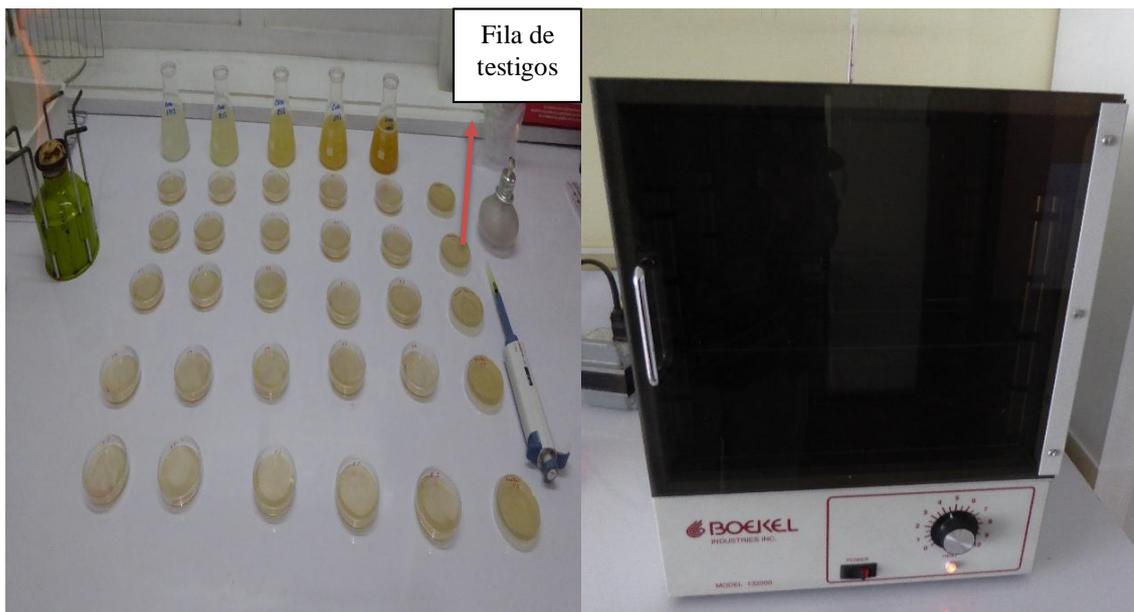


Figura 18. Placas inoculadas y colocadas en la incubadora marca Boekel modelo 132000. A 37°C.

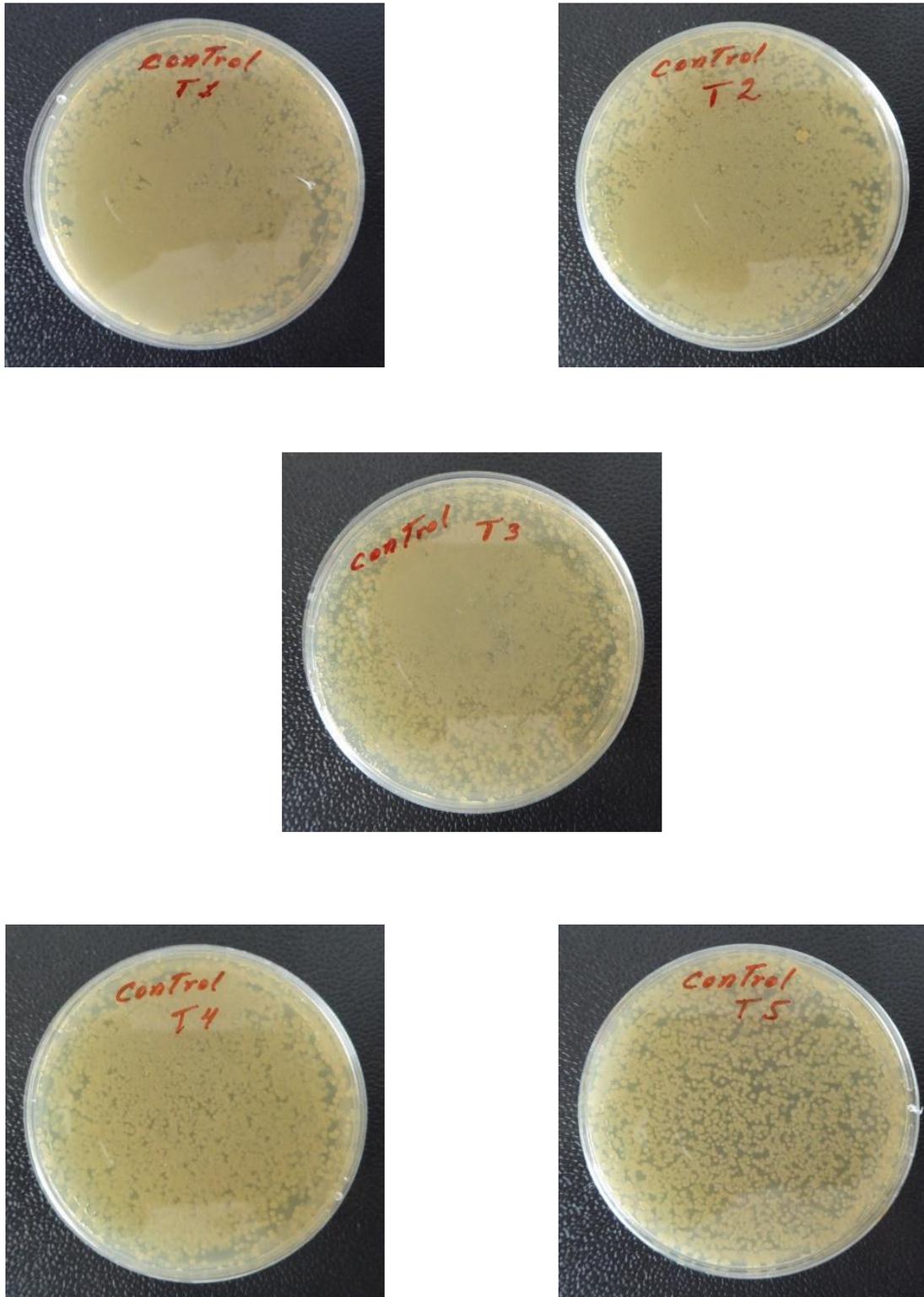


Figura 19. Placas control de los cinco tratamientos, se observa el crecimiento de *Saprolegnia* en el agar Muller Hinton.

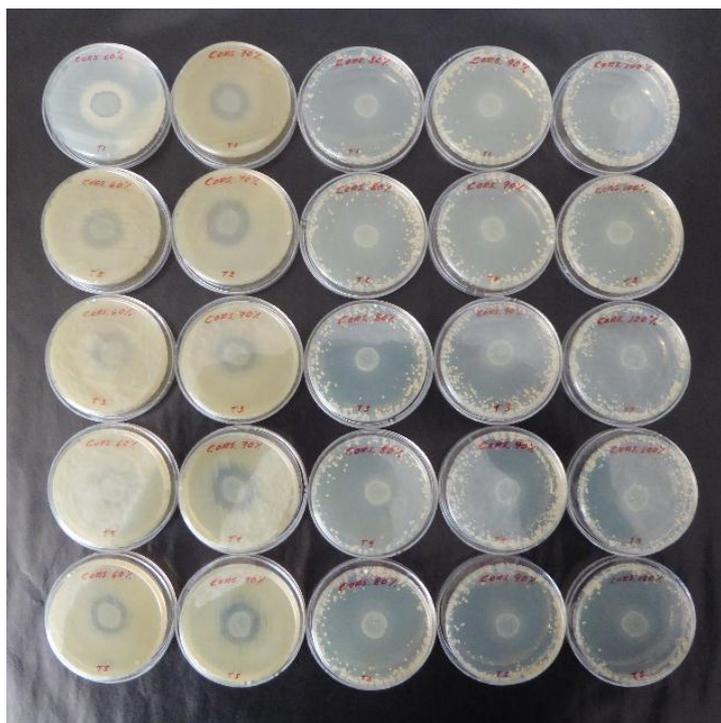


Figura 20. Efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de *Allium sativum* en el control de *Saprolegnia* a las 24 horas.

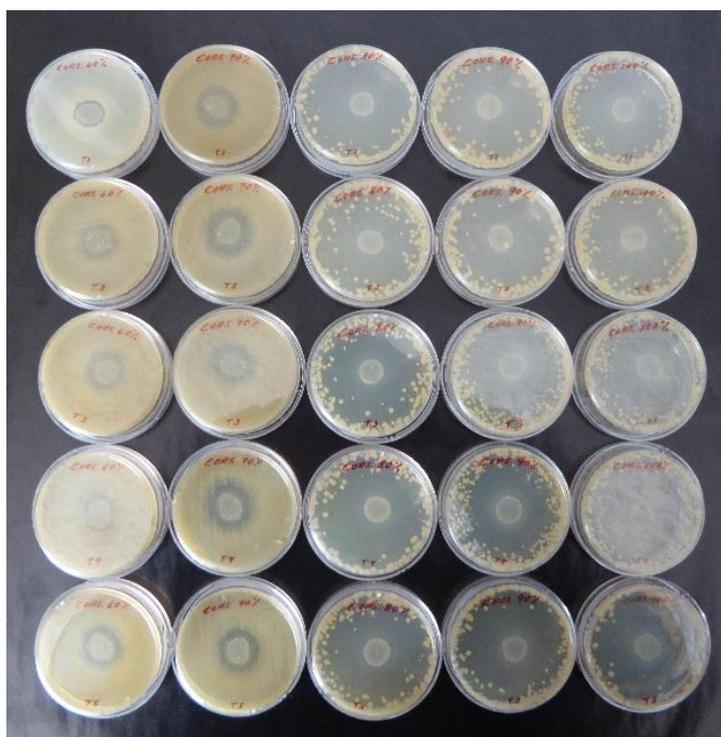


Figura 21. Efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de *Allium sativum* en el control de *Saprolegnia* a las 48 horas donde se puede apreciar un mayor crecimiento de colonias.

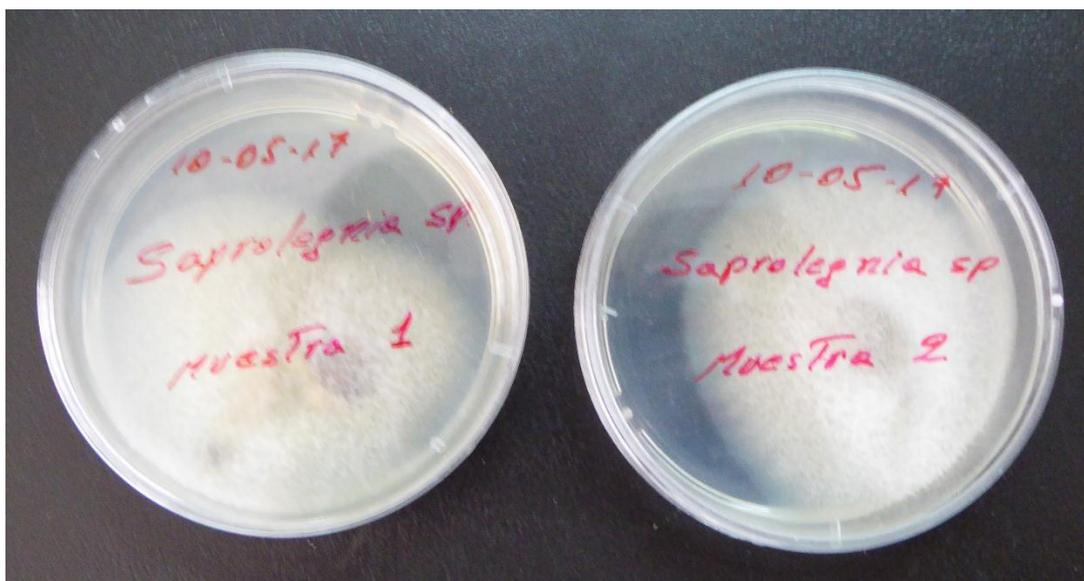


Figura 22. Crecimiento de *Saprolegnia* en placa.

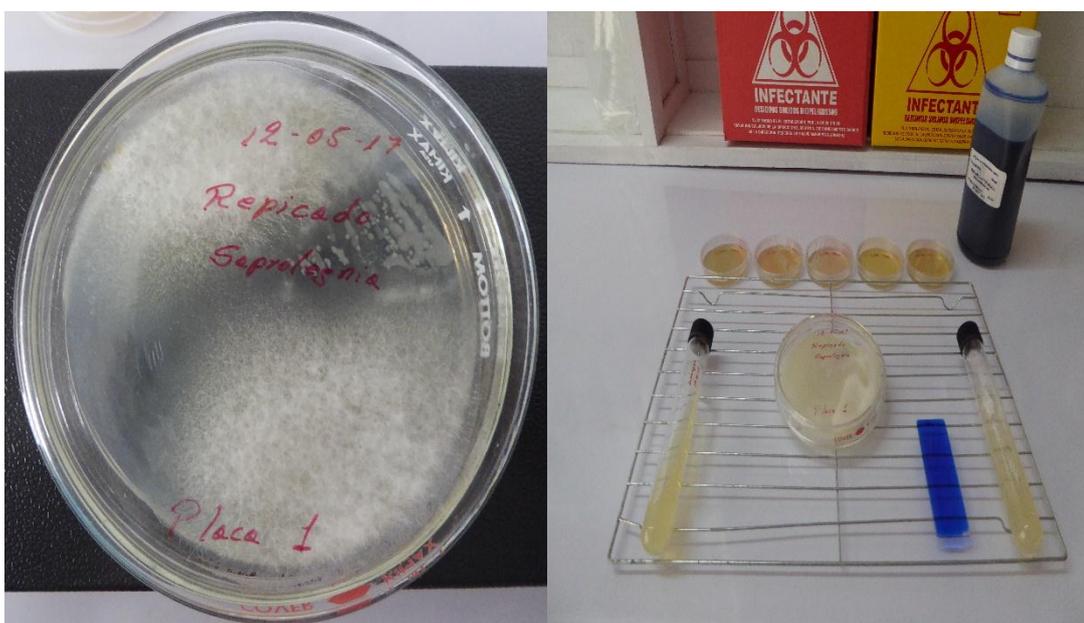


Figura 23. Placa con el hongo *Saprolegnia*, lamina con el reactivo azul de lactophenol para identificación al microscopio y tubos de tapa rosca destinados para cepario.



Figura 24. *Saprolegnia* vista al microscopio a 40x

ANEXO 2

CONSTANCIAS DE CERTIFICACION DE PRUEBAS EXPERIMENTALES



Universidad Nacional del Altiplano - Puno

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Ciudad Universitaria - Apartado 291 - Telefax: (051) 366190 - Fax (051) 366190



CONSTANCIA

El que suscribe, Jefe del Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno.

HACE CONSTAR:

Que, el Br. **ALLAN STEVE ÑAHUINCOPA VERGARA**, identificado con DNI: 40577317, ha realizado su investigación experimental en este laboratorio del proyecto de tesis titulado: **EFFECTO DEL EXTRACTO DE "AJO" *Allium sativum* COMO FUNGICIDA NATURAL DE *Saprolegnia sp* AISLADO DE OVAS DE "TRUCHA ARCO IRIS" *Oncorhynchus mykiss* EN CONDICIONES DE LABORATORIO**, habiendo seguido los procedimientos establecidos en nuestro laboratorio para la obtención de las muestras en las dos metodologías establecidas en el proyecto antes mencionado realizadas en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios, cumpliendo de esta manera con lo previsto en el marco de la programación planteada de manera responsable y eficiente.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime por conveniente.

Puno, 01 de Septiembre del 2017



Ing. M.Sc. **ROGER HUANQUI PEREZ**
Coordinador del LOPU-FIQ

C.c.
Archivo 2017



CONSTANCIA

El que suscribe Director del Centro de Investigación y Producción de Bienes y Servicios de Chucuito de la Universidad Nacional del Altiplano Puno.

HACE CONSTAR:

Que, el Br. **ALLAN STEVE ÑAHUINCOPA VERGARA**, identificado con DNI: 40577317, ha realizado su investigación experimental del proyecto de tesis titulado: **EFFECTO DEL EXTRACTO DE "AJO" *Allium sativum* COMO FUNGICIDA NATURAL DE *Saprolegnia sp* AISLADO DE OVAS DE "TRUCHA ARCO IRIS" *Oncorhynchus mykiss* EN CONDICIONES DE LABORATORIO**, para lo cual el mencionado, en las más estrictas condiciones de asepsia ha identificado y posterior a ello extraído ovas con aparente estado de infestación por *Saprolegnia* para ser cultivado en condiciones de laboratorio en el mes de Abril y Mayo del 2015 y Abril del 2017, cumpliendo con la programación establecida en la parte experimental con responsabilidad, puntualidad y eficiencia.

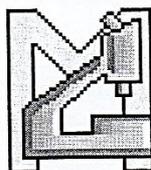
Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime por conveniente.

Puno, 17 de mayo del 2017



Ing. M.Sc. Edwin F. Orna Rivas
DIRECTOR
CENTRO DE INVESTIGACION Y PRODUCCION
DE BIENES Y SERVICIOS CHUCUITO

C.c.
Archivo
CIPBS /2017

LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO Y PATOLOGÍA**MEDILAB**

BLGA. MARITZA SOSA UGARTE C.B.P. Nº 2780 - ESPECIALIDAD LABORATORIO CLÍNICO Y MICROBIOLOGÍA
Principal: Jr LIMA Nº 181 - 3º PISO - Teléfono(51) - 355566 - FAX(51) - 355566 - CEL(951-669366 - PUNO
maritzamedilab@yahoo.com.pe

CONSTANCIA

La que suscribe representante y propietaria del Laboratorio de Análisis Clínicos MEDILAB de la ciudad de Puno.

HACE CONSTAR

Que el Br. **ALLAN STEVE ÑAHUINCOPA VERGARA**, identificado con DNI: 40577317, ha realizado su investigación experimental del proyecto de tesis titulado: **EFFECTO DEL EXTRACTO DE "AJO" *Allium sativum* COMO FUNGICIDA NATURAL DE *Saprolegnia sp* AISLADO DE OVAS DE "TRUCHA ARCO IRIS" *Oncorhynchus mykiss* EN CONDICIONES DE LABORATORIO**, durante los meses de Febrero a Junio del 2015 y de Enero a Abril del 2017, para lo cual se da FE de los resultados obtenidos, siendo los procedimientos seguidos con la mayor asepsia y ajustados a los protocolos que rigen a mi representada, cumpliendo así la etapa experimental programada con responsabilidad, puntualidad, compromiso y eficiencia.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime por conveniente.

Puno, 24 de julio del 2017



Blga. Maritza Sosa Ugarte
Esp. Microbiología - Lab. Clínico
C.B.P. Nº 2780

C.c.
Archivo
MEDILAB / 2017