



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE  
VALPARAISO



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACION AGRARIA

### INFORME FINAL

Proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089

“Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la salmonicultura”

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	21 ABR. 2008
Hora	10:55
Nº Ingreso	1861

Versión corregida, abril 2008.

## I. ANTECEDENTES GENERALES.

**Nombre del proyecto:**

Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la salmonicultura.

**Código:**

FIA-PI-C-2004-1-D-089

**Región de Ejecución:**

V, Metropolitana, VII y X.

**Fecha de Aprobación:**

28 de diciembre de 2004

**Forma de Ingreso a FIA:**

Concurso

**Agente Ejecutor:**

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.  
Av. Brasil 2950, Valparaíso, Quinta Región.  
RUT: 81.669.200-8

**Coordinador del Proyecto:**

Sra. María Isabel Toledo

Profesor Adjunto, PUCV  
Av. Altamirano 1480, Valparaíso.  
Fono: 32-274263  
e-mail: [itoledo@ucv.cl](mailto:itoledo@ucv.cl)

**Costo Total:**

\$195.335.900

**Aporte FIA:**

\$89.963.600                      46 %

**Período de Ejecución:**

Diciembre de 2004- Abril de 2007.

## II. RESUMEN DEL PROYECTO.

*Debido a la importancia económica que representa para Chile la producción de salmónidos y las pérdidas que origina la "saprolegniosis" es fundamental buscar alternativas al verde malaquita para favorecer la producción limpia y el desarrollo de la acuicultura orgánica. En la actualidad se ofrecen en el mercado productos como Saprofyn, Bronopol 50 y Myco killer, de efectividad relativa con respecto del verde malaquita y con baja conformidad por parte del sector salmonicultor. La utilización de plantas medicinales como el tomillo, en el control de la saprolegniosis, potencia de manera importante la actividad agrícola frente a un escalamiento y elaboración de un producto comercial, en base a extractos oleicos de esta planta, si este es adoptado por la industria salmonera.*

*Los análisis de perfil de ácidos grasos esenciales realizados a aceites de tomillo de distintos orígenes, revelan que este producto contiene altos niveles de timol, carvacrol y p-cimeno, cercanos al 50%, compuestos de probada acción antifúngica. Este informe entrega los resultados obtenidos en pruebas piloto, en las que se evaluaron y definieron concentraciones de aceite esencial de tomillo tolerable para ovas y alevines. Y concentraciones para prevenir la formación y crecimiento del hongo saprolegnia, en las etapas de ova y alevines de salmónidos.*

*En ensayos de tolerancia en ovas de trucha, cuando se someten a baños de 200 ppm por tres horas, sobrevive un 90% de ellas, mientras que en ovas de salmón del Atlántico, se logra este mismo nivel de sobrevivencia, cuando el baño no sobrepasa los 30 minutos. En la etapa de alevinaje de trucha la máxima concentración tolerable en baños de 30 minutos resulta ser de 50 ppm. Si los baños se prologan por 3 horas las concentraciones de aceite de tomillo no deben sobrepasar los 30 ppm. Tratamientos de baños con 100 y 150 ppm se descartan por la muerte de los alevines a los 20 minutos. Estos resultados indican que la aplicación de tratamientos con aceite esencial de tomillo para la fase de alevinaje deben ser solo preventivos.*

*Para prevenir la formación y crecimiento de la saprolegnia en la etapa de incubación de ovas de truchas, se propone una concentración de 100 ppm de aceite de tomillo, esta concentración resulta ser más efectiva que baños con Bronopol. Con este último se obtiene un 64% de ovas con hongos, en cambio baños con aceite de tomillo se registra un 55% de ovas con saprolegnia. Para el control de la saprolegniosis en ovas se recomiendan concentraciones mayores que fluctúan entre 200 a 400 ppm, siendo recomendable las concentraciones mas bajas para la etapa de ova con ojo y mayores para la etapa de ova verde.*

*De acuerdo a los resultados obtenidos en el tratamiento por baños preventivos y/o curativos, de una hora en alevines de trucha arco iris, con concentraciones entre 4 y 50 ppm permitirían una menor propagación de saprolegnia.*

*En esta investigación se confirma que el aceite esencial de tomillo posee características antifúngicas y es factible de utilizarlo en la prevención y control de distintas cepas de saprolegnia. Los resultados indican que las concentraciones de aplicación de aceite de tomillo dependen de la especie, su etapa de desarrollo, longitud y objetivo del baño, sea este para prevención o control de la saprolegnia.*

*En un estudio de prefactibilidad económica se estimó una TIR para la industria salmonera de un 72,41% y un VAN de 987.555.000, al disminuir las pérdidas por ataque de saprolegnia en las primeras etapas del cultivo, en especial en la etapa de incubación de ovas, etapa en la cual la saprolegniosis ocasiona las mayores pérdidas. .*

### III JUSTIFICACION DEL PROYECTO.

La Saprolegniosis está presente en la mayoría de los centros de cultivo y es una de las grandes preocupaciones en la etapa de agua dulce, debido a las importantes pérdidas económicas que ocasiona en sus distintos estadios, pérdidas que pueden llegar a ser del orden de un 50% de la población. Históricamente el compuesto más efectivo para combatir esta enfermedad fue el Verde Malaquita, sin embargo, investigaciones han probado que es altamente dañino para la salud humana, por poseer propiedades cancerígenas, razón por la cual está prohibido su uso en Chile y en el mundo. La consecuencia de su uso ilegal, ha generado rechazos de exportaciones por detección de trazas en Chile y en Europa (Holanda, España y Reino Unido).

La utilización de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) se presenta como un producto alternativo para la prevención y control de la Saprolegniosis, especialmente en el ámbito de la acuicultura orgánica. El tomillo es una especie aromática, poco cultivada en Chile debido a la poca demanda existente, no obstante si el tratamiento con aceite esencial de tomillo es efectivo, se generarían una demanda suficiente como para incentivar a los productores agrícolas.

La presente investigación propone el uso de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*), como un agente fungicida alternativo para el control de la saprolegniosis, puesto que su perfil lipídico indica que contiene importantes cantidades de timol y otros aceites esenciales. Los beneficios de utilizar un producto natural disminuye el riesgo de barreras para arancelarias por parte de los importadores en relación al uso de sustancias químicas en el manejo de los cultivos de salmónidos, participando así, en alguna medida de la denominada "acuicultura orgánica sustentable".

Para validar el uso del aceite esencial de tomillo, en el control y prevención de la saprolegniosis en salmónidos, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo y/o curativo para distintas cepas de *saprolegnia*.
2. Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.
3. Determinar las concentraciones de aceite esencial de tomillo adecuadas para tratamientos preventivo y/o curativo de la saprolegniosis en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento, en laboratorio.
4. Realizar pruebas a escala piloto para validar los resultados obtenidos en los objetivos 2 y 3.
5. Determinar a nivel experimental el costo de un tratamiento curativo y/o preventivo contra la saprolegniosis en salmones y truchas
6. Difundir los resultados al sector acuícola, farmacéutico y agrícola y distribuir un libro-manual para el uso del aceite esencial de tomillo para el control y/o prevención de la saprolegniosis en salmónidos.

**"Aplicación del tomillo *Thymus vulgaris* en el manejo de enfermedades de la salmonicultura"** 5

**Proyecto FIA PI-C-2004-1-D-089.**

## IV. METODOLOGÍA

**Objetivo 1. Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo y/o curativo para distintas cepas de *saprolegnia*.**

### 1.1 Obtención y purificación de cepas.

- 1.1.1 Recolección de muestras de *saprolegnia* en centros de cultivo: Para la obtención de cepas se tomaron muestras de hongos a partir de ovas y alevines que mostraban síntomas de saprolegniosis, las que se cultivaron en un medio de glucosa, extracto de levadura suplementada con cloranfenicol. Para evitar que los hongos pertenecieran a una misma población las muestras se tomaron en diferentes zonas geográficas, V, RM y X Regiones. Además se adquirió la cepa 90213 de *Saprolegnia parasítica*, NJM 8604.
- 1.1.2 Cultivo de cepas: Una vez colonizadas, las semillas de cáñamo se colocaron en placas Petri con agua destilada estéril y se incubaron a una temperatura de 4° C por un período entre 20 y 30 días. Para conservar las cepas, las semillas colonizadas se mantuvieron en tubos con tapa rosca con agua destilada estéril.
- 1.1.3 Las cepas se purificaron por traspasos sucesivos, utilizando un trozo de agar (5 x 5 mm) obtenido de la periferia de la colonia en crecimiento hasta obtener cultivos axenicos. Posteriormente mitades de semilla de cáñamo (*Cannabis sativa*), esterilizadas en autoclave, se dispusieron sobre las colonias en crecimiento.
- 1.1.4 Clasificación del hongo: Para su identificación, se tomaron como caracteres con valor taxonómico: tipo de esporangio y su dehiscencia; tipo de pared, la posición y forma de la oogonia; tipo y número de oosporas; presencia y origen de anteridio y crecimiento a 30°C. Las cepas se clasificaron utilizando las claves taxonómicas propuestas por Seymour (19.0).

### 1.2 Determinación de la actividad antifúngica Preventiva.

- 1.2.1 Catastro de productos en base a aceite esencial de tomillo a nivel nacional e internacional: Se realizó un estudio a través de Internet de cuáles son los productos disponibles en el mercado, tanto en Chile como en el extranjero y se tomó contacto con los productores para conocer los costos de los aceites.
- 1.2.2 Adquisición y Análisis químico de aceites esenciales: De acuerdo a lo obtenido en 1.2.2 se adquirieron la cantidad necesaria de aceite esencial para los ensayos. Además se envió una muestra de aceite esencial a análisis químico.

- 1.2.3 Se preparó agar GY + CAF, antes que se solidificara se agregó aceite esencial a concentraciones de 0, 50, 100 y 150 ppm, a las 24 horas se sembraron alícuotas de 1 ml de una solución con  $1 \cdot 10^6$  esporas de las distintas cepas a estudiar. Para cada concentración se realizaron pruebas en triplicado, y se determinó el tiempo que tardaron las colonias en desarrollarse y el rango de crecimiento. Como desafío se empleó Bronopol empleando la concentración sugerida por el comerciante.
- 1.2.4 Pruebas de efecto inhibitorio de agente emulsificante: éter, alcohol y DMS, (Dimetilsulfoxido). Se hicieron pruebas para determinar el efecto inhibitorio de los emulsificantes mencionados para lo cual se introdujeron secciones de agar con hifas en crecimiento activo en alcohol, Eter y DMS, se mantuvieron por 1 hora, posteriormente los trozos de agar se lavaron en agua destilada estéril y se sembraron en placas con agar GY+CAF. Para cada cepa y concentración las pruebas se realizaron en triplicado. Las placas se incubaron a 20°C por 7 días.
- 1.2.5 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite procedente de India diluido en éter, alcohol y DMS (Dimetilsulfoxido). Se introdujeron secciones de agar, con hifas en crecimiento activo, en una solución con 300 ppm de aceite esencial diluida con DMS, éter y alcohol al 5, 10, 15, 20 y 25% y se mantuvieron sumergidas por 1 hora, posteriormente los trozos de agar se lavaron en agua destilada estéril y se sembraron en placas con agar GY+CAF. Para cada cepa y concentración las pruebas se realizaron en triplicado. Las placas se incubaron a 20°C por 7 días.
- 1.2.6 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite procedente de India, en agar y en semillas de cáñamo. En agar GY+CAF, sin solidificar, se incorporó aceite esencial diluido al 5% con DMS en concentraciones de 300, 400, 500, 600, 800 y 1000 ppm. A las 24 horas se inocularon, por triplicado, discos de 4 mm de diámetro con hifas obtenidas desde una colonia en crecimiento activo y semillas de cáñamo colonizadas con hifas de Saprolegnia. Para cada cepa y concentración, las pruebas se realizaron en triplicado. Las placas se incubaron a 20°C por 1 semana.
- 1.2.7 Pruebas para determinar tiempo mínimo de inhibición de la actividad fúngica del aceite de tomillo. Trozos de 4 mm de diámetro de agar GY, con hifas en crecimiento activo, se inocularon al centro de placas de 10 cm de diámetro, con 20 ml de agar GY y se mantuvieron por 24 horas a 20°C. Posteriormente se insertaron, en forma equidistante, 3 cilindros de vidrio en los cuales se adicionó 0,1 ml de solución de aceite esencial a concentraciones de: 300, 400, 500, 600, 800 y 1000

ppm.

Las placas se incubaron por 5 días a 20°C. Para cada cepa y concentración las pruebas se realizan en triplicado.

Trozos de agar con hifas de *Saprolegnia* en crecimiento activo se dejaron por distintos tiempos (1, 2, 12, 24, 36 y 48 horas) en concentraciones crecientes de aceite esencial (300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1000 ppm) y posteriormente se lavaron en agua destilada estéril y se inocularon en placas con agar GY. Para cada cepa y concentración las pruebas se realizan en triplicado. Las placas se incubaron a 20°C por 5 días.

### 1.3 Determinación de la actividad antifúngica Curativa.

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó mediante la determinación de la CMI, o menor concentración a la cual el aceite esencial es capaz de inhibir el crecimiento. Inóculos de cada una de las cepas en estudio se cultivaron en placas de Petri con Agar GY suplementado con cloranfenicol, durante 3 días a 20°C. Una vez desarrollado el micelio se introdujo en la periferia de las placas, discos de 5mm de diámetro de papel Whatman nº 42, embebidos en diferentes concentraciones de aceite esencial (0, 50, 100 y 150 ppm). Las placas se incubaron a 20 °C durante 7 días (Bailey y Jeffrey, 1989). Para cada concentración se realizaron pruebas en triplicado, se midió la zona de inhibición. Como desafío se empleó Myco Killer 50 (Bronopol 50%) desde ahora Bronopol empleando la concentración sugerida por el fabricante.

## **Objetivo 2. Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.**

### 2.1 Evaluación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas por medio de baños.

2.1.1. Traslado de ovas desde la piscicultura de Río Blanco al Laboratorio de Cultivo de Peces y Hatchery de la Escuela de Ciencias del Mar, PUCV: Se seleccionaron ovas con ojo en condiciones óptimas para la ejecución de la experiencia. El traslado de las ovas se realizó en contenedores acondicionados para tal efecto.

2.1.2. Determinación de la concentración tolerable en ovas en laboratorio de Río Blanco: Se dispuso de 4 estanques, 3 de prueba y uno de control. En cada estanque se colocaron 500 ovas. A las ovas dispuestas en los 3 estanques de prueba, se les hizo un baño con aceite esencial de tomillo en solución acuosa en dosis de 0, 10, 10, 30, 40 Y 50 ppm (Stroh y Cols), manteniéndolos con sistema de bombeo permanente. El protocolo para emulsificar el aceite, fue afinado en función del comportamiento de las

distintas concentraciones a emplear. En términos generales, se formó una mezcla con emulsificante (90% de aceite esencial y 10% de emulsificador comercial). Como desafío se empleó Bronopol empleando la concentración sugerida por el fabricante

Se mantuvieron las ovas en la condición anterior (con sistema de bombeo permanente) por un período máximo de tiempo, a determinar por el equipo de trabajo y las empresas participantes. El criterio de tiempo se definió de acuerdo a la actividad del embrión cuyas observaciones se realizaron cada 30 minutos, se registró cualquier signo que pueda indicar toxicidad, por ejemplo cambios conductuales, cambio de coloración, pérdida de la movilidad, etc. El indicador de resultado fue el Lc 50, es decir cuando se alcanzó el 50% de mortalidad de las ovas.

## 2.1 Evaluación la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.

2.2.1 Traslado de peces desde la piscicultura de Río Blanco al Laboratorio de Cultivo de Peces y Hatchery de la Escuela de Ciencias del Mar, UCV: Para lo cual se seleccionaron truchas juveniles (entre 30 a 150 gr. según disponibilidad) en condiciones óptimas para la ejecución de la experiencia. El traslado de los peces se realizó en contenedores acondicionados para tal efecto. Esto es, con aireación artificial y temperatura adecuada (inferior a 12°C). A la llegada al laboratorio se mantuvieron en ayuno por 24 horas.

2.2.2 Determinación de la concentración tolerable en alevines por medio de baños: Se dispuso de 4 estanques, 3 de prueba y uno de control. En cada estanque se colocó un total de 6 peces. A los peces dispuestos en los 3 estanques de prueba, se les realizó un baño con aceite esencial de tomillo en solución acuosa, cada tres días, en dosis indicadas en el punto 2.1.2 manteniéndolos con sistema de bombeo permanente para mantener el aceite emulsificado. Como desafío se empleó Bronopol empleando la concentración sugerida por el fabricante.

Se mantuvieron los peces en la condición anterior por un período máximo (cuando se haga palpable una mejora importante en el estado general del pez, registrando observaciones cada 1 día). En el registro de observación, se detectó cualquier signo que pudiese indicar toxicidad, por ejemplo cambios conductuales, alteración en las mucosas, cambio de coloración, mortalidad, etc. El indicador de resultado fue el Lc 50, es decir cuando se alcance el 50% de mortalidad de alevines.

### 2.2.2.1 Determinación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo diluido en Dimetilsufóxido (DMS) en alevines de truchas. Resultado de actividades incorporadas.

En el laboratorio de Cultivo y Alimentación Para la Acuicultura se procedió a realizar pruebas de tolerancia de distintas concentraciones de dimetilsulfóxido, (DMS) esto se realizó con el fin de probar el efecto en la tolerancia de los alevines con el DMS y también emulsificar el aceite esencial, es decir, permitir que la mezcla del aceite con el agua sea más efectiva y homogénea de tal forma que no se produzca un rápido rompimiento de las fase. El procedimiento fue el siguiente:

Se emplearon para los bioensayos un número de 10 peces por recipiente, en una primera instancia, se trabajó con concentraciones de 50, 100, 150, y 200 ppm de DMS y se evaluó el grado de tolerancia de alevines sometidos a las distintas concentraciones en periodos de tiempo constantes. Los recipientes utilizados fueron de plástico de 2 litros y la mezcla se realizó con agua destilada, el solvente se incorporó con una micropipeta en las concentraciones correspondientes y se realizaron evaluaciones observando el comportamiento de los peces.

Como la tolerancia de los peces al DMS fue muy corta, se realizaron pruebas posteriores con concentraciones mas bajas es decir entre 10 a 40 ppm empleando el mismo procedimiento antes descrito.

### 2.2.3 Determinación de la concentración tolerable por medio del alimento.

2.2.3.1 Formulación de los alimentos: Para este ensayo se ocuparon materias primas utilizadas comúnmente en las plantas elaboradoras de alimentos para peces. Estas se sometieron a análisis químico. A partir de estos resultados se seleccionaron aquellas más adecuadas para la elaboración del alimento.

La dieta se formuló mediante herramientas computacionales de programación lineal basándose en las características nutricionales de las materias primas, el precio de estas y los requerimientos nutricionales de los peces. Una vez formuladas las dietas se realizó un cálculo teórico proximal aminoacídico y energético con el fin de visualizar la característica nutricional del alimento que se obtuvo.

Luego de seleccionar la formulación de la dieta más adecuada, se procedió a elaborar el alimento con aceite esencial de tomillo. Dado el bajo volumen de alimento a utilizar en condiciones de laboratorio, el alimento de prueba se elaboró mediante pelletizado, tal como se describe a continuación:

- Pesado de las materias primas a incorporar con balanza digital  $\pm$  0,1g.
- Mezcla de las materias primas con mezcladora kitchenaid de capacidad de 3 Kg.
- Adición de micro ingredientes a la mezcla anterior, homogenización bajo las mismas condiciones.
- Adición de agua y aceites a la mezcla. En este momento se adiciona el aceite esencial de tomillo, homogenización.
- Pelletizado en máquina pelletizadora.
- Secado en estufa de laboratorio por 72 horas a 60° C.
- Fraccionado del pellet dependiendo del tamaño de los peces a alimentar.
- Envasado en bolsas plásticas, sellado, etiquetado y almacenado.

(Nota: En el proceso de extrusión del alimento el baño se realizó luego del extruido, por lo tanto, el producto no es sometido a las temperaturas del proceso durante su fabricación industrial.)

2.2.3.2 Prueba de tolerancia de alimento con aceite esencial de tomillo dentro de la mezcla en trucha arcoiris: De acuerdo a los resultados de la experiencia *in vitro*, se determinaron 5 concentraciones de prueba igual o mayores a la concentración mínima que tuvo efecto preventivo u/o curativo. De este modo, se elaboraron 6 mezclas de alimentos con 6 concentraciones de aceite esencial de tomillo, correspondiendo una de ellas al testigo con 0 ppm de aceite esencial. Como desafío se empleó Bronopol empleando la concentración sugerida por el fabricante.

Se dispusieron 6 estanques de prueba con 6 peces cada uno, a los cuales se les calculó el alimento diario a suministrar a los peces. Se tomaron registros en el tiempo del comportamiento de los peces frente a la ingesta del alimento.

**Objetivo 3. Determinar las concentraciones de aceite esencial de tomillo adecuadas para tratamientos preventivo y/o curativo de la saprolegniosis en ovas y alevines de salmónidos en el alimento y por medio de baños, a nivel de laboratorio.**

### **3.1 En Ovas**

#### **3.1.1 Traslado de ovas desde la piscicultura de Río Blanco al Laboratorio de Cultivo de Peces y Hatchery de la Escuela de Ciencias del Mar, UCV.**

Estas pruebas se realizaron en el laboratorio de Bioensayo de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por un período de un mes. Se trasladaron 5000 ovas de trucha arco iris desde la Piscicultura de Río Blanco al laboratorio de bioensayo de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, el traslado se realizó de la siguiente forma:

Las ovas se depositaron en paños húmedos en pequeñas cajas de polietileno expandido, luego estas se dispusieron en un contenedor de plástico con hielo para mantener la temperatura de las ovas durante su traslado y evitar así la mortalidad por transporte.

#### **3.1.2 Determinación de la concentración adecuada de aceite esencial para un tratamiento preventivo en ovas de trucha arcoiris.**

Para la realización de esta prueba, se dispuso de 6 acuarios de 50x30x40 cm de largo ancho y alto con 16,5 litros de agua (Figura 1), acondicionados cada uno con un sistema de recirculación de agua.

En cada uno de los acuarios se introdujo 3 cunas, cada una de las cuales fue construida con un tubo de PVC de 110 mm. de 20 cm. de altura, con una malla en su interior que sirve de soporte para depositar las ovas y permitir la circulación del agua. Se construyeron 24 cunas y dispusieron 3 por acuario, cada cuna poseía intercambio de agua continuo, dentro de cada una de ellas se distribuyeron 200 ovas (Figura 1 y 2).

Luego de la distribución se procedió con la realización de los baños con aceite esencial de tomillo, para lo cual se siguió el protocolo que se indica a continuación:

1.- Para la preparación de las soluciones de los baño con aceite según las concentraciones previamente fijadas 0, 100, 200, 300, 400 ppm de aceite de timol y 50 ppm de Bronopol como control positivo, se empleó una mezcladora marca Sindelen modelo Multimix Inox. A esta se le adicionó agua del mismo acuario y con una pipeta se le agregó la concentración de

***“Aplicación del tomillo *Thymus vulgaris* en el manejo de enfermedades de la salmonicultura”*** 12

***Proyecto FIA PI-C-2004-1-D-089.***

aceite y Bronopol correspondiente. Luego de homogenizar por 10 a 15 segundos, las soluciones eran vertidas en el estanque destinado para los baños.

2.- Para lo baños se empleo un acuario especialmente acondicionado para ello, una vez homogeneizada la solución en el agua del acuario, se depositaron las cunas. (Se realizaron tantos baños como concentraciones de prueba). Posteriormente, se activó por 30 minutos, el sistema de recirculación dentro del acuario utilizando una bomba. Finalizado este lapso de tiempo, se extrajeron las cunas con las ovas dejando cada una en su correspondiente acuario.

3.- Los baños se realizaron día por medio durante 14 días. Para la evaluación del efecto del aceite de timol sobre la saprolegniosis, se consideró el desarrollo de micelidos en ovas muertas. Esto, debido a que es la ova muerta la que da el soporte orgánico para el crecimiento de la Saprolegnia. Para ello se efectuaron controles diarios para definir el porcentaje de ovas sobre las cuales se desarrolló el hongo.



**Figura 1. Acuarios utilizados en experiencia en ECM.**



**Figura 2. Cunatas para mantener las ovas de trucha para bioensayo.**

## **3.2 Tratamiento preventivo y curativo en Alevines de trucha arcoiris**

### 3.2.1 Tratamiento preventivo por medio del alimento.

Se utilizaron 6 estanques de 60 litros con 10 peces cada uno y se alimentaron con 3 dietas A1 (1 ppm de aceite esencial de tomillo Ambar), A2 (2 ppm de aceite esencial Ambar) y control. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Para la elaboración de los alimentos se siguió el mismo procedimiento indicado en la actividad 2.2.3.1., antes descrita. Luego de 45 días de alimentación con las dietas ya indicadas, se procedió a la infección de los peces para evaluar si el tratamiento entregado tenía efectos preventivos al desarrollo de saprolegnia.

Para infectar a las truchas, se le practicaron cortes en la aleta y raspado de escamas en ambos flancos del pez. El procedimiento aplicado consistió en lo siguiente:

1. Los materiales empleados fueron placas Petri con hongos cultivados, mechero Bunsen, bisturí y alcohol para desinfectar.

2. Se trabajó con un sistema tipo cámara de aislamiento de vidrio de tal forma de aislar el contenido de las placas con hongos y a su vez mantener el ambiente aislado de otras fuentes posibles de infección.
3. Se dispuso de alcohol para desinfectar los utensilios empleados para la infección, y un mechero Bunsen para esterilizar.
4. Se contó con placas Petri con hongos para inocular en los cortes que se realizaron a cada ejemplar de trucha.
5. Se utilizaron Baldes para anestesiado y recuperación, anestésico, pesa y huincha para mediciones.

Se extrajeron los peces de los estanques y se depositaron en el container con anestésico, se esterilizaron los bisturíes y material para inocular los hongos, luego se tomó cada pez y en la cámara de aislamiento, se realizaron los cortes en la aleta y en el dorso de los peces y se infectaron las heridas con los hongos disponibles en las placas Petri. Posteriormente, los peces se depositaron en el estanque de recuperación y finalmente se devolvieron a su estanque original. (Figura 7).

En la cuarta semana se procedió a la infección de los alevines, de la misma forma descrita en el punto anterior, para determinar el efecto preventivo de los baños en el desarrollo de saprolegnia en las truchas.

### 3.2.2 Tratamiento preventivo en alevines por medio de baños

Se mantuvieron en 8 estanques, uno control y tres experimentales (en duplicado), alevines de tamaño homogéneos a los que se les efectuaron baños con dosis diferentes (tres niveles y un control) de aceite esencial de tomillo por al menos dos semanas, previo a la exposición al hongo, los baños se realizaron por una hora, día por medio y por un lapso de 4 semanas. Como desafío se empleó Bronopol.

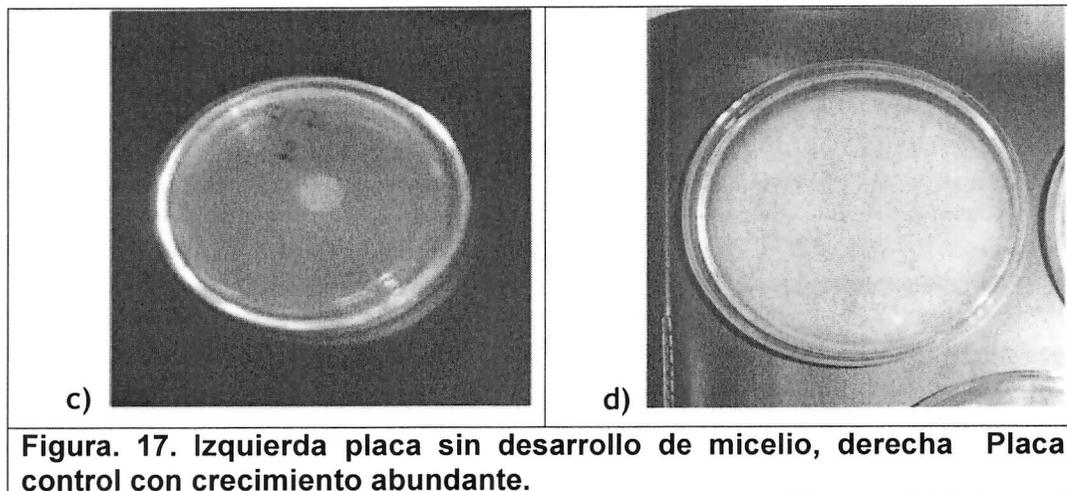
Los peces fueron expuestos al hongo en condiciones estándar de cultivo, y se evaluó en forma continua la evolución de la cepa de mayor presencia en los cultivos sobre los peces. Para garantizar la exposición de los alevines al hongo presente en el agua, se les realizó una herida, extrayendo en cada ejemplar de cultivo 2 mm<sup>2</sup> de piel a la altura del pedúnculo caudal por sobre la línea lateral. La herida fue superficial, afectando sólo a la piel, para no comprometer otros órganos, ni musculatura del pez. La presencia del saprolegnia en el agua fue determinada *in situ*, al momento de iniciar la experiencia. Como indicador del resultado se efectuó una evaluación final de los peces y su respuesta a la exposición a la que fueron sometidos, determinando mediante un análisis micológico el n° de colonias formadas.

### 3.2.3 Tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris

3.2.3.1 Tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris por alimento con aceite esencial de tomillo: Con el fin de verificar el efecto

### 1.2.3 Evaluación de distintas concentraciones de aceite esencial (preventivo).

- a) Al cabo de una semana no se observó desarrollo de micelio en ninguna de las concentraciones estudiadas (50-500 ppm), salvo el grupo control que presentó crecimiento abundante (Fig. 17).
- b) Se observó inhibición del crecimiento a partir de los 150 ppm. (Fig. 17).



**Figura. 17. Izquierda placa sin desarrollo de micelio, derecha Placa control con crecimiento abundante.**

### 1.2.4 Pruebas de efecto inhibitorio de agente emulsificante: éter, alcohol y DMS, (Dimetilsulfoxido).

Al realizar las pruebas con los 3 solventes mencionados, se observó que hay un efecto inhibitorio de estos a partir de concentración al 15% o superiores, mientras que en concentraciones inferiores, es decir al 5% y 10% no hay diferencias entre los solventes y no se produce efecto inhibitorio sobre el crecimiento de saprolegnia.

### 1.2.5 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite TOM-IND-NAT-BL, diluido en éter, alcohol y DMS (Dimetilsulfoxido).

Al realizar las pruebas para determinar la concentración inhibitoria con aceite de Tomillo a 300 ppm, diluido con los 3 solventes puros mencionados, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Con alcohol hay un efecto inhibitorio a partir de una concentración al 25% de este solvente.
- Con el Eter hay un efecto inhibitorio a partir de una concentración al 15% de este solvente.
- Con el DMS hay un efecto inhibitorio a partir de una concentración al 20% de este solvente.

determinó que las concentraciones 100 y 150 ppm para el caso de baños en alevines no eran factibles por el grado de toxicidad que generaban en los peces, ya que, a estas concentraciones la totalidad de los alevines morían antes de los 20 minutos de exposición. Esto contrasta con los resultados obtenidos en ovas, donde se pudo observar que éstas toleraban hasta una concentración de 800 ppm de concentración, en una hora de exposición.

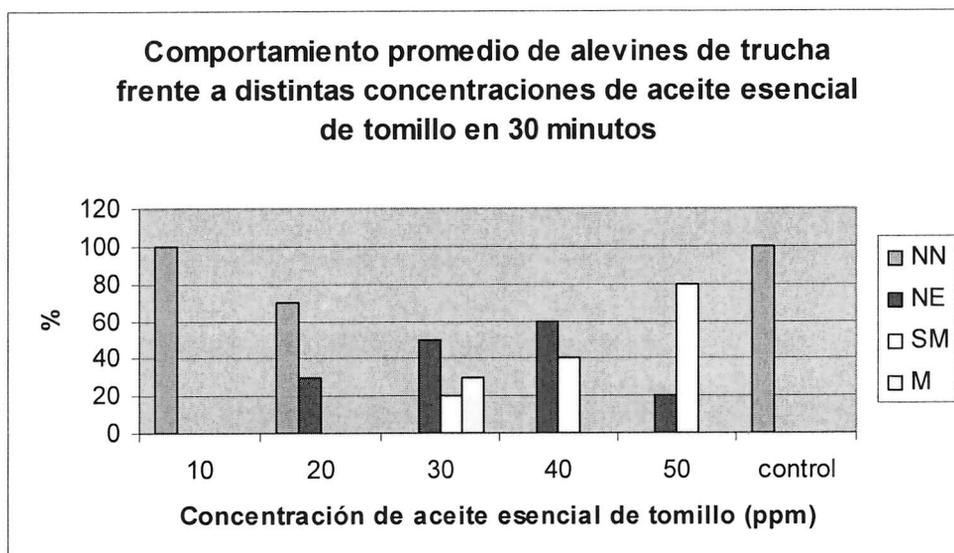
Estas pruebas fueron realizadas por triplicado, siendo los resultados un promedio del triplicado de estas pruebas. Además se consideraron los mismos cuatro criterios dependiendo del nado que presentaban los alevines es decir; nado normal (NN), nado errático (NE), sin movimiento (SM) y muerte (M).

Los resultados indican que a mayores concentraciones y tiempos de exposición, el comportamiento de los peces variaba de nado normal (NN), a nado errático (NE) y sucesivamente a sin movimiento (SM) y finalmente morían (M). La concentración con un 0% de aceite de tomillo, es decir el grupo control, mantuvo todos los peces con NN.

En las figuras siguientes se muestran el comportamiento de los alevines sometidos a baños con distintas concentraciones y a distintos tiempos de exposición.

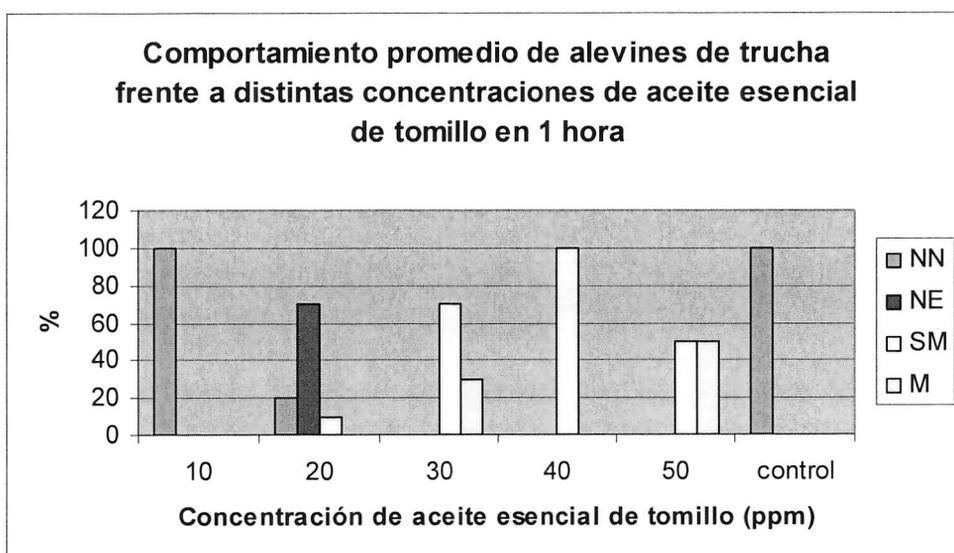
A los 10 minutos de exposición en aceite esencial de tomillo, el 100% de los peces expuestos a 10 y 20 ppm se encontraba con NN. A una concentración de 30 ppm el 40% de los peces se encontraba con NN, un 30% se encontraba con NE y un 30% se encontraba muerto, esto último se debió más a problemas de manejo que a la acción del aceite. Alevines expuestos a una concentración de 40 y 50 ppm, el 100% de los alevines se encontraba con NE a los 10 minutos de tratamiento. (Fig. 30)

Transcurridos 20 minutos de exposición, el 100 % de los alevines sometidos a 10 ppm se encontraba con NN. Mientras que a una concentración de 20 ppm el 70% de los alevines se encontraba con NN y un 30% mostraba NE. A medida que la concentración aumentaba el efecto se hacía más notorio, es así que a 30 ppm el 70% de los alevines se comportó con NE, mientras que un 30% de ellos ya había muerto. A las concentraciones 40 y 50 ppm el 100% de los peces se encontraba con NE. (Fig 31).

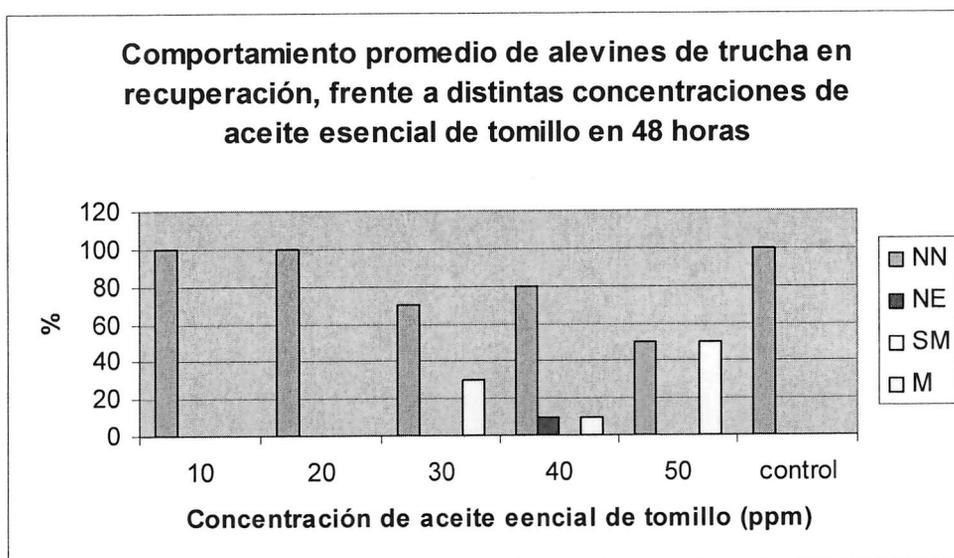


**Figura. 32. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 30 minutos.**

En las pruebas de 30 minutos de exposición, el 100% de los peces expuestos a 10 ppm se mantenían con NN, pero a 20 ppm el porcentaje de alevines con nado normal disminuyó a un 70%. A la concentración de 30 ppm un 50% de los peces mostraba NE, un 20% estaba SM y un 30% estaba muerto. Con 40 ppm de concentración, no se registraron peces con NN, un 60% de los peces presento NE, mientras que el 40% se comporto sin movimiento (SM). A las 50 ppm el 20% de los peces se encontraba con NE, mientras que un 80% de ellos se se mostró sin movimiento (SM). (Fig. 32).



**Figura. 33. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 1 hora.**



**Fig. 39 Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 48 horas.**

Finalmente luego de 48 horas en experimentación se observa que los comportamientos se mantienen constantes con respecto a las mediciones anteriores es decir, las concentraciones de 10 ppm, 20 ppm y la control mantiene un 100% de NN, las concentraciones de 30 ppm presentan un 70% con NN y en el 30% restante se observó mortalidad, con 40 ppm se obtuvo un 80% de NN y un 20% de NE y con 50 ppm los porcentajes de NN bajan a un 40% los alevines con nado errático corresponden a un 10% mientras que los muertos se incrementan a un 50%.

#### 2.2.2.1 Determinación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo diluido en Dimetilsulfoxido (DMS) en alevines de truchas. Resultado de actividades incorporadas.

Se realizaron pruebas de aceite esencial de tomillo a concentraciones entre 10 ppm y 200 ppm. diluido con dimetilsulfoxido al 15%, obteniéndose los siguientes resultados.

Contrastando los resultados de la Tabla 23 con los resultados indicados en la Tabla 24, es posible proponer que, en relación al efecto preventivo en el tratamiento de hongos, la concentración de 100 ppm es más efectiva que el tratamiento con Bronopol ya que se obtiene un 55% de ovas con hongos, mientras que el tratamiento con Bronopol presentan un 64% de ovas con hongos. Si bien es cierto que con el tratamiento control, 0 ppm, se registra un 35% de ovas con hongos, la sobrevivencia observada esta por debajo de los tratamientos de 100 ppm de aceite de tomillo y 50 ppm de Bronopol. (Tabla 23).

En las concentraciones más altas de aceite de tomillo se observa que las ovas presentan un menor porcentaje de formación y crecimiento de hongos, pero los porcentajes de sobrevivencia son mucho menores

Por lo tanto se puede inferir que a mayores concentraciones no hay formación ni crecimiento de hongos pero se produce una baja sobrevivencia de ovas, de manera inversamente proporcional las menores concentraciones presentan mayor porcentaje en sobrevivencia y se produce un pequeña formación y crecimiento de hongos.

Un porcentaje mayor de ovas muertas con hongos significa que existen en el medio mejores condiciones de propagación para la saprolegnia, efecto que con el tratamiento con 100 ppm de tomillo se estaría anulando. Por lo tanto, con estos resultados es posible indicar que baños con 100 ppm de aceite de tomillo, aplicado como tratamiento preventivo en la formación y crecimiento de hongos, resultarían más efectivos que los otros tratamientos aplicados.

### **3.2. Resultados del tratamiento preventivo y curativo en alevines.**

#### 3.2.1. Resultados de tratamientos preventivos por medio de alimento.

De igual manera a lo enunciado en el punto anterior, esta prueba se vio truncada al producirse una sobrecarga de amonio, debido a esto, se implementó un nuevo sistema de recirculación y tratamiento de amonio para la repetición de la prueba.

No obstante lo anterior, no se observó formación de hongos en ninguno de los tratamientos con aceite de tomillo utilizados en los peces mientras duró la prueba.

#### 3.2.2. Resultados de tratamientos preventivos en alevines por medio de baños.

La experiencia se realizó por 4 semanas. Al aplicar los baños por una hora, se observó que en los primeros minutos con 4 ppm de timol, los peces mostraron un nado errático pero pasado los 5 primeros minutos los

2. Se trabajó con un sistema tipo cámara de aislamiento de vidrio de tal forma de aislar el contenido de las placas con hongos y a su vez mantener el ambiente aislado de otras fuentes posibles de infección.
3. Se dispuso de alcohol para desinfectar los utensilios empleados para la infección, y un mechero Bunsen para esterilizar.
4. Se contó con placas Petri con hongos para inocular en los cortes que se realizaron a cada ejemplar de trucha.
5. Se utilizaron Baldes para anestesiado y recuperación, anestésico, pesa y huincha para mediciones.

Se extrajeron los peces de los estanques y se depositaron en el container con anestésico, se esterilizaron los bisturís y material para inocular los hongos, luego se tomó cada pez y en la cámara de aislamiento, se realizaron los cortes en la aleta y en el dorso de los peces y se infectaron las heridas con los hongos disponibles en las placas Petri. Posteriormente, los peces se depositaron en el estanque de recuperación y finalmente se devolvieron a su estanque original. (Figura 7).

En la cuarta semana se procedió a la infección de los alevines, de la misma forma descrita en el punto anterior, para determinar el efecto preventivo de los baños en el desarrollo de saprolegnia en las truchas.

### 3.2.2 Tratamiento preventivo en alevines por medio de baños

Se mantuvieron en 8 estanques, uno control y tres experimentales (en duplicado), alevines de tamaño homogéneos a los que se les efectuaron baños con dosis diferentes (tres niveles y un control) de aceite esencial de tomillo por al menos dos semanas, previo a la exposición al hongo. Como desafío se empleó Bronopol.

Los peces fueron expuestos al hongo en condiciones estándar de cultivo, y se evaluó en forma continua la evolución de la cepa de mayor presencia en los cultivos sobre los peces. Para garantizar la exposición de los alevines al hongo presente en el agua, se les realizó una herida, extrayendo en cada ejemplar de cultivo 2 mm<sup>2</sup> de piel a la altura del pedúnculo caudal por sobre la línea lateral. La herida fue superficial, afectando sólo a la piel, para no comprometer otros órganos, ni musculatura del pez. La presencia del saprolegnia en el agua fue determinada *in situ*, al momento de iniciar la experiencia. Como indicador del resultado se efectuó una evaluación final de los peces y su respuesta a la exposición a la que fueron sometidos, determinando mediante un análisis micológico el nº de colonias formadas.

### 3.2.3 Tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris

3.2.3.1 Tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris por alimento con aceite esencial de tomillo: Con el fin de verificar el efecto

curativo del timol, se trabajó con truchas ya infectadas con al menos 2 cepas de Saprolegnia o más, si es que existen más de dos. Cuando el hongo se desarrolló, se determinó el grado de infestación, el que se consideró como nivel inicial, el cual se contrastó con los resultados finales luego del término del bioensayo de alimentación. Para tal efecto se determinó el número de peces a partir del volumen de agua de cada estanque, peso promedio de los peces y densidad de cultivo máxima estimada en 5 kg/m<sup>3</sup>. Previo a la alimentación se facilitó la infestación de los peces con el hongo de mayor presencia en los cultivos (1 cepa), para lo cual se le extrajo a cada pez 2 mm<sup>2</sup> de piel a la altura del pedúnculo caudal por sobre la línea lateral. La herida realizada fue superficial, afectando sólo a la piel, para no comprometer otros órganos, ni musculatura del pez.

Una vez seleccionados y distribuidos los peces de 4 g en los estanques, se realizó un proceso de adaptación al nuevo alimento, para esto se comenzó a suministrar alimento comercial, el que fue gradualmente reemplazado por el alimento de prueba. Este proceso se realizó dentro de 1 semana. Como desafío se empleó Bronopol.

Los peces fueron alimentados durante 4 meses, con alimentos conteniendo concentraciones de aceite de timol definidas en los ensayos anteriores. Al finalizar la experiencia se verificó la presencia de hongos visualmente y mediante análisis micológico. Como indicador de resultado se definió el número de peces enfermos en comparación con el grupo control., además, para los peces sobrevivientes, se comparó el % de superficie del pez afectada en comparación a cuando se manifestó la infestación. Acorde a ello, se determinó si los peces empeoraron o si ha hubo algún grado de mejoría parcial o total. Frente a la mortalidad de alguno de los peces, se efectuó un análisis patológico para definir la verdadera causa de ésta y eventualmente, determinar el grado de propagación de saprolegnia a otros órganos o tejidos.

3.2.3.2 Tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris por medio de baños con aceite esencial de tomillo: Al igual que en el caso de la evaluación del efecto preventivo, se realizaron baños con aceite esencial de timol en peces previamente infectados con hongos para evaluar el efecto curativo del aceite. La infestación se realizó infiriendo heridas de 2 mm<sup>2</sup> con al menos 2 cepas, las heridas fueron superficiales afectando sólo a la piel, para no comprometer otros órganos, ni musculatura del pez. Cuando el hongo se desarrolló, se determinó el grado de infestación, el cual se define como el nivel inicial, el que se contrasta con los resultados finales luego del término del bioensayo de alimentación.

En esta experiencia se probaron 3 concentraciones de baños en aceite esencial de tomillo en solución acuosa durante 1 hora. La periodicidad y concentración de los baños se definió de acuerdo a los resultados

previos, es decir, al resultado del análisis micológico que definió la presencia de saprolegnia. Al finalizar la experiencia se verificó la presencia de hongos visualmente y mediante análisis micológico. Como desafío se empleó Bronopol.

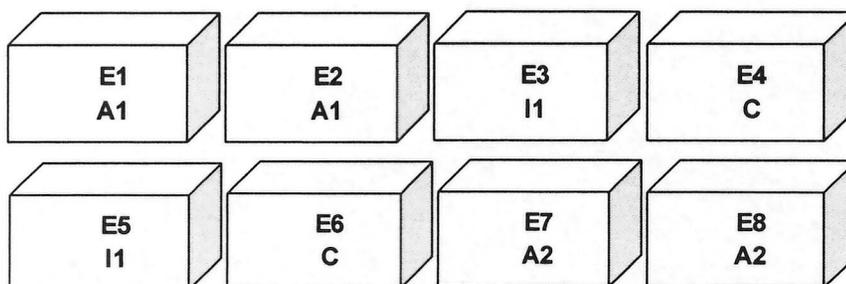
**Objetivo 4. Realizar pruebas a escala piloto para validar los resultados obtenidos en los objetivos 2 y 3.**

**4. Realizar pruebas a escala piloto para validar los resultados obtenidos en los objetivos 2 y 3.**

4.1.1. Tratamiento preventivo por medio de alimentos en trucha arcoiris (Original en Río Blanco, reprogramada y cambiada a ECM).

Se procedió a seleccionar y colocar 30 peces por acuario, cada acuario presenta un volumen de 50 l. El peso promedio de los peces al inicio de la prueba fue de 2,3 g y una talla de 5,7 cm.

Las dietas a probar corresponden a 1 y 2 ppm de timol de aceite Ámbar y a 1 ppm de timol de aceite India, además de una dieta control sin inclusión de aceite de tomillo. La asignación de cada una de las dietas a sus correspondientes acuarios, se realizó al azar y en duplicado, configurándose el siguiente esquema:



**Figura 3. Asignación de dietas en acuarios de prueba.**

Los peces se alimentaron con las dietas de prueba por un período de 2 semanas previo a la inoculación del hongo.

4.1.2. Pruebas piloto en Piscicultura Río Blanco tratamiento preventivo por medio de baños en trucha arcoiris.

Con el propósito de realizar baños preventivos contra la infección de *Saprolegnia sp.* en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se realizó el trabajo experimental en la piscicultura de Río Blanco, durante los

meses de octubre, a diciembre de 2006. Se habilitaron 12 estanques de 0,27 m<sup>3</sup> con flujo continuo de agua. Se colocaron 23 peces de 31 g en promedio en cada estanque, cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

En esta experiencia fueron evaluadas dos concentraciones de aceite de tomillo; 2 ppm y 4 ppm, además como controles se utilizó Bronopol a una concentración de 15 ppm (fungicida, como control positivo) y como control negativo se utilizó solamente agua.

Para asegurar la correcta y homogénea distribución del aceite en todo el volumen de agua, se instaló una bomba conectada a una manguera dentro del estanque, que permitió recircular el agua durante el tiempo de aplicación. En total se utilizaron 12 estanques, los cuales fueron distribuidos y rotulados al azar, quedando como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1. Distribución de estanques de experimentación por tratamiento en la piscicultura de Río Blanco.**

Estanque N°	Rótulo	Tratamiento	Concentración (ppm)
1	E1C1	Tomillo	2
2	E2C2	Tomillo	4
3	E3Control-	Agua	0
4	E4C1	Tomillo	2
5	E5Control-	Agua	0
6	E6Control+	Bronopol	15
7	E7C2	Tomillo	4
8	E8Control-	Agua	0
9	E9Control+	Bronopol	15
10	E10C1	Tomillo	2
11	E11Control+	Bronopol	15
12	E12C2	Tomillo	4

Para establecer la cantidad de solución de timol en cada uno de los estanques, se calculó previamente el volumen de agua de cada uno. El flujo de agua se suspende y se instala un difusor con una manguera conectada a un blower, para de esta forma asegurar la aireación de cada estanque mientras el flujo de agua está cortado. Cada baño tiene una duración de 30 min.

Para observar el efecto del aceite de tomillo en la prevención del ataque de *Saprolegnia sp.*, transcurrido el tiempo de experimentación, se contabilizó el número de peces infectados con el hongo, en cada uno de los estanques de prueba con tomillo y los controles. Además, con una cuadrícula se determinó el área infectada por el hongo en los peces de cada tratamiento.

Para producir una infección por *Saprolegnia sp.* en cada uno de los peces, se procedió a infectarlos con un inóculo del hongo, obtenido éste de una siembra del hongo en placa Petri. Se anestesiaron 10 peces, en la aleta caudal de cada pez se realizó con un bisturí un corte de aproximadamente 1 cm., posteriormente con un asa de loop o una espátula esterilizada se procedió a inocular al pez en la herida. Una vez infectados los 10 peces, fueron devueltos al estanque de prueba para luego anestésiar otros 10 y así hasta completar la totalidad de los peces del estanque y posteriormente los 276 peces de los doce estanques. Adicionalmente para asegurar la presencia de *Saprolegnia sp.*, se dispuso en todos los estanques de una bolsa de malla fina en contacto con el agua. Esta bolsa llevaba en su interior un trozo de agar de unos 4 x 2 cm, los cuales se sacaron de una placa de Petri totalmente colonizada por el hongo.

#### 4.1.2. Pruebas piloto en Piscicultura Río Blanco tratamiento preventivo por medio de baños en trucha arcoiris.

Con el propósito de realizar baños preventivos contra la infección de *Saprolegnia sp.* en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se realizó el trabajo experimental en la piscicultura de Río Blanco, durante los meses de octubre, a diciembre de 2006. Se habilitaron 12 estanques de 0,27 m<sup>3</sup> con flujo continuo de agua. Se colocaron 23 peces de 31 g en promedio en cada estanque, y se realizaron tres repeticiones.

En esta experiencia fueron evaluadas dos concentraciones de aceite de tomillo; 2 ppm y 4 ppm, además como controles se utilizó Bronopol a una concentración de 15 ppm (fungicida, como control positivo) y como control negativo se utilizó solamente agua.

Para asegurar la correcta y homogénea distribución del aceite en todo el volumen de agua, se instaló una bomba conectada a una manguera dentro del estanque, que permite recircular el agua durante el tiempo de aplicación. En total se utilizan 12 estanques, los cuales fueron distribuidos y rotulados al azar, como se indica en la Tabla 2.

Para establecer la cantidad de solución de timol en cada uno de los estanques, se calculó previamente el volumen de agua de cada uno de los estanques. El flujo de agua es suspendido y se instala un difusor con una manguera conectada a un blower, para de esta forma asegurar la aireación de cada estanque mientras el flujo de agua está cortado. Cada baño tiene una duración de 30 min.

**Tabla 2. Distribución de estanques de experimentación por tratamiento en la piscicultura de Río Blanco.**

Estanque N°	Rótulo	Tratamiento	Concentración (ppm)
1	E1C1	Tomillo	2
2	E2C2	Tomillo	4
3	E3Control-	Agua	0
4	E4C1	Tomillo	2
5	E5Control-	Agua	0
6	E6Control+	Bronopol	15
7	E7C2	Tomillo	4
8	E8Control-	Agua	0
9	E9Control+	Bronopol	15
10	E10C1	Tomillo	2
11	E11Control+	Bronopol	15
12	E12C2	Tomillo	4

Para determinar el efecto del aceite de tomillo en la prevención del ataque de *Saprolegnia sp.*, transcurrido el tiempo de experimentación se contó el número de peces infectados con el hongo en cada uno de los estanques de prueba con tomillo y los controles. Además, con una cuadrícula se determinó el área infectada por el hongo en los peces de cada tratamiento.

Para producir una infección por *Saprolegnia sp.* en cada uno de los peces, se procedió a infectarlos con un inóculo del hongo, obtenido éste de una siembra del hongo en placa Petri. Se anestesiaron 10 peces, en la aleta caudal de cada pez se realizó con un bisturí un corte de aproximadamente 1 cm., posteriormente con un asa de loop o una espátula esterilizada se procedió a inocular al pez en la herida. Una vez infectados los 10 peces, fueron devueltos al estanque de prueba para luego anestésiar otros 10 y así hasta completar la totalidad de los peces del estanque y posteriormente los 276 peces de los doce estanques.

Adicionalmente con el fin de asegurar la presencia de *Saprolegnia sp.*, se dispuso en todos los estanques de una bolsa de malla fina en contacto con el agua. Esta bolsa llevaba en su interior un trozo de agar de unos 4 x 2 cm, los cuales se sacaron de una placa de Petri totalmente colonizada por el hongo.

## 4.2 Ensayos en ovas de salmón coho.

Por problemas de disponibilidad de ovas de salmón coho, se debió trabajar con ovas salmón Atlántico (*Salmo salar*), las que fueron trasladadas desde la Piscicultura Ensenada en la localidad de Cascada, X Región, al hatchery de la Escuela de Ciencias del Mar, en Valparaíso.

### 4.2.1. Tratamiento curativo en ovas de salmón.

Para la mantención de las ovas, se utilizaron cuatro acuarios de 40 X 30 X 50 cm, en los cuales se dispusieron 3 cunas. Las concentraciones utilizadas se distribuyeron al azar siendo estas de 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm y 500 ppm. A diferencia de las pruebas antes efectuadas con las ovas de trucha, se implementó un sistema de distribución independiente para cada cuna. (Fig. 4.)

Previo al comienzo de los baños y para favorecer el desarrollo de saprolegnia, se ubicaron en el centro de cada cuna 10 ovas muertas, a modo de sustrato para el surgimiento del hongo. Para los baños de ovas de *Salmo salar*, prueba que se extendió por 14 días, se siguió mismo protocolo aplicado en el baño de las ovas de trucha.

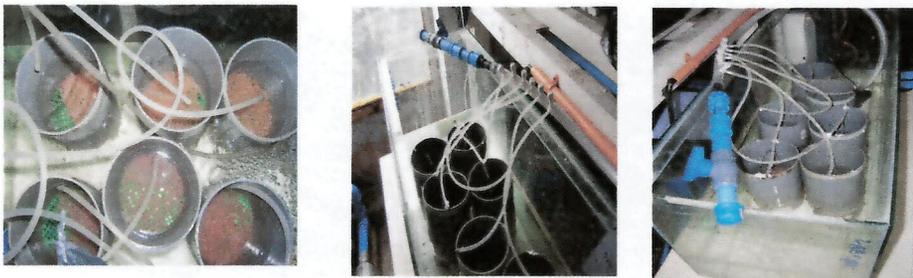


Figura 4: Tratamiento curativo en ovas de Salmon.

### 4.2.2 Ensayos en Salmón Coho.

Estas pruebas originalmente se realizarían en las instalaciones de Cetecsal. Debido a que en Cetecsal se originó un cambio de orientación, políticas, y un cambio de Gerente, la empresa se orientó al área de evaluación de impacto ambiental, suprimiendo la actividad en los centros de experimentación. En reunión con el Ejecutivo de Proyecto FIA sobre la realización de este objetivo, se nos consultó si al desarrollar estas pruebas se obtendrían resultados diferentes a los ya encontrados en Trucha, a lo cual el equipo de investigación contestó que se obtendrían resultados diferentes, se procedió a prescindir de esta actividad.

### **4.3. Aceite esencial de tomillo validado para su uso en ovas de trucha arco iris, en tratamientos curativos y preventivos.**

Los ensayos fueron realizados en la piscicultura de Río Blanco, ubicada a 34 Km de la ciudad de Los Andes, por un período de dos meses (julio y agosto de 2006). El material utilizado fueron ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), las cuales fueron desovadas y fecundadas por 42 hembras y 15 machos respectivamente, tres días antes de comenzar el experimento, tiempo durante el cual se procedió a retirar las ovas que se tornaban blancas, es decir, las que ya no eran viables al momento del experimento.

Antes de comenzar, se habilitaron 10 bateas de concreto, de 85 l aproximadamente, con flujo continuo de agua, sobre las cuales se distribuyeron 30 cunas fabricadas de madera y malla de alambre (42 x 39 x 6, 5 cm.), distribuidas tres por cada batea, con el objeto de tener tres réplicas (Fig. 5 a 9).

El ensayo fue dividido en dos partes, primero se realizó una experiencia en la que se utilizaron aproximadamente 45.000 ovas verdes, las cuales se utilizaron hasta el estado de ova con ojo y una segunda experiencia donde se emplearon otras 45.000 ovas ojo aproximadamente, las cuales fueron utilizadas hasta su eclosión. En ambas experiencias se realizó un tratamiento curativo y un tratamiento preventivo. En la primera fueron evaluadas tres concentraciones: 400, 600 y 800 ppm de aceite de tomillo, y un control con un fungicida comercial Bronopol. Para el tratamiento preventivo se evaluaron tres concentraciones de aceite de tomillo, las que esta vez fueron: 200, 400 y 500 ppm, y como control el mismo fungicida anterior. Estas concentraciones fueron las que se ensayaron en placas e informadas en el Informe Técnico de Gestión N° 2.

Los resultados de cada tratamiento fueron evaluados según los siguientes parámetros:

- número de ovas vivas,
- número de ovas muertas con hongo,
- número de ovas muertas sin hongo y
- área abarcada por el hongo

#### **4.3.1. Tratamiento curativo en ovas de trucha arco iris.**

4.3.1.1. En ovas verdes de trucha arco iris: Una vez instaladas las cunas, se ubicó un tubo de PVC de 75 mm. de diámetro y 90 mm. de largo en el centro de cada una de ellas (Figura 5), posteriormente se situaron, dentro de los tubos y a manera de inóculo, 100 ovas que se encontraban notoriamente infectadas con *Saprolegnia sp.*, y cuyo micelio era abundante en la superficie de éstas (Figura 6).

Cabe destacar que previamente se había tomado muestras de las ovas infectadas, las que fueron aisladas y cultivadas en agar GY por cuatro días a una temperatura de 23° C, tiempo tras el cual se desarrolló un micelio que permitió comprobar que las ovas estaban efectivamente infectadas con el hongo. Parte de esta cepa, una vez cultivada en placas de Petri, sirvió como inóculo para las pruebas con alevines.

Luego, alrededor de los tubos, donde se encontraban las 100 ovas infectadas, se colocaron aproximadamente 1500 ovas sanas (Figura 7). El tubo de PVC se mantuvo hasta antes del comienzo de la experiencia, como una forma de mantener aisladas las ovas con hongo del resto.

Cada batea constaba de tres repeticiones, además para asegurar la correcta y homogénea distribución del aceite en toda la batea, se instaló una bomba de agua conectada a una manguera que bordeaba la batea y que permitía recircular el agua durante el tiempo que duraran las pruebas (Figura 8). Los tratamientos fueron cinco y se distribuyeron según se indica en la Tabla 3.

**Tabla 3. Distribución de tratamientos por bateas en pruebas curativas en ovas verde de trucha arco iris.**

Batea N°	Rótulo	Tratamiento	Concentración (ppm)
3	B3C2	1. Tomillo	600
4	B4C1	2. Tomillo	400
5	B5C3	3. Tomillo	800
6	B6Control	4. Bronopol	50

Para realizar los baños a las ovas con las distintas concentraciones a probar fue necesario cortar el flujo de agua, para calcular el volumen y aplicar las concentraciones en función del volumen de las bateas (Figura 9), una vez detenido el flujo de la batea a trabajar, se comenzaba con los baños. Para todos los tratamientos se estandarizó el volumen de las bateas y se trató de llevar siempre a un volumen aproximado de 75l.



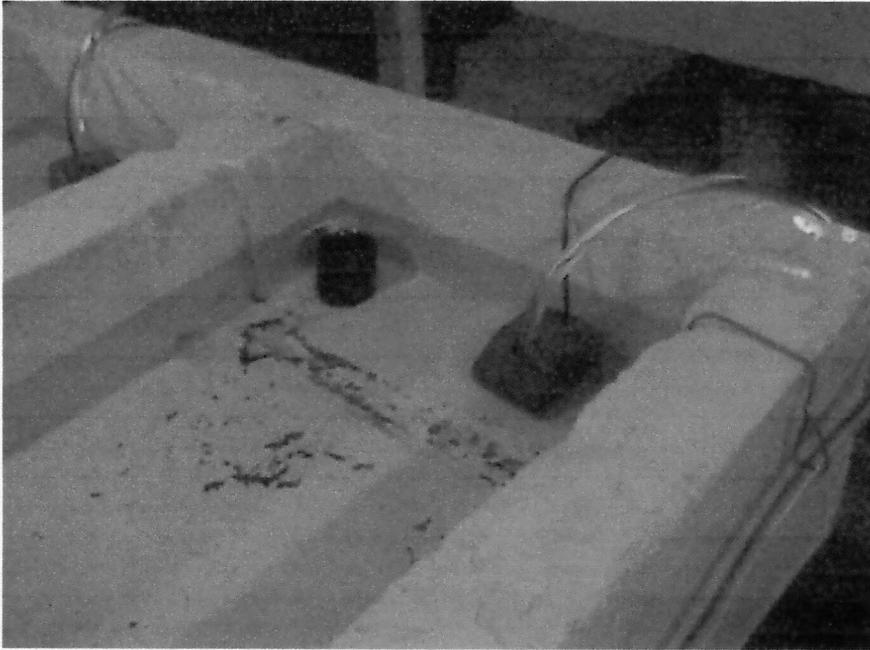
**Figura 5. Ubicación de ovas muertas en el centro de la cuna.**



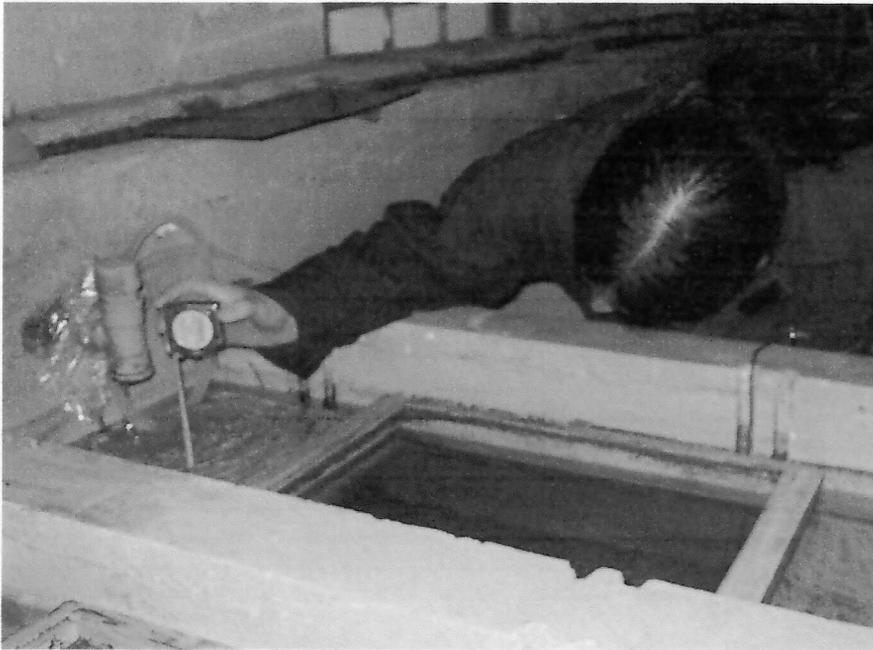
**Figura 6. Disposición de ovas en cuna.**



**Figura 7. Ubicación de ovas sanas alrededor de tubos de PVC con ovas muertas.**



**Figura 8. Instalación de bomba de recirculación en batea.**



**Figura 9. Cálculo del volumen de agua en la batea.**

4.3.1.2 Desarrollo de los baños para tratamiento curativo en ovas con ojo de trucha arco iris: Para el tratamiento Control, se pesaron entre 3,7 y 3,8 g de Bronopol para obtener la concentración deseada de 50 ppm, luego se diluía y homogenizaba en un balde de 20 l. (Figura 10). La distribución de la solución en la batea se realizaba gracias a una bomba de agua. (Figura 11). El baño se prolongaba por 30 minutos, de acuerdo a los resultados obtenidos en las etapas anteriores informadas en el informe 1 y 2, además se consideró estandarizar el tiempo en función de la información proporcionada por las empresas participantes en el proyecto.

Luego se realizaron los baños con las distintas concentraciones de tomillo. Se comenzó con la menor concentración, es decir, 400 ppm. Con el volumen de 75 l de la batea, se utilizó aproximadamente 30 ml. de aceite de tomillo para alcanzar la concentración deseada, los cuales eran medidos en una probeta graduada y posteriormente eran vertidos en una licuadora con un volumen aproximado de 1250 ml (Figura 12). La licuadora se accionaba por un período de 10-15 segundos, para permitir la correcta mezcla del agua con el aceite, luego su contenido se distribuía entre las cunas (Figura 13). El tratamiento se mantenía por un período de 30 minutos. Para los baños con las concentraciones de 600 ppm y 800 ppm, se procedió de la misma manera señalada en el párrafo anterior.



**Figura 10. Obtención de agua para preparación de la solución de tomillo.**



**Figura 11. Bomba utilizada para la distribución de la solución de Bronopol en la batea.**



**Figura 12. Preparación de solución de tomillo.**



**Figura 13. Distribución de solución de tomillo en bateas.**

#### 4.3.2. Tratamiento preventivo en ovas de trucha arco iris.

4.3.2.1. Tratamiento preventivo en ova verde de trucha arco iris: Esta experiencia se realizó de forma similar a la experiencia anterior, en cuanto a la aplicación de los baños, la diferencia estuvo en que esta vez no hubo aplicación de un inóculo inicial de ovas infectadas con el hongo. Se utilizaron cinco bateas de dimensiones y volumen idénticos a los anteriores, las cunas fueron las mismas, además se consideraron tres repeticiones por tratamiento y en cada una de las cunas se dispusieron 1500 ovas. Cada tratamiento se distribuyó como se cita en Tabla 4.

**Tabla 4. Distribución de tratamientos por bateas en pruebas preventivas en ovas verde de trucha arco iris.**

Batea N°	Rótulo	Tratamiento	Concentración (ppm)
8	B8C3	1. tomillo	800
9	B9Control	2. bronopol	50
10	B10C1	3. tomillo	400
12	B12C2	4. tomillo	600

El baño con cada uno de los tratamientos se mantenía por un período de 30 minutos, una vez finalizado se detenía la bomba de agua y se renovaba el flujo de agua en la batea.

4.3.2.2. Tratamiento preventivo en ovas con ojo de trucha arco iris: Esta experiencia se realizó de forma similar a las experiencias anteriores, en cuanto a la aplicación de los baños, la diferencia estuvo en que esta vez no hubo aplicación de un inóculo inicial de ovas infectadas con el hongo. Se utilizaron cinco bateas de dimensiones y volumen idénticos a los anteriores, las cunas fueron las mismas, también se consideraron tres repeticiones por tratamiento y en cada una de las cunas se dispusieron aproximadamente 1500 ovas. Los tratamientos se distribuyeron como se indican en la Tabla 5.

**Tabla 5. Distribución de tratamientos por bateas en pruebas preventivas en ovas ojo de trucha arco iris.**

Batea N°	Rótulo	Tratamiento	Concentración (ppm)
8	B8C3	1. tomillo	500
9	B9Control+	2. bronopol	50
10	B10C1	3. tomillo	200
12	B12C2	4. tomillo	400

Primero se realizó el tratamiento control con 50 ppm de Bronopol y luego los tratamientos con tomillo 400, 600 y 800 ppm. El tratamiento con cada una de las concentraciones se mantenía igualmente por un período de 30 minutos, transcurrido este tiempo se detenía la bomba de agua y se hacía correr el flujo de agua en la batea. Los baños se realizaban cada 48 hrs.

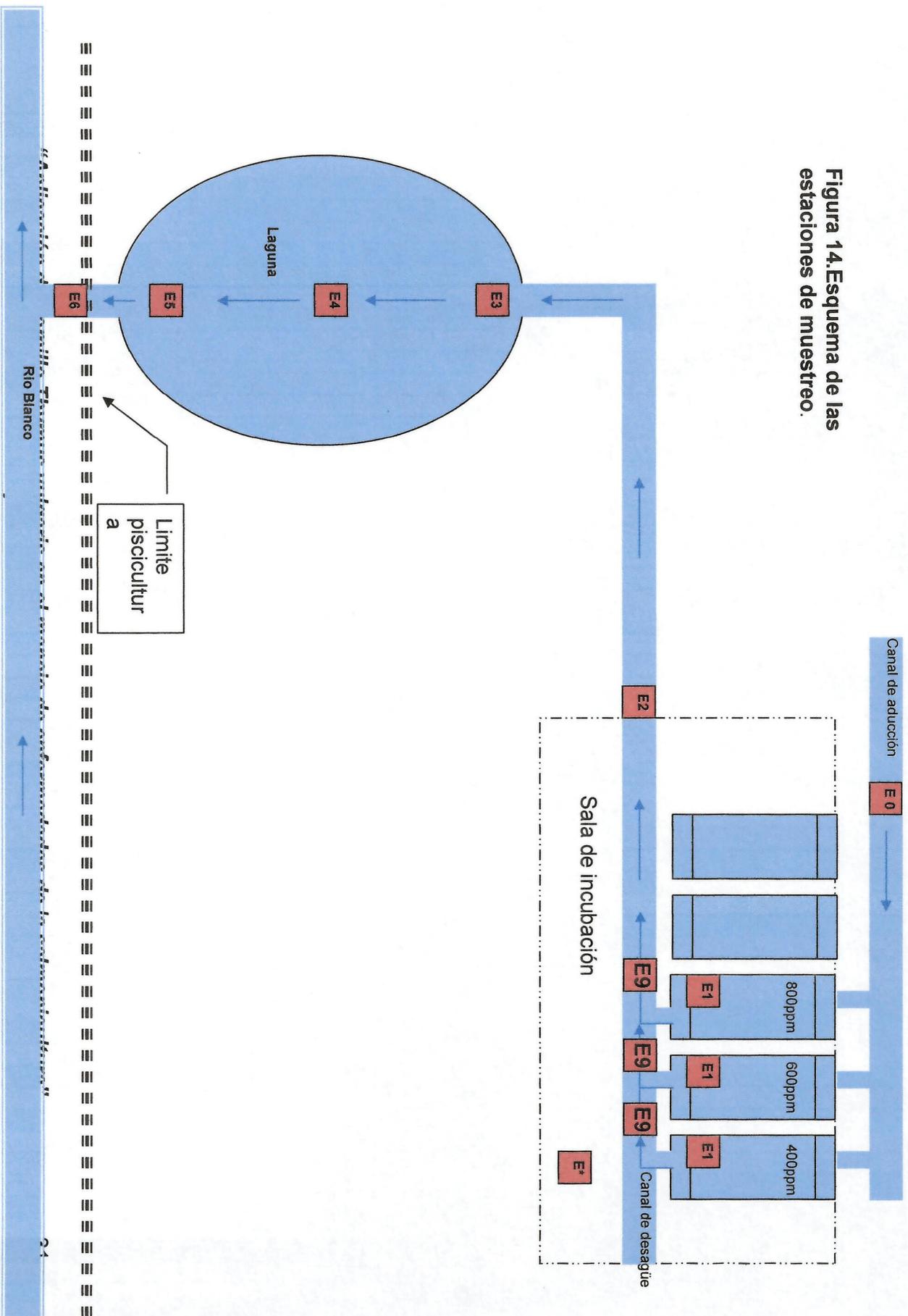
#### **4.4 Estudio del riesgo asociado a la eliminación de altas dosis de aceite esencial al medio.**

##### **4.4.1 Definición de estaciones de muestreo**

Para determinar el número de estaciones de muestreo y su ubicación, se utilizó la configuración y recorrido de las aguas evacuadas provenientes de la sala de incubación de la piscicultura. Las estaciones de muestreos (Fig. 14) se describen a continuación:

- E0 aducción de agua.
- E1 3 Bateas (E1.400; E1.600; E1.800); donde E1.400; E1.600; E1.800 corresponden a las bateas en las cuales se realizaron los baños a concentración de 400 600 y 800 ppm de aceite de tomillo respectivamente.
- E2 Salida de sala de incubación
- E3 Entrada de la laguna
- E4 Centro de la laguna
- E5 Salida de la laguna
- E6 Salida de la piscicultura
- E9 Canal de desagüe sala incubación (inmediatamente después del desagüe de la batea en la cual se realizó el baño con aceite de tomillo). Esta corresponde a una estación que se incorporó en el momento en que se realizó la toma de muestras, y su número no secuencial se designó para tener una mejor identificación de ésta al momento de realizar la tomas de muestras.
- E\* Sala de incubación, (muestra de aceite).

Figura 14. Esquema de las estaciones de muestreo.



#### 4.4.2. Determinación de residencia de las partículas entre estaciones.

Previo a la toma de muestra fue necesario determinar con mini-derivadores el tiempo promedio de residencia de las partículas que arrastra el agua entre estaciones de muestreo, para lo cual se cronometraron los tiempos que tomó el derivador en recorrer la distancia entre cada estación. Para lo cual se cronometraron 8 veces los recorridos desde la estación inicial a la final, de los cuales 3 fueron descartados obteniendo el resultado final del promedio de los 5 restantes. Los datos de los recorridos descartados fueron aquellos en los que el derivador no siguió su curso normal por efecto del viento y roces con el borde de la laguna.

#### 4.4.3. Toma de muestras.

Se tomaron muestras de las aguas de desagüe de la sala de incubación simulando condiciones de baños de tomillo en ovas. La experiencia se realizó en ovas puesto que, es en esta etapa cuando se utilizan concentraciones más elevadas de aceite esencial de tomillo para tratar la *Saprolegnia* y por ende las emisiones al medio son mayores.

Para la experiencia se utilizaron 5 bateas, realizándose baños con 3 concentraciones diferentes de aceite de tomillo (400,600 y 800 ppm), un control (+) y control (-), con una duración de 30 minutos cada baño, de igual manera a lo realizado en las pruebas de baños en ovas verdes y con ojo. El tiempo entre baños correspondió a intervalos de 20 minutos, este intervalo corresponde a lo que demora la preparación de la siguiente batea para comenzar el próximo baño y es similar al que fue utilizado en las pruebas anteriores de baños en ovas verdes y con ojo.

Las muestras fueron tomadas al inicio y final de cada baño en las correspondientes estaciones de muestreo. Luego, se continuo monitoreando a los 20; 40; 80; 180 minutos de realizado el último baño. La última muestra se obtuvo a las 24 horas del comienzo de los baños. En forma complementaria, antes del inicio de los baños se tomaron 2 muestras, que correspondieron al canal de aducción de agua para la sala de incubación y al aceite esencial con el cual se hicieron las pruebas, con el fin de tener la primera muestra como blanco y la segunda para conocer el perfil del aceite que se que se estaban realizando las pruebas.

El resumen con las estaciones de muestreo, tipo de análisis y tiempo de la toma de muestras se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Toma de muestras en el tiempo para análisis de agua según estación de muestreo y tipo de análisis.**

Estación	Tiempo en minuto															N° ANALISIS
	Antes 0	0	20	30	33	40	50	53	70	73	93	113	153	253	1440	
E0	CYT															1
E1.400		PT		PT	CYT			CYT		CYT						5
E1.600			PT				PT	CYT		CYT	CYT					5
E1.800						PT			PT	CYT	CYT	CYT				5
E9					CYT			CYT		CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	8
E2					CYT			CYT		CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	8
E3					CYT			CYT		CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	8
E4					CYT			CYT		CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	8
E5					CYT			CYT		CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	8
E6					CYT			CYT		CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	CYT	8
E0	Cyt															1

PT	Perfil Total
CYT	carvacrol y timol

65
----

Para los análisis de perfil total de aceites esenciales la toma de muestra se realizó al inicio y final de cada tratamiento con el fin de comparar la composición de aceite esencial en el agua en estos puntos.

En el caso de los análisis de Carvacrol y Timol, se realizó la toma de muestra en la estación inicial del recorrido luego de desechar el agua de las bateas con tratamientos (3 minutos después de comenzado el vaciamiento de las bateas) con el fin de asegurar la presencia y mezcla de agua con timol en las estaciones. Posteriormente se realizó el recorrido por las siguientes estaciones tomando las respectivas muestras (Figura 14).

## **Objetivo 5. Determinar a nivel experimental el costo de un tratamiento curativo y/o preventivo contra la saprolegniosis en salmones y truchas**

### **5.1 En ovas de salmón coho y trucha.**

Para determinar el costo de tratamiento en ovas de salmón coho y de trucha se deben conocer de los puntos anteriores:

- Dosis de aceite esencial a aplicar por cada 1000 ovas.
- Período de aplicación de aceite esencial.
- Precio aceite esencial.

Por lo tanto:

Costo tratamiento = (ppm de aceite esencial/1000 ovas)\* tiempo\* \$  
aceite esencial

Lo anterior tanto, para tratamiento curativo como preventivo.

### **5.2 En alevines de salmón coho.**

Estas pruebas originalmente se realizarían en las instalaciones de Cetecsal. Debido a que en Cetecsal se originó un cambio de orientación, políticas, y un cambio de Gerente, la empresa se orientó al área de evaluación de impacto ambiental, suprimiendo la actividad en los centros de experimentación. En reunión con el Ejecutivo de Proyecto FIA sobre la realización de este objetivo, se nos consultó si al desarrollar estas pruebas se obtendrían resultados diferentes a los ya encontrados en Trucha, a lo cual el equipo de investigación contestó que se obtendrían resultados diferentes, se procedió a prescindir de esta actividad.

### **5.3 En alevines de truchas.**

Para determinar el costo de tratamiento en alevines de trucha arcoiris se deben conocer de los puntos anteriores:

- Dosis de aceite esencial a aplicar por cada metro cúbico de agua.
- Período de aplicación de aceite esencial.
- Precio aceite esencial.

Por lo tanto: Costo tratamiento = (ppm de aceite esencial/m3)\* tiempo\* \$  
aceite esencial

Lo anterior tanto, para tratamiento curativo como preventivo.

## **Objetivo 6. Difundir los resultados al sector acuícola.**

Las actividades de difusión durante el desarrollo del proyecto se indican a continuación:

### **6.1 Diseño y elaboración póster difusión y papelería.**

Se diseñaron y elaboraron poster de difusión y boletería para ser presentados al momento del lanzamiento, seminario final y distintas actividades de difusión.

### **6.2 Diseño y construcción página web del proyecto.**

Para la construcción de la página, se utilizaron los siguientes aspectos técnicos:

- Creación de página web en formato HTML.
- Programación de un panel de control y mostrador de noticias en lenguaje PHP.
- Programación y diseño de un formulario de contacto en Actionscript, PHP y Flash.
- Inclusión de fotografías.

Además como parte del servicio de la construcción y diseño del sitio, se realizó la inscripción del dominio [www.proyectosaprolegniafia.cl](http://www.proyectosaprolegniafia.cl) en *nick* Chile, válido por dos años, y la creación y alojamiento de paginas web en servidor *hosting* de la empresa Eroad, válido por un año.

### **6.3 Lanzamiento del proyecto.**

Para el lanzamiento del proyecto se invitaron a empresas farmacéuticas, de la industria de alimentos y salmonicultores.

### **6.4 Reunión con empresarios.**

Se organizaron reuniones con las empresas participantes, para programar y realizar en conjunto las distintas actividades a desarrollar durante el proyecto, actividad que asegura el traspaso de los hitos del proyecto y el intercambio de información. Periódicamente se realizaron reuniones con los participantes del proyecto para programar las actividades de cada periodo y analizar los resultados obtenidos,

### **6.5 Desarrollo de Seminarios.**

Se realizaron seminarios en las cuales se entregó la información de los avances del proyecto con los resultados obtenidos hasta el momento según la etapa del proyecto.

### **6.6 Elaboración y distribución de boletín informativo para la prensa.**

Se elaboraron documentos de difusión del proyecto y se enviaron a medios escritos de comunicación.

### **6.7 Elaboración de manual.**

El manual se encuentra en la fase de impresión. Se adjunta un prospecto que se ha enviado a imprenta.

## 6.8 Seminario Multisectorial.

Al término del proyecto se realizó un seminario en la ciudad de Pto. Varas.

## V. RESULTADOS DEL PROYECTO Y ANALISIS.

**Objetivo 1. Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo y/o curativo para distintas cepas de saprolegnia**

### 1.1 Obtención y Purificación de cepas.

#### 1.1.1 Recolección de muestras de *Saprolegnia sp.* en centros de cultivo.

Se recolectaron en total 6 muestras de agua o de tejidos de distintos lugares visitados:

- ✓ Piscicultura Río Blanco (Saladillo, V Región).
- ✓ Piscicultura Entre Ríos (Talagante, Región Metropolitana).
- ✓ Lago Natri (Chiloé, X Región).
- ✓ Lago Tarahuin (Chiloé, X Región).
- ✓ Lago Llanquihue (Puerto Varas, X Región).
- ✓ Piscicultura CETECSAL (Chiloé, X Región).

A partir de estas muestras, luego de su cultivo, se obtuvieron las diferentes cepas de *saprolegnia parasítica*.

#### 1.1.2 Cultivo de cepas.

Se cultivaron todas las cepas extraídas de las muestras en placas petri (Fig. 15), no resultando ser *Saprolegnia parasítica* sólo una de ellas (Lago Tarahuin) y no se encontró *Saprolegnia* en la muestra de la Piscicultura Entre Ríos (Fig. 16). Por lo tanto, sólo se cultivaron 4 cepas.



**Figura. 15** Colonia *S. parasítica* con crecimiento complejo abundante.



**Figura. 16** Colonia obtenida desde la Piscicultura Entre Ríos.

**Tabla 7. Características generales de las cepas estudiadas.**

	<b>Cepa 1</b>	<b>Cepa 2</b>	<b>Cepa 3</b>	<b>Cepa 4</b>
<b>Origen</b>	Río Blanco Aleta dorsal, <i>O. mykiss</i>	Natri	Puerto Montt Branquias <i>O. mykiss</i>	Dalcahue Ovas <i>Salmo salar</i>
<b>Crecimiento a 30°C</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Crecimiento a 35°C</b>	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>Diámetro promedio hifas (µm)</b>	35	32	38	40
<b>Esporangio</b>				
<b>Largo (µm)</b>	370	360	370	390
<b>Ancho (µm)</b>	40	38	42	45
<b>Clamidosporas</b>	Presentes abundantes	Presentes escasas	Presentes	Presentes abundantes
<b>Oogonios</b>				
<b>Largo (µm)</b>	250	200	244	189
<b>Ancho (µm)</b>	150	120	142	100
<b>Anteridios</b>	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes

### 1.1.5 Mantenición de cepas en laboratorio.

Se logró mantener 5 cepas de saprolegnia. El medio empleado fue GYA agar, glucosa, extracto de levadura

## 1.2 Determinación de la actividad antifúngica preventiva.

### 1.2.1 Catastro Adquisición de productos en base a aceite esencial de tomillo a nivel internacional.

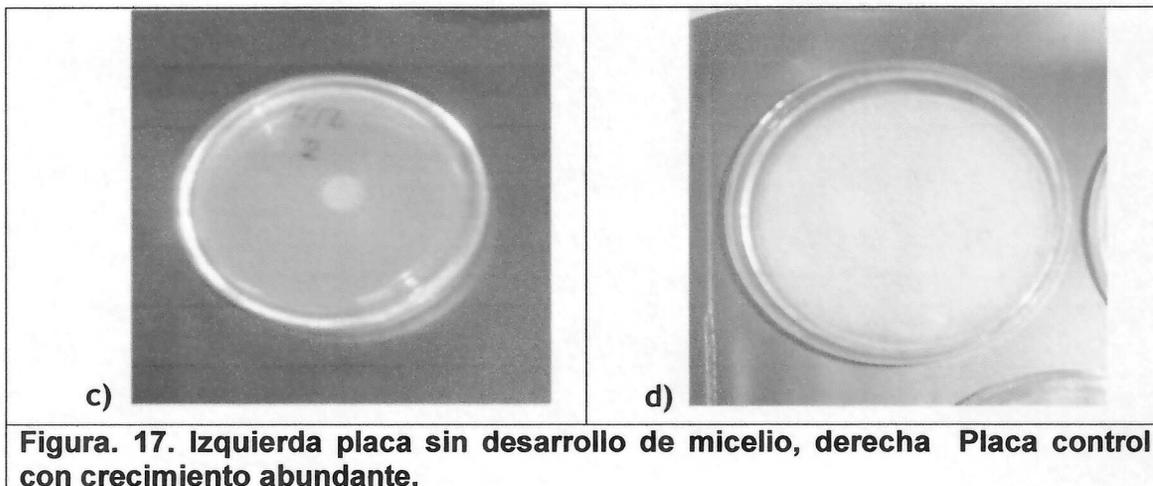
Se obtuvo información de 29 empresas extranjeras, sin embargo, sólo se obtuvo precios de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) de 15 de ellas. La respuesta a las cotizaciones y solicitudes enviadas fue de un 14 % correspondencia que se adjuntan en Informe (ver Anexo 1).

### 1.2.2 Análisis químicos de aceites esenciales.

Se determinó cuantitativamente la concentración de timol en los aceites esenciales de tomillo. Se tienen resultados que indican la presencia tanto de timol como de carvacrol en las tres muestras que se analizaron (ver anexo 2).

### 1.2.3 Evaluación de distintas concentraciones de aceite esencial (preventivo).

- a) Al cabo de una semana no se observó desarrollo de micelio en ninguna de las concentraciones estudiadas (50-500 ppm), salvo el grupo control que presentó crecimiento abundante (Fig. 17).
- b) Se observó inhibición del crecimiento a partir de los 150 ppm. (Fig. 17).



**Figura. 17. Izquierda placa sin desarrollo de micelio, derecha Placa control con crecimiento abundante.**

### 1.2.4 Pruebas de efecto inhibitorio de agente emulsificante: éter, alcohol y DMS, (Dimetilsulfoxido).

Al realizar las pruebas con los 3 solventes mencionados, se observó que hay un efecto inhibitorio de estos a partir de concentración al 15% o superiores, mientras que en concentraciones inferiores, es decir al 5% y 10% no hay diferencias entre los solventes y no se produce efecto inhibitorio sobre el crecimiento de saprolegnia.

### 1.2.5 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite TOM-IND-NAT-BL, diluido en éter, alcohol y DMS (Dimetilsulfoxido).

Al realizar las pruebas para determinar la concentración inhibitoria con aceite de Tomillo diluido con los 3 solventes mencionados, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Con alcohol hay un efecto inhibitorio a partir de una concentración al 25%
- Con el Eter hay un efecto inhibitorio a partir de una concentración al 15%
- Con el DMS hay un efecto inhibitorio a partir de una concentración al 20%

### 1.2.6 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite TOM-IND-NAT-BL, en agar y en semillas de cáñamo.

Se produjo inhibición en concentraciones de 1000 ppm pasadas las 12 horas de exposición. También se registró inhibición con 600 ppm pasadas 24 horas de exposición, y posterior a las 36 horas no hay crecimiento en todas las concentraciones.

### 1.2.7 Pruebas para determinar tiempo mínimo de inhibición de la actividad fúngica del aceite TOM-IND-NAT-BL.

Con respecto al tiempo de inhibición en las soluciones con aceite esencial se observó que:

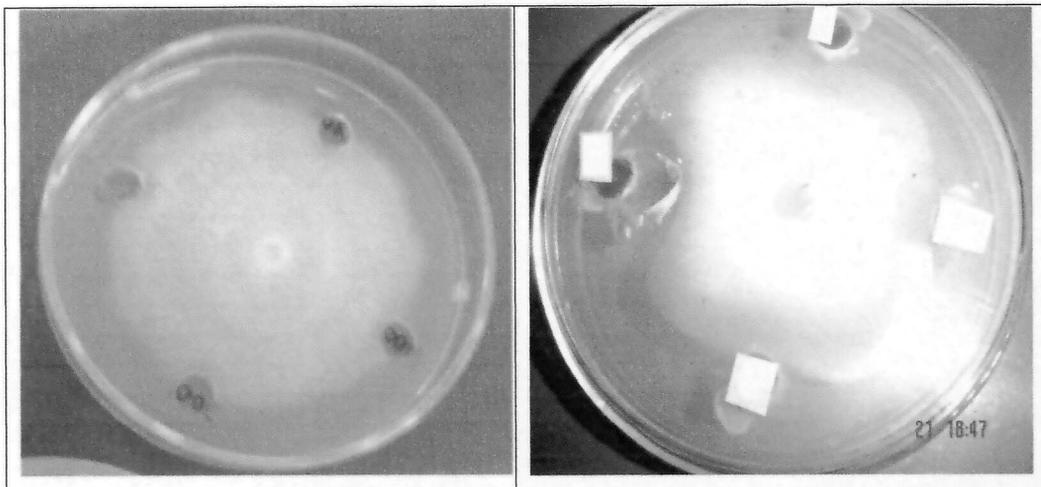
- Para los períodos de inmersión de 1 y 2 horas, hubo crecimiento del micelio en todas las concentraciones y todas las cepas.
- Para el período de 12 horas hubo inhibición a los 1000 ppm.
- A las 24 horas hubo inhibición de todas las cepas a partir de los 600 ppm.
- A partir de las 36 horas no se observó crecimiento del micelio.

### **1.3 Determinación de la actividad antifúngica curativa.**

A las 72 horas de cultivo, todas las muestras estudiadas presentaron crecimiento abundante, no observándose inhibición del crecimiento fúngico (Fig. 18 y 19).

Al no observarse inhibición en el crecimiento, se procedió a realizar las siguientes pruebas:

- a) Trozos de 4 mm de diámetro de agar GY con hifas en crecimiento activo se inocularon al centro de placas de 10 cm de diámetro con 20 ml de agar GY y se mantuvieron por 24 horas a 20°C. Posteriormente se insertaron en forma equidistante 3 cilindros de vidrio en los cuales se adiciona 0,1 ml de solución de aceite esencial a concentraciones de: 50, 100 y 150 ppm; 200, 250 y 300 ppm; 350, 400 y 450 ppm.
- b) Trozos de agar con hifas de *Saprolegnia* sp. en crecimiento activo se dejaron por distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos), en concentraciones crecientes de aceite esencial (0-500 ppm) y posteriormente se lavaron en agua destilada estéril, se inocularon en placas con agar GY y se incubaron a 20°C por 72 horas. Para cada cepa y concentración las pruebas se realizan en triplicado.



**Figura. 18. Colonia en crecimiento después de aplicar aceite esencial de timol a diferentes concentraciones.**

**Figura.19 Inhibición del crecimiento a partir de los 150 ppm de aceite esencial**

Es posible observar que con el procedimiento **a** se obtuvo inhibición del crecimiento a partir de los 200 ppm y con el procedimiento **b** se observó inhibición del crecimiento en algunas de las colonias (Tabla 8) a partir de 100 ppm por 90 minutos. En concentraciones superiores no se observó crecimiento micelar.

**Tabla 8. Crecimiento de cepas estudiadas a diferentes tiempos y concentraciones de aceite esencial.**

Conc. Tiempo	Cepa 1			Cepa 2			Cepa 3			Cepa4		
	100 ppm	150 ppm	200 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	100 ppm	150 ppm	200 Ppm
30'	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
60'	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
90'	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
120'	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) = crecimiento (-) = inhibición

**Objetivo 2: Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en alimentos.**

**2.1 Evaluación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas por medio de baños.**

2.1.1 Traslado de ovas desde la piscicultura de Río Blanco al Laboratorio de cultivo de peces LABCPAC de la escuela de Ciencias del Mar de la PUCV.

Se trasladaron un total de 2000 ovas desde la Piscicultura de Río Blanco hasta las dependencias del Laboratorio de Bioensayos para realizar las pruebas de tolerancia con distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo

2.1.2. Determinación de la concentración tolerable en ovas en laboratorio de Río Blanco.

Se determinó las concentraciones de aceite que toleraban las ovas, sin ver afectada su viabilidad. Se probaron en primera instancia concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200 ppm de aceite esencial. Pasadas tres horas de exposición a las concentraciones, el 90% de las ovas se encontraban vivas.

Luego al aplicar concentraciones mayores, es decir concentraciones de 300 1000 ppm, se observó los siguientes resultados:

En la concentración de 400 ppm de aceite de tomillo, se apreció que en 1 hora de exposición el 100% de las ovas se encontraban vivas. A las 2 horas el porcentaje de ovas viables era de un 90% y a las 3 horas sólo el 10% de las ovas se encontraba viable. Resultado que indica que una concentración de aceite de tomillo de 400 ppm, aplicada por 3 horas, es tóxica para las ovas, no así, la misma concentración aplicada hasta 2 horas.

Al aplicar una concentración de aceite de tomillo de 600 ppm a las ovas en 1 hora se puede apreciar que el 100% de las ovas se encontraban vivas. En 2 horas de exposición el porcentaje de ovas viables era de 90% y a las 3 horas el 100% de las ovas se encontraba muerta, es decir no se apreciaba movimiento de aletas ni latidos del corazón.

Con una concentración de aceite esencial de tomillo de 800 ppm, en una hora de exposición el 80% de las ovas se encontraba viva, sin embargo, a las 2 y 3 horas el 100% de las ovas se encontraba muerta, es decir que las ovas pueden tolerar sólo una hora con el aceite a esta concentración.

Finalmente, a una concentración de 1000 ppm, de aceite esencial de tomillo, en una hora sólo un 40% de las ovas se encontraba viva, a las 2 y 3 horas la totalidad de las ovas habían muerto con esa concentración, lo que por supuesto hace pensar que no es posible aplicar 1000 ppm de concentración a las ovas por ser demasiado tóxica. Los resultados de las concentraciones tolerables de tomillo se presentan en Tabla 9.

**Tabla 9: Tratamiento de ovas de trucha con aceite de tomillo a distintas concentraciones.**

Concentración de aceite de tomillo (ppm).	15-30 minutos		45-60 minutos		3 horas	
	vivos	mueartos	vivos	mueartos	vivos	mueartos
10	10	0	10	0	10	0
20	10	0	10	0	10	0
30	10	0	10	0	10	0
40	10	0	10	0	10	0
50	10	0	10	0	10	0
100	10	0	10	0	9	1
150	10	0	10	0	10	0
200	8	2	10	0	9	1

Mayor latir del corazón (+)



**Tabla 10: Tratamiento de ovas de trucha con aceite de tomillo (a concentraciones de aceite mayores).**

Concentración de aceite de tomillo (ppm).	1 hora		2 horas		3 horas y más	
	vivos	mueartos	vivos	mueartos	vivos	mueartos
400	10	0	9	1	1	9
600	10	0	4	6	0	10
800	8	2	0	10	0	10
1000	4	6	0	10	0	10

Menor latir del corazón (-)

## 2.2. Evaluación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.

### 2.2.1. Traslado de peces desde la Piscicultura de Río Blanco al Laboratorio LABCPAC de la ECM.

Se trasladaron un total de 250 alevines para realizar las pruebas de tolerancia de aceite esencial de tomillo desde la Piscicultura de Río Blanco hasta el Laboratorio de Bioensayo.

### 2.2.2. Determinación de la concentración tolerable en alevines mediante baños.

Al realizar las pruebas para ver el efecto del aceite de timol en distintas concentraciones se obtuvieron los resultados que se presentan en las tablas 11 a 13.

**Tabla 11. N° de alevines vivos y muertos expuestos a distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo pasados 30 minutos**

Concentración de tomillo (ppm).	10 minutos				20 minutos				30 minutos			
	NN	NE	SM	M	NN	NE	SM	M	NN	NE	SM	M
10	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
20	10	0	0	0	7	3	0	0	0	10	0	0
30	6	4	0	0	0	10	0	0	0	9	1	0
40	0	10	0	0	0	10	0	0	0	7	3	0
50	0	10	0	0	0	10	0	0	0	3	7	0
100	0	9	1	0	0	0	0	10	0	0	0	10
150	0	2	8	0	0	0	0	10	0	0	0	10
control	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0

**Tabla 12. N° de alevines vivos y muertos expuestos a distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo pasado una hora y después trasladados a recipientes de recuperación.**

Concentración de tomillo (ppm).	1 hora					2 horas					3 horas			
	NN	NE	SM	M		NN	NE	SM	M		NN	NE	SM	M
10	10	0	0	0		10	0	0	0		10	0	0	0
20	0	9	1	0	R*	5	5	0	0		5	3	2	0
30	0	7	2	1	R*	2	0	7	1		2	2	5	1
40	0	4	4	2	R*	0	3	4	3		2	1	4	3
50	0	0	8	2	R*	0	0	0	10		0	0	0	10
100	0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10
150	0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10
Control	10	0	0	0		10	0	0	0		10	0	0	0

**Tabla 13. N° de alevines vivos y muertos en recipientes de recuperación**

Concentración de tomillo (ppm).	18 horas					24 horas					42 horas					48 horas			
	NN	NE	SM	M		NN	NE	SM	M		NN	NE	SM	M		NN	NE	SM	M
10	10	0	0	0		10	0	0	0		9	1	0	0		9	1	0	0
20	8	0	0	2		8	0	0	2		8	0	0	2		8	0	0	2
30	3	1	0	6		4	0	0	6		4	0	0	6		4	0	0	6
40	2	1	0	7		3	0	0	7		3	0	0	7		3	0	0	7
50	0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10
100	0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10
150	0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10		0	0	0	10
Control	10	0	0	0		10	0	0	0		10	0	0	0		10	0	0	0

Donde:

NN: nado normal, NE: nado errático

SM: sin movimiento "Sin movimiento", se refiere a que no nada, ni siquiera erráticamente, sin embargo, se observa movimiento a nivel de opercular.

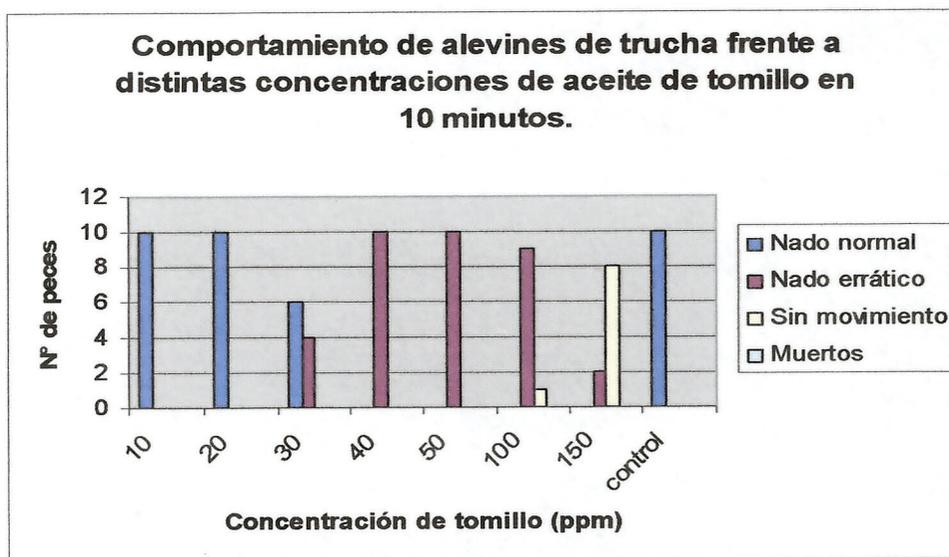
M: muerte

R\*: recuperación

Como se mencionó anteriormente, se realizaron pruebas previas para poder determinar cuál fue la concentración máxima de aceite esencial de tomillo tolerable por las truchas (alevines). En primer lugar se realizó un ensayo probando con 10, 20, 30, 40, 50, 100 y 150 ppm de aceite de tomillo en intervalos de tiempo de 10, 20, 30 minutos, 1, 2, 3, 18, 24, 42 y 48 horas. Se agregó además un tratamiento control con agua sin aceite de tomillo. Los alevines fueron dispuestos en recipientes plásticos con tres litros de agua cada uno con los distintos tratamientos y el control, además de un sistema de aireación. Se pusieron 10 alevines por cada recipiente.

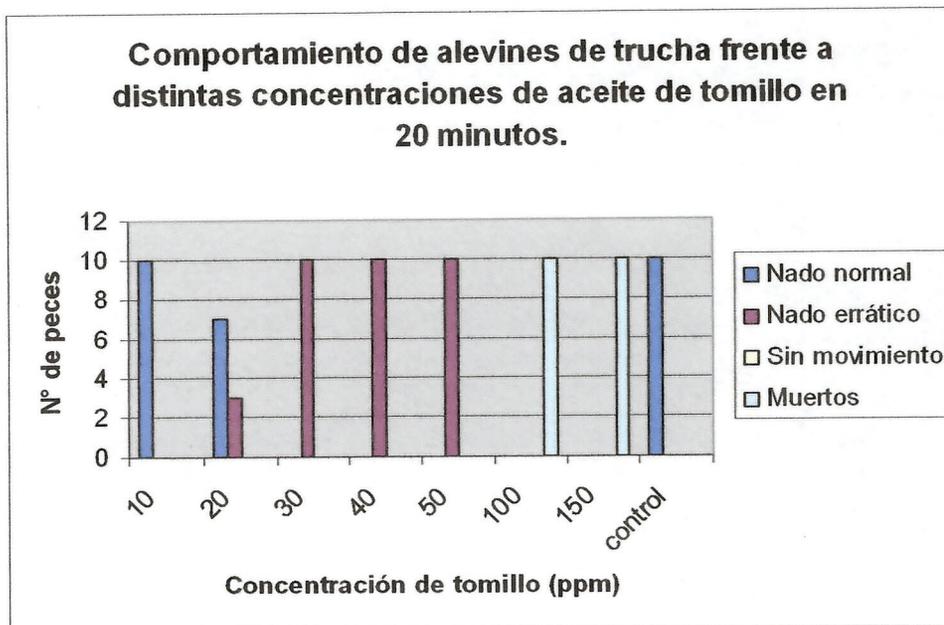
Para la evaluación se consideraron cuatro criterios dependiendo del comportamiento de nado que presentaban los alevines en los distintos tratamientos. Estos fueron; nado normal (NN), nado errático (NE), sin movimiento (SM) y muerte (M). Cabe destacar que el criterio sin movimiento (SM), se refiere a que el alevín no nada, ni siquiera erráticamente, pero hay movimiento opercular en el fondo.

A los 10 minutos de expuestos, los alevines en 10 y 20 ppm, presentaban nado normal en su totalidad, a una concentración de 30 ppm, el 60% presentaba nado normal y un 40% nado errático. Para las concentraciones 40, 50, 100 y 150, ningún alevín presentaba nado normal. En 40 y 50 ppm el 100% presentaba NE, en 100 ppm el 90% presentaba NE y 10% SM, con 150 ppm el 20% estaba con NE y el 80% se presentaba SM.



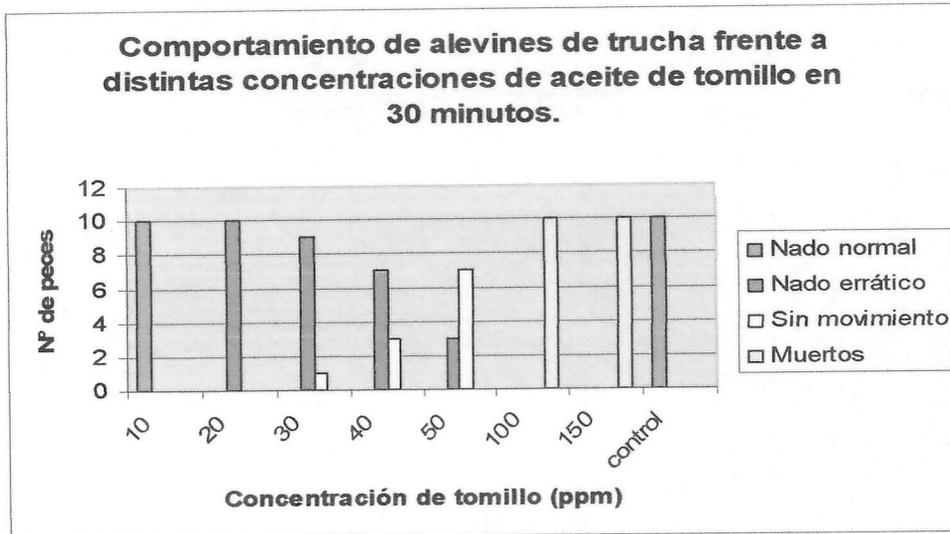
**Figura. 20. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 10 minutos.**

Luego a los 20 minutos de exposición, con 10 ppm el 100% de los alevines presentaba NN, con 20 ppm el 70% presentaba NN y el 30% NE, en los tratamientos con 30, 40 y 50 ppm el 100% de los alevines estaba con NE. Por otra parte, con 100 y 150 ppm el 100% de los alevines había muerto.



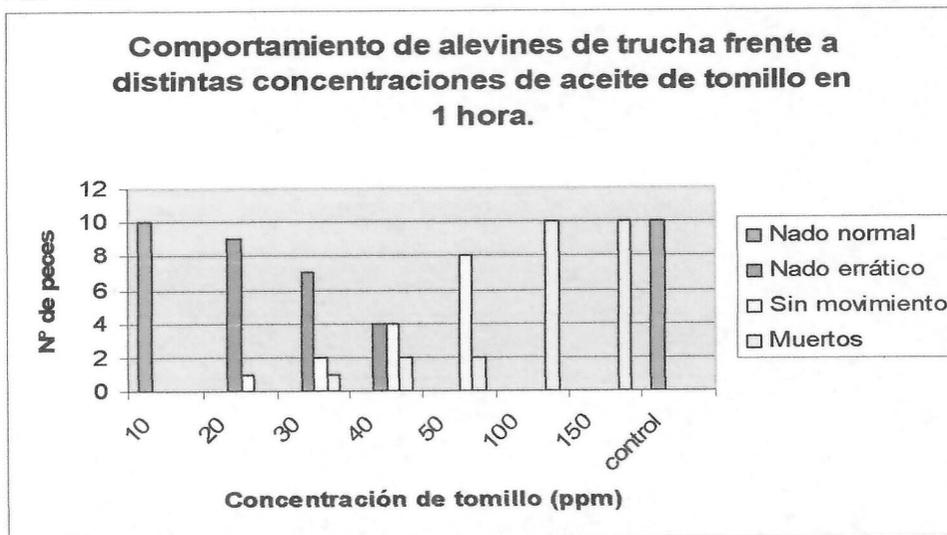
**Figura. 21. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 20 minutos.**

A los 30 minutos de exposición, el 100% de los alevines que estaban en 10 ppm se encontraban con nado normal. Con 20 ppm el 100% de los alevines presentaba NE, con una concentración de 30 ppm el 90% presentaba NE y el 10% estaba SM, con una concentración de 40 ppm el 70% presentaba NE y un 30% estaba SM, en 50 ppm el 30% estaba con NE y el 70% estaba SM. De aquí en adelante los tratamientos con 100 y 150 ppm se descartan por la muerte de los alevines ya a los 20 minutos.



**Figura. 22. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 30 minutos.**

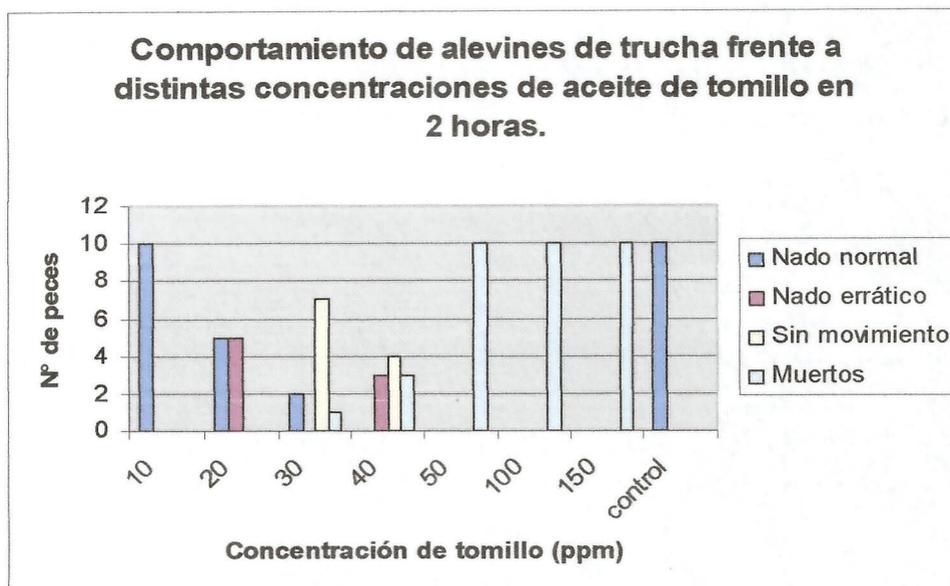
En una hora de exposición, los alevines expuestos a 10 ppm aún estaban con NN. Con 20 ppm el 90% de ellos estaba con NE y el 10% estaba SM, con una concentración de 30 ppm el 70% de los alevines presentaba NE, el 20% estaba SM y un 10% estaba muerto. A 40 ppm el 40% de los alevines estaba con NE, 40% SM y un 20% M. Con 50 ppm de concentración el 80% de los alevines estaba SM y un 20% M.



**Figura. 23. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 1 hora.**

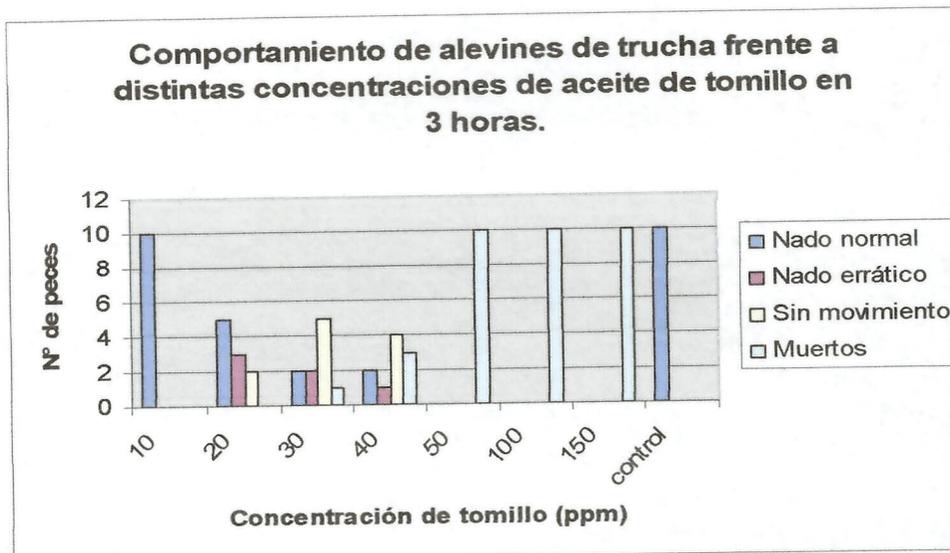
Transcurrida 1 hora de exposición de los alevines frente a las distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo, se procedió a retirarlos de los recipientes y cambiarlos a otros con agua fresca y sin concentración de tomillo, para de esta forma recuperar los alevines que presentaban NE o que estaban SM y así evitar su muerte luego de una hora. Por otra parte, los alevines que estaban a una concentración de 10 ppm, como aparentemente no se vieron afectados con esa concentración y presentaban nado normal, se mantuvieron en sus recipientes para ver cuanto tiempo podrían resistir en esa concentración.

De esta forma, transcurridas 2 horas, los alevines que estaban en 10 ppm (aún en el aceite), todavía se encontraban con nado normal, los peces con 20 ppm (en recuperación con agua fresca), presentaban 50% NN, 50% NE, con 30 ppm (en recuperación), presentaban 20% NN, 70% SM y 10% M. Con una concentración de 40 ppm el 30% presentaba NE, el 40% se presentaba SM y un 30% estaba M. Por otra parte, con 50 ppm a las 2 horas el 100% de los peces había muerto, razón por la cual este tratamiento no fue considerado en las pruebas siguientes.



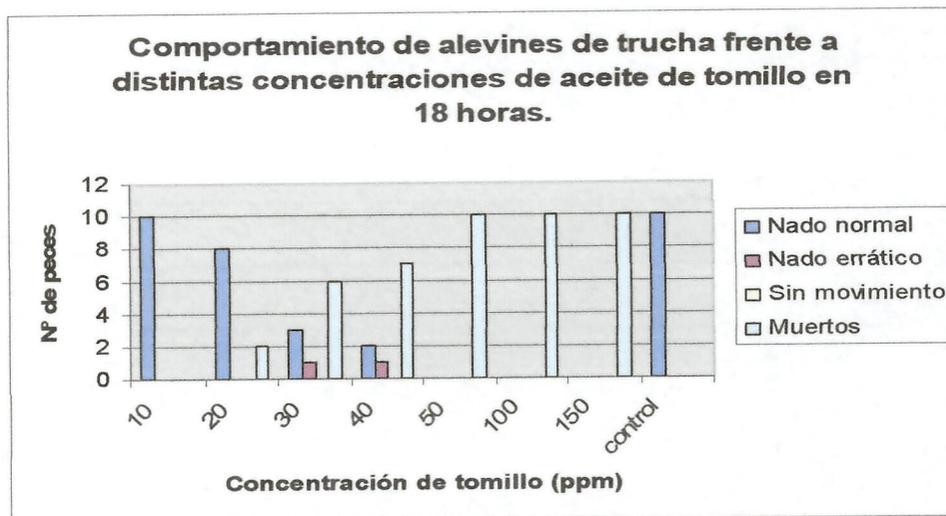
**Figura. 24. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 2 horas.**

A las 3 horas de exposición, los alevines que estaban en 10 ppm, aún presentaban nado normal, en 20 ppm el 50% presentaba NN, el 30% presentaba NE y un 20% estaba SM. En 30 ppm un 20% de los peces presentaba NN, otro 20% presentaba NE, un 50% estaba SM y un 10% estaba M. Con una concentración de 40 ppm un 20% de los peces presentaba NN, un 10% estaba con NE, 40% estaba SM y un 30% estaba M.



**Figura. 25. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 3 horas.**

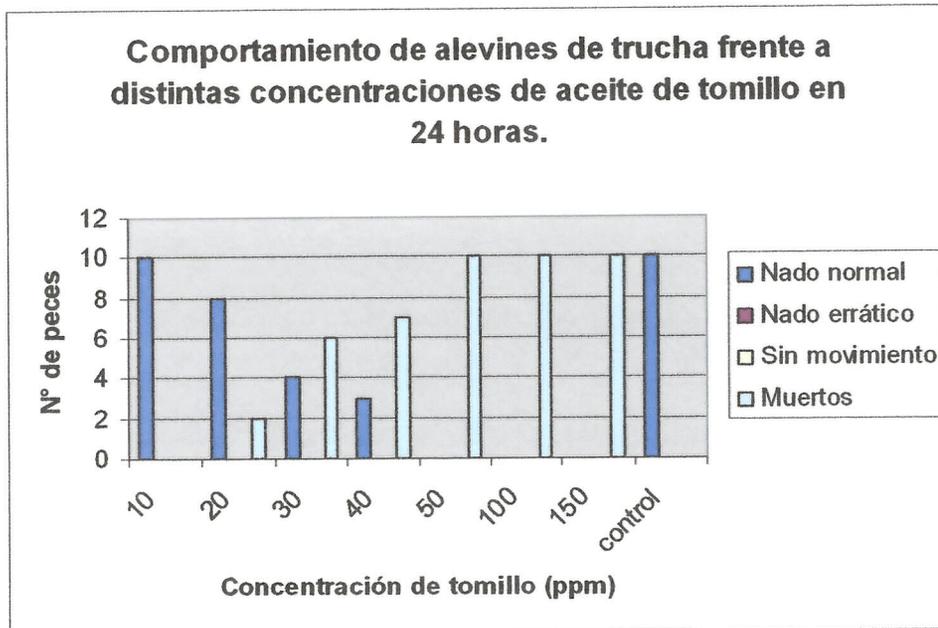
Luego a las 18 horas, los alevines del tratamiento con 10 ppm seguían en su totalidad con NN, con 20 ppm (en recuperación con agua fresca), presentaban un 80% NN y 20% estaban M. En 30 ppm un 30% presentaba NN, 10% presentaba NE y 60% estaba M. Con 40 ppm un 20% de los peces presentaba NN, el 10% estaba con NE y un 70% estaba M.



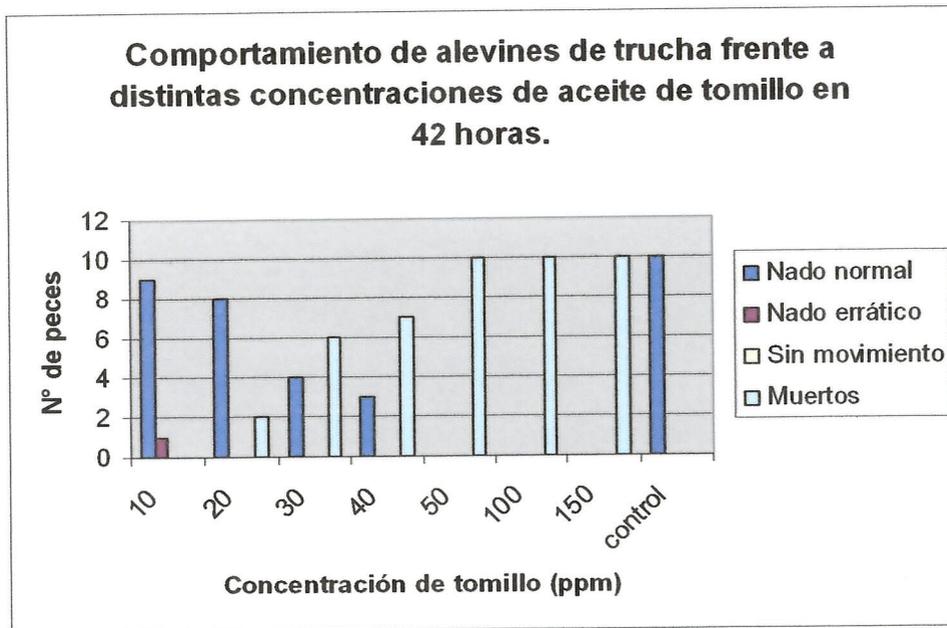
**Figura. 26. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 18 horas.**

A las 24 horas, los peces del tratamiento con 10 ppm aún se mantenían con NN, con 20 ppm el 80% de ellos presentaba NN, mientras que un 20% se encontraba M. Con 30 ppm el 40% se encontraba con NN, mientras que el 60%

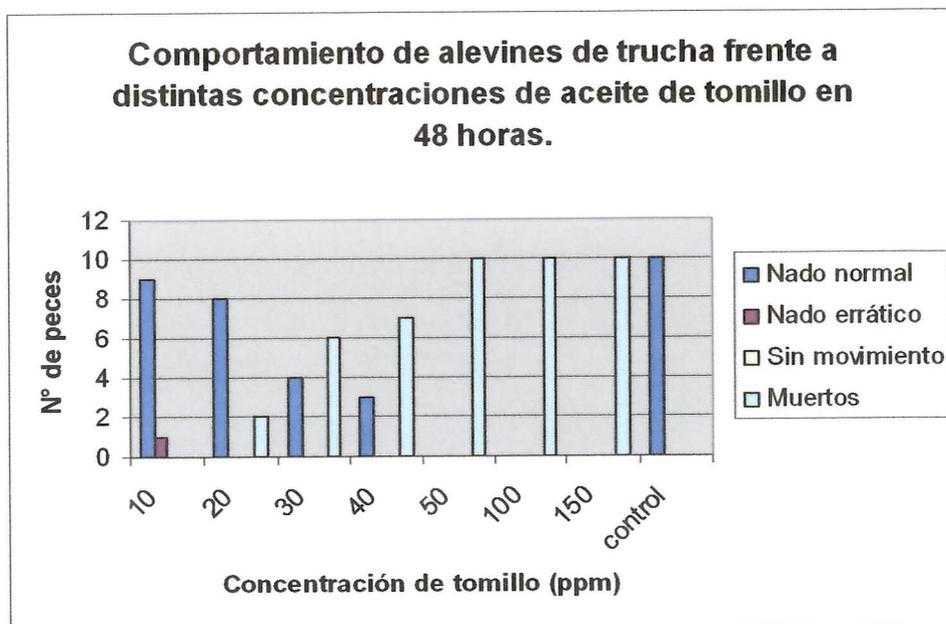
estaba M. En una concentración de 40 ppm el 30% de los peces estaba con NN, mientras que un 70% de ellos estaba M. Estos últimos resultados con 20, 30 y 40 ppm se mantuvieron hasta las 48 horas, excepto el tratamiento con 10 ppm, ya que, a esta concentración se mantuvieron el 100% de los peces con NN hasta 24 horas, luego a las 42 y 48 horas un 90% de los peces presentaba NN y un 10% presentaba NE.



**Figura. 27. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 24 horas.**



**Figura. 28.** Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 42 horas.



**Figura. 29.** Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 48 horas.

Al analizar los resultados se podría concluir que es posible aplicar aceite esencial de tomillo en baños sobre alevines de trucha arcoiris para un posible control de la saprolegniosis, sin embargo, esto va a depender de la concentración utilizada y del tiempo de exposición de los peces frente al aceite.

En primer lugar se podría decir que es posible utilizar aceite esencial de tomillo a una concentración de 10 ppm hasta las 24 horas, obteniendo un 100% de viabilidad, es decir, que el aceite no causa toxicidad, incluso podría utilizarse esta concentración hasta 48 horas, aunque según lo observado con esta concentración obtendríamos un 90% de viabilidad.

Por otra parte, utilizando concentraciones mayores, es decir, 20, 30 y 40 ppm, hasta 1 hora no se causaría toxicidad total, ya que es posible recuperar una parte de los alevines si luego de una hora de exposición son traspasados a agua fresca sin concentración de aceite de tomillo. Utilizando una concentración de 50 ppm luego de una hora y aunque los peces fueron traspasados a agua fresca para su recuperación, finalmente esa concentración resultó ser tóxica para los alevines, ya que nunca lograron recuperarse.

Los mejores resultados se lograron utilizando concentraciones de 20, 30 y hasta 40 ppm de aceite esencial de tomillo, en orden creciente de toxicidad. Esto a pesar de que transcurrida 1 hora de exposición con las concentraciones antes mencionadas, no se observaron peces con nado normal, sin embargo, si después de esa hora se les cambiaba a agua fresca, una buena parte de ellos lograba recuperarse.

Es así que luego de 24 e incluso 48 horas, utilizando una concentración de 20 ppm hasta una hora y luego de la recuperación, es posible obtener hasta un 80% de los peces vivos. Por otra parte, utilizando una concentración de 30 ppm al cabo de 24 e incluso 48 horas, es posible obtener hasta un 40% de viabilidad en los alevines. Por último utilizando una concentración de 40 ppm el porcentaje de viables baja al 30%, luego de la recuperación y transcurridas 24 y 48 horas.

Con todo esto se puede decir que la utilización de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha es factible, siempre y cuando se utilicen las concentraciones adecuadas hasta una hora de exposición, luego de la cual debería haber un tratamiento de recuperación el cual evite la muerte de los peces por toxicidad del aceite.

Luego de realizadas las pruebas preliminares, se llevó a cabo un experimento en el cual se utilizaron los mismos tiempos antes mencionados, es decir, 10, 20, 30, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 18 horas, 24 horas, 42 horas y 48 horas. Las concentraciones de aceite esencial de tomillo utilizadas fueron 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, además de un comportamiento control. Cabe destacar que fueron utilizadas estas concentraciones debido a que en las pruebas anteriores, se determinó que las concentraciones 100 y 150 ppm para el caso de baños en

alevines no eran factibles por el grado de toxicidad que generaban en los peces, ya que, a estas concentraciones la totalidad de los alevines morían antes de los 20 minutos de exposición. Esto contrasta con los resultados obtenidos en ovas, donde se pudo observar que éstas toleraban hasta una concentración de 800 ppm de concentración, en una hora de exposición.

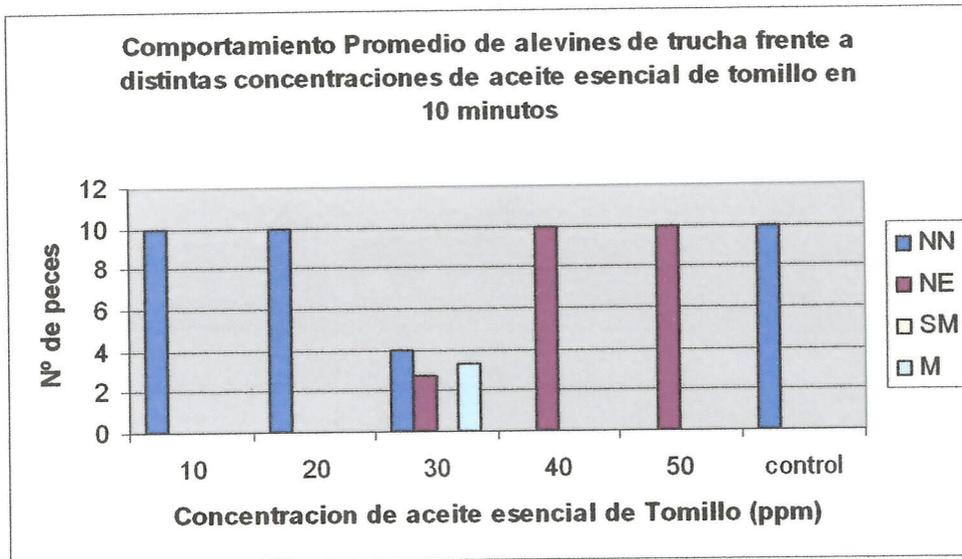
Estas pruebas fueron realizadas por triplicado, siendo los resultados un promedio del triplicado de estas pruebas. Además se consideraron los mismos cuatro criterios dependiendo del nado que presentaban los alevines es decir; nado normal (NN), nado errático (NE), sin movimiento (SM) y muerte (M).

A los 10 minutos de exposición en aceite esencial de tomillo, el 100% de los peces expuestos a 10 y 20 ppm se encontraba con NN, transcurrido ese tiempo. Con una concentración de 30 ppm el 60% de los peces se encontraba con NN y un 40% se hallaba con NE. Expuestos a una concentración de 40 y 50 ppm el 100% de los alevines se encontraba con NE a los 10 minutos.

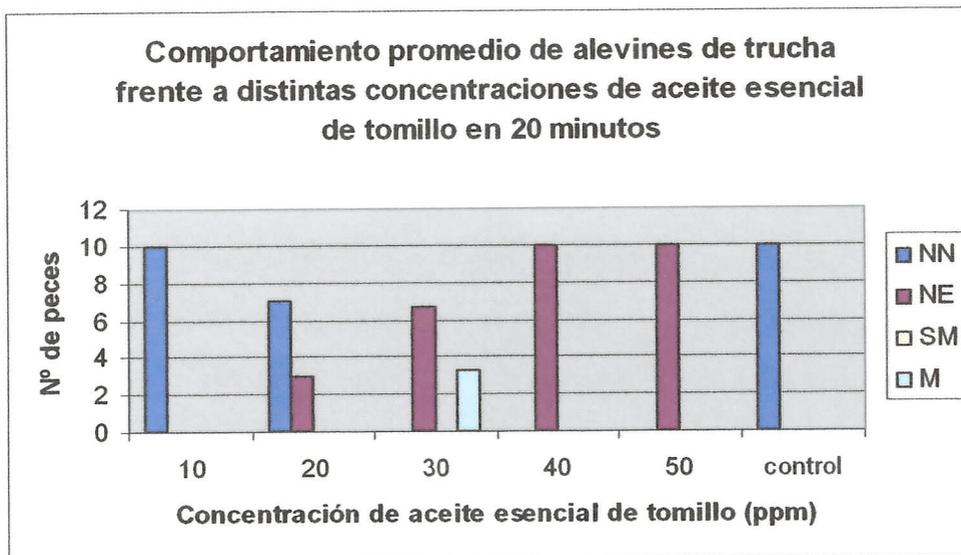
Posteriormente transcurridos 20 minutos de exposición y a una concentración de 10 ppm el 100% de los alevines se encontraba con NN. Con una concentración de 20 ppm el 70% de los alevines se encontraba con NN, mientras que un 30% estaba con NE. Por otra parte, con 30 ppm el 70% de los alevines estaba con NE, mientras que un 30% de ellos ya había muerto. Con las concentraciones 40 y 50 ppm el 100% de los peces se encontraba con NE a los 20 minutos.

Transcurridos 30 minutos de exposición, el 100% de los peces expuestos a 10 ppm se mantenían con NN, con 20 ppm el 70% de ellos presentaban NN y un 30% tenía NE. Con una concentración de 30 ppm el 50% de los peces estaba con NE y el otro 50% se presentaba SM. Con 40 ppm de concentración el 60% de los peces estaba con NE, mientras que el 40% se presentaba SM. En una concentración de 50 ppm el 20% de los peces se encontraba con NE, mientras que un 80% de ellos se encontraba SM.

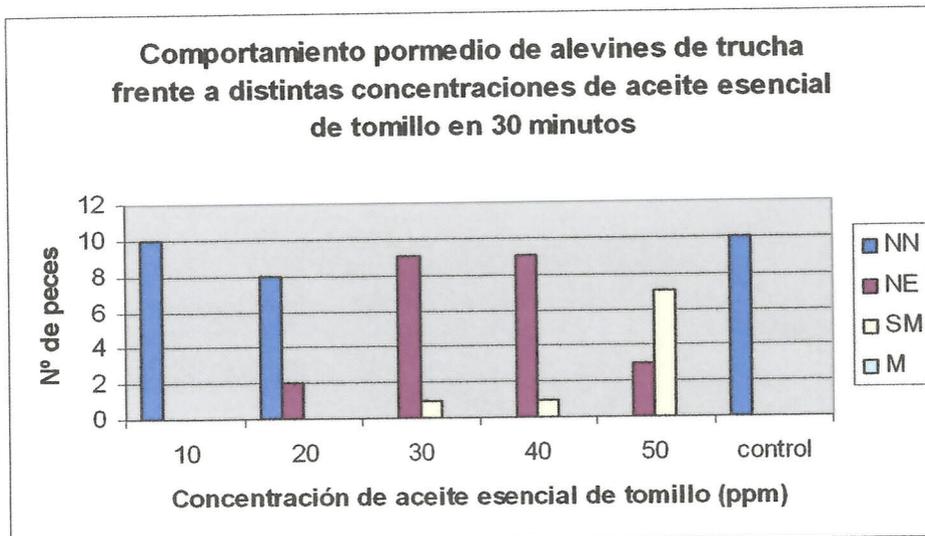
Luego de una hora de exposición en aceite esencial de tomillo, los peces expuestos a 10 ppm se mantenían con NN. Los alevines expuestos a 20 ppm mostraron que un 20% se encontraba con NN, un 70% presentaba NE y un 10% estaba SM. Expuestos a 30 ppm, el 70% de los peces estaba SM, mientras que un 30% de ellos ya había muerto. Con 40 ppm de concentración el 100% de los peces estaba SM, mientras que con 50 ppm de concentración el 50% de los peces estaba SM y el otro 50% de ellos estaba M, luego de una hora.



**Figura. 30. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 10 minutos.**

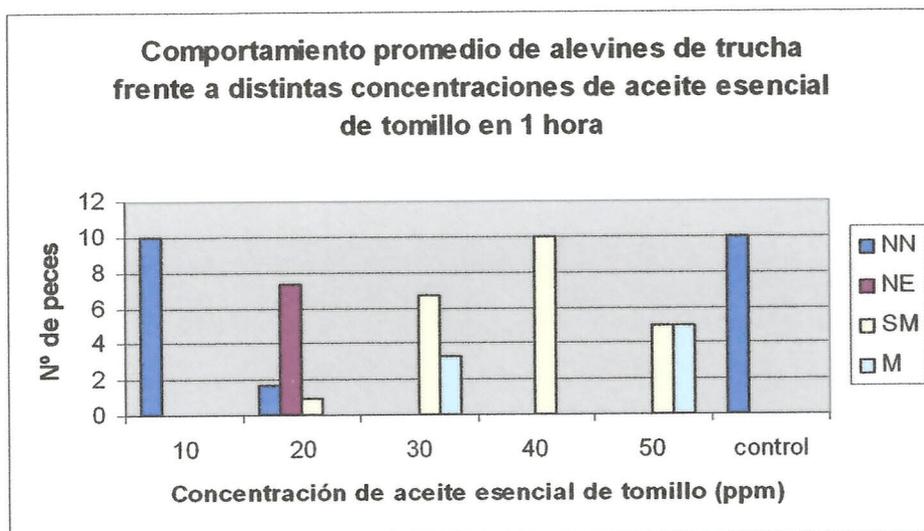


**Figura. 31 Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 20 minutos.**



**Figura. 32. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 30 minutos.**

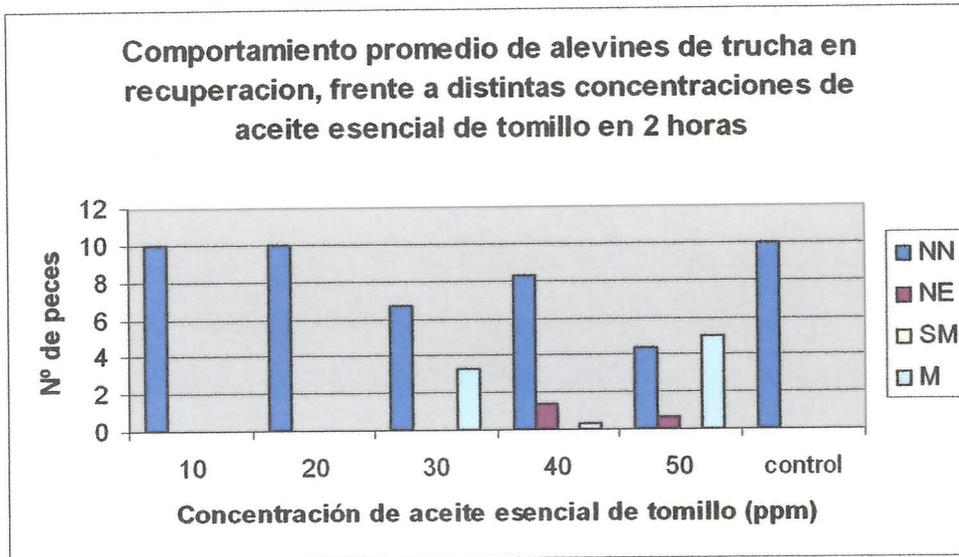
Transcurridos 30 minutos de exposición, el 100% de los peces expuestos a 10 ppm se mantenían con NN, con 20 ppm el 80% de ellos presentaban NN y un 20% tenía NE. Con una concentración de 30 ppm el 90% de los peces estaba con NE y el otro 10% se presentaba SM. Con 40 ppm de concentración se mantiene las mismas condiciones anteriores, es decir, un 90% de los peces estaba con NE, mientras que el 10% se presentaba SM. En una concentración de 50 ppm el 30% de los peces se encontraba con NE, mientras que el 70% restante se encontraba SM, finalmente la concentración con un 0% de aceite de tomillo, es decir la control, mantuvo todos los peces con NN.



**Figura. 33. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 1 hora.**

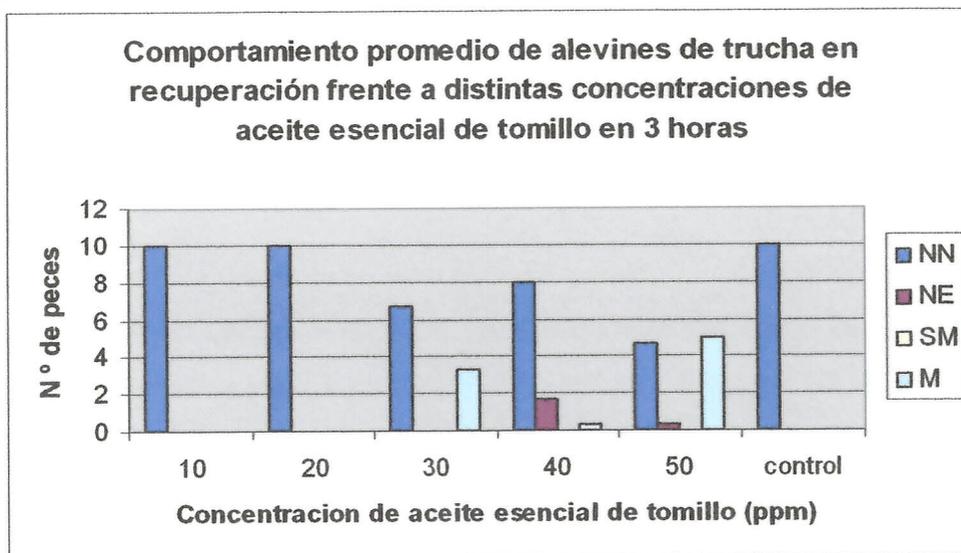
A la hora de exposición en aceite esencial de tomillo, los alevines de trucha expuestos a 10 ppm mantenían un 100% con NN. Los alevines expuestos a 20 ppm mostraron que un 20% se encontraba con NN, un 70% presentaba NE y un 10% estaba SM, los expuestos a 30 ppm, el 70% de los peces estaba SM, mientras que un 30% de ellos ya había muerto. Con 40 ppm de concentración el 100% de los peces estaba SM, mientras que con 50 ppm de concentración el 50% de los peces estaba SM y el otro 50% de ellos estaba Muerto, los controles se mantuvieron con un nado normal NN.

Cabe destacar que pasada la primera hora de exposición de los peces frente a las distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo (y como se realizó en el ensayo previo), se procedió a retirar los peces de los distintos recipientes cambiándolos a otros con agua fresca y sin concentración de tomillo, para así lograr la recuperación principalmente de los alevines que se encontraban con NE o SM, para de esta forma evitar su muerte luego del tiempo de exposición. Además como los alevines que estaban expuestos a 10 ppm de concentración aparentemente presentaron un nado normal, se les mantuvo en sus recipientes para de esta forma evaluar su capacidad de resistencia a dicha concentración.



**Figura. 34. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 2 horas.**

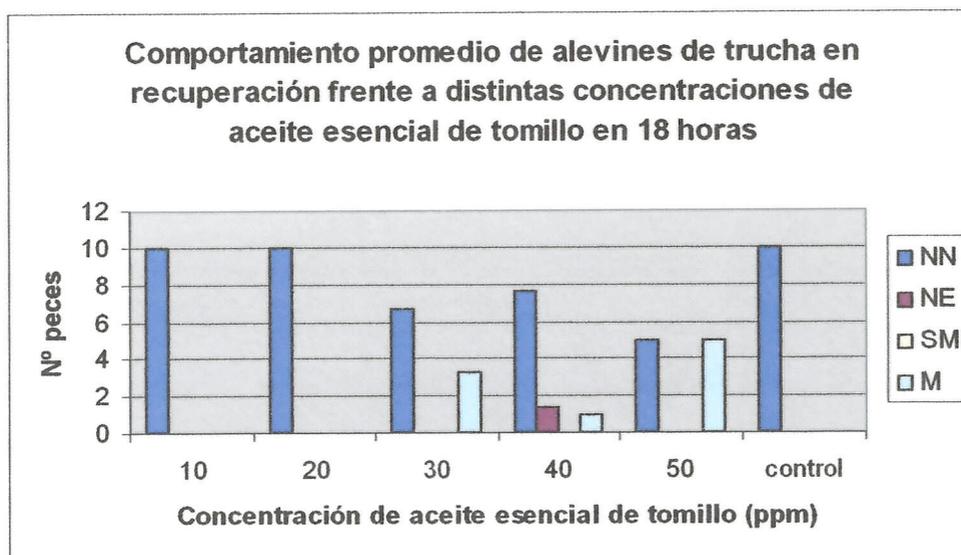
Luego de 2 horas, el 100% de los peces enfrentados a una concentración de 10 ppm se mantenía con NN (aún en el aceite), por otra parte, los alevines con 20 ppm (en recuperación), volvieron a nadar normal en un 100%. A su vez, en 30 ppm (en recuperación), un 70% de los peces, pasaron de estar SM a un NN, mientras que un 30% ya había muerto. Con 40 ppm (en recuperación), el 90% volvió a NN y un 10% se encontraba con NE, lo que también se puede considerar como una recuperación. En el tratamiento con 50 ppm (en recuperación), el 40% de los alevines presentaba NN, un 10% presentaba NE y un 50% de ellos ya había muerto.



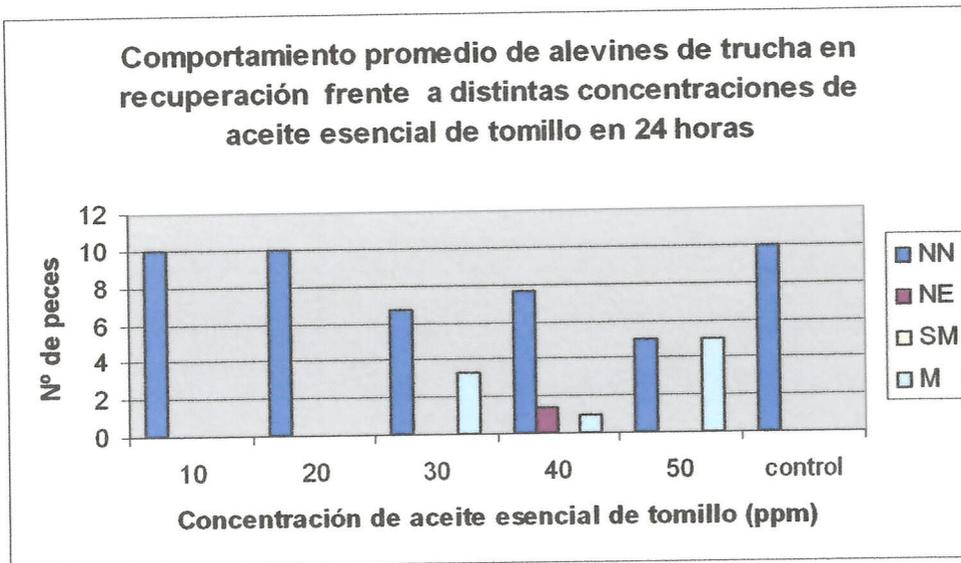
**Figura. 35. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 3 horas.**

A las 3 horas, nuevamente el 100% de los peces que se mantenían en el tratamiento con 10 ppm presentaban NN, igual resultado se registró con 20 ppm en donde el 100% de los peces presentaba NN. Con 30 ppm el 70% de los peces se encontraba con NN, mientras que el 30% restante se encontraba muerto. En 40 ppm, el 80% de los peces se encontraba con NN y el 20% restante se encontraba con NE. Luego en el tratamiento con 50 ppm el 50% de los peces se encontraba con NN, mientras que el 50% restante se hallaba M.

En los siguientes intervalos de tiempo, es decir, 18, 24, 42, 48 horas Fig. 24 a la 27, los resultados observados fueron básicamente los mismos. Estos fueron; en el tratamiento con 10 y 20 ppm se mantuvieron el 100% de los peces con NN. Con 30 ppm el 70% de los alevines se mantenía con NN, mientras que el 30% se hallaba M. Por otra parte, con 40 ppm el 80% de los peces se mantenía con NN, un 10% se encontraba con NE y el otro 10% se hallaba M. Por último, con 50 ppm el 50% de los peces se encontraba con NN, mientras que el 50% restante se hallaba M. Cabe destacar que la totalidad de los peces en el tratamiento control, se mantuvieron en todos los intervalos de tiempo con nado normal.

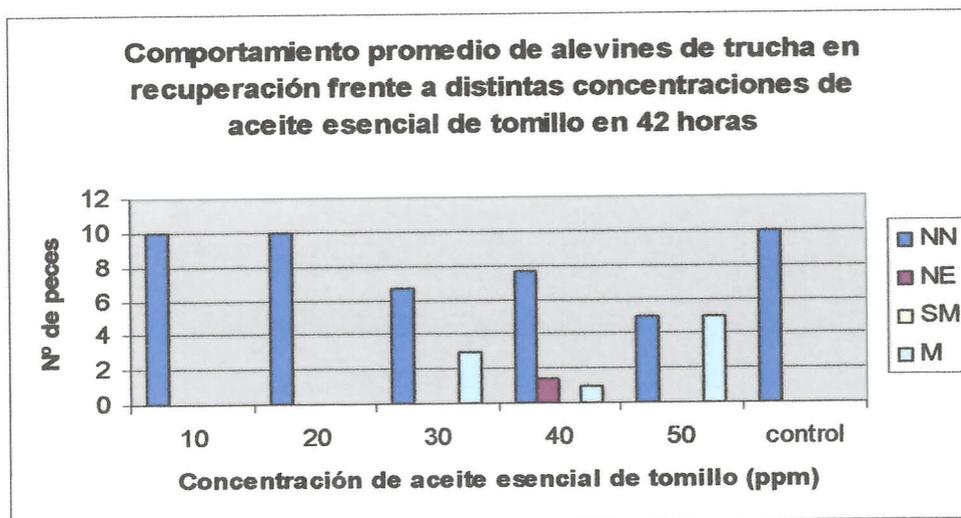


**Figura. 36. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 18 horas.**



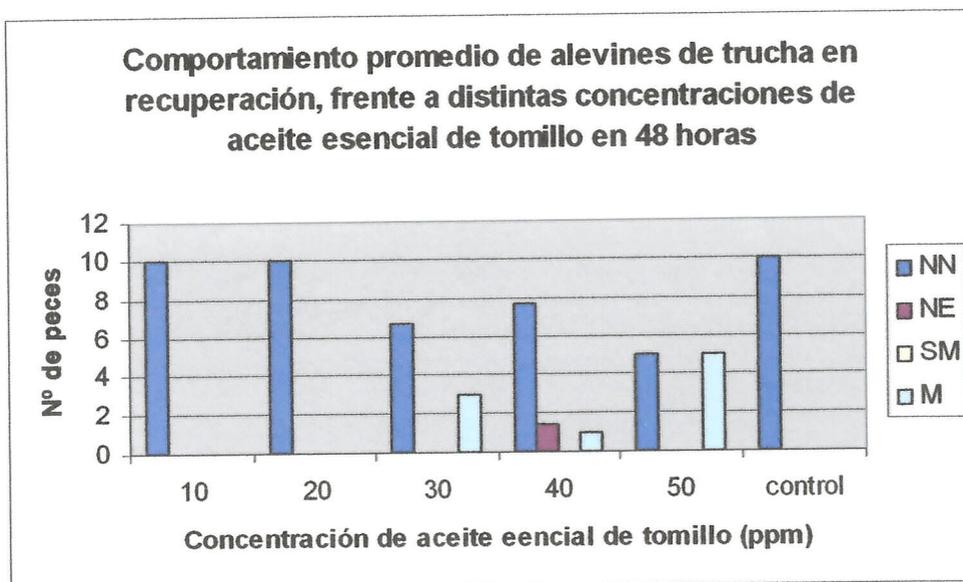
**Figura. 37. Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 24 horas.**

No se producen cambios después de pasadas 6 horas de la medición anterior.



**Figura. 38 Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 42 horas.**

No se producen cambio después de pasadas 18 horas de la toma de datos anterior.



**Fig. 39 Efecto de la exposición de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo en alevines de trucha por un periodo de 48 horas.**

Finalmente luego de 48 horas en experimentación se observa que los comportamientos se mantienen constantes con respecto a las mediciones anteriores es decir, las concentraciones de 10 ppm, 20 ppm y la control mantiene un 100% de NN, las concentraciones de 30 ppm presentan un 70% con NN y en el 30% restante se observó mortalidad, con 40 ppm se obtuvo un 80% de NN y un 20% de NE y con 50 ppm los porcentajes de NN bajan a un 40% los alevines con nado errático corresponden a un 10% mientras que los muertos se incrementan a un 50%.

#### 2.2.2.1 Determinación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo diluido en Dimetilsulfoxido (DMS) en alevines de truchas. Resultado de actividades incorporadas.

Se realizaron pruebas de aceite esencial de tomillo mas dimetilsulfoxido a concentraciones entre 10 ppm y 200 ppm obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 14: Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 40 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 30''	Alevines con boqueo y mucha actividad
3' 00''	4 individuos con nado errático, todos con poca actividad
4' 35''	Solo 3 alevines presentan reacción a los estímulos
6' 00''	Muy baja reacción, solamente 1 responde
9' 00''	Mortalidad

**Tabla 15: Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 30 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 30''	Aumento de la actividad
1' 30''	Actividad normal recuperada
2' 30''	1 Alevín comienza a presentar nado errático
4' 30''	Comienza a presentar poca reacción
5' 30''	Poca reacción por parte de todos los alevines
6' 30''	3 responden a estímulos, el resto nada.
8' 30''	Actividad baja, solo quedan 2 individuos poco activos
13' 00''	Mortalidad total

**Tabla 16. Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 20 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 45''	Actividad alta de los alevines
1' 30''	Se normaliza la actividad de los alevines
3' 00''	Tratan de nadar pegados a superficie
5' 00''	Comienzan a bajar la actividad notoriamente
8' 00''	Comienza a haber mortalidad
10' 00''	Solo 4 individuos reaccionan a estímulos
12' 00''	Todos los individuos se pegan al fondo
13' 40''	Mortalidad Total

**Tabla 17. Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 10 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 30"	Actividad normal, no presentan boqueo
1' 30"	Aumento de la actividad
2' 30"	Nado vuelve a ser normal al igual que la mortalidad
4' 30"	Presentan actividad normal, no hay cambios
7' 00"	no presentan diferencias de comportamiento
10' 30"	Comienza a disminuir la actividad de los alevines
14' 31"	Comienza a presentarse el nado errático de los peces
17' 00"	Presentan poca reacción. Solo 3 a 4 activos
18' 30"	Poca actividad. No reaccionan mucho a los estímulos
21' 00"	Solo queda 1 que presenta una reacción muy errática
22' 30"	Todos los peces se fueron a fondo
24' 30"	Comienza la mortalidad de los individuos
27' 00"	Mortalidad total

**Tabla 18. Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 50 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
1' 00"	3 alevines no presentan reacción
2' 20"	La reacción de los individuos baja notablemente (1 activo)
3' 20"	Alevines con baja reacción (sin movimiento) 1 con nado errático
4' 00"	Presentan reacción al mover el recipiente
6' 00"	Sin reacción (vivos)
7' 30"	Mortalidad

**Tabla 19. Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 100 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 15"	Nado errático de alevines
1' 30"	1 individuo esta flotando
3' 30"	Presentan reacción al tocar el frasco
5' 30"	No presentan reacción ante estímulos
7' 00"	Mortalidad

**Tabla 20. Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 150 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 30"	1 alevín sin reacción
2' 00"	3 individuo reaccionan, el resto no.
2' 30"	1 individuo responde al estímulo
4' 30"	Sin reacción ante los estímulos (vivos)
5' 20"	Sin reacción 3 individuos muertos.
6' 30"	Mortalidad

**Tabla 21. Comportamiento de alevines en el tiempo, expuestos a 200 ppm de aceite esencial diluido en DMS.**

Tiempo exposición (minutos)	Comportamiento de alevines
0' 40"	2 alevines con nado errático, el resto no reacciona
2' 30"	No presentan reacción
3' 40"	No presentan reacción, pero están vivos
4' 00"	Siguen sin movimiento
5' 40"	Mortalidad absoluta

### 2.2.3 Determinar la concentración tolerable por medio del alimento:

#### 2.2.3.1 Formulación de alimentos

2.2.3.2 Resultados de los Bioensayos de tolerancia de alimento con aceite esencial de tomillo dentro de la mezcla en trucha arcoiris: En todas las concentraciones de tomillo evaluadas se reflejó un positivo crecimiento, %GP, TEC y K. (Figuras 40 a 43). En cuanto al parámetro de crecimiento en peso, en la Etapa 1 se encontró que existían diferencias significativas entre los grupos 2 y 4 ppm siendo más relevante el crecimiento en el grupo de 2 ppm (Tabla 22). En la segunda etapa no se encontraron diferencias entre los grupos.

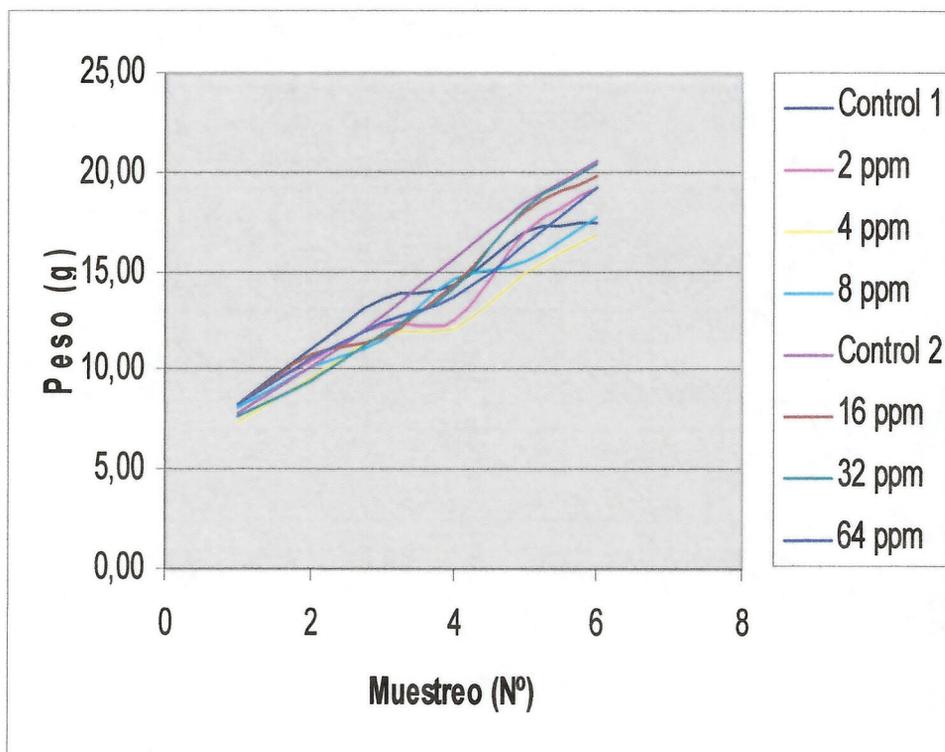
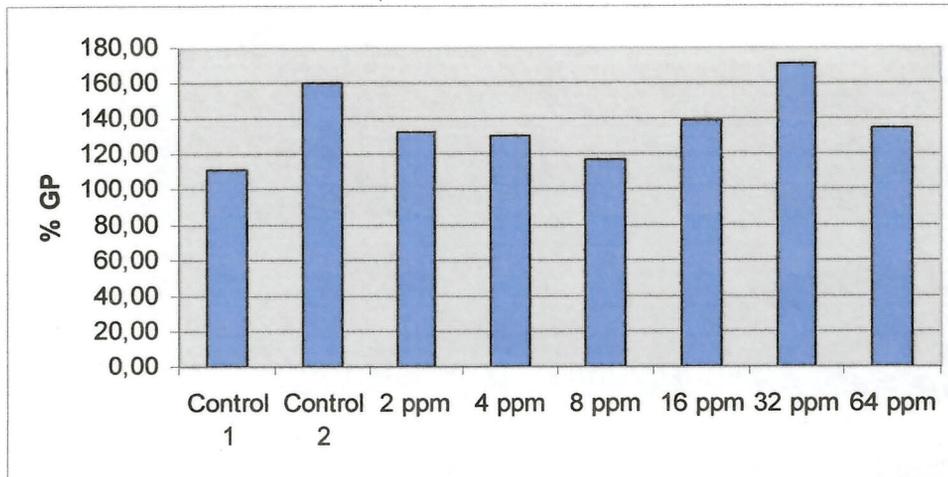


Figura 40. Crecimiento en peso de peces alimentados con dietas con distinta inclusión de timol.<sup>1</sup>

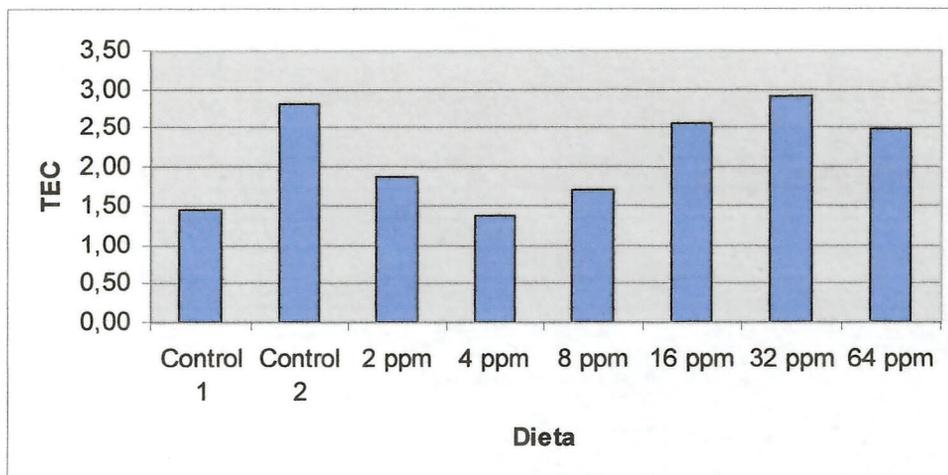
Tabla 22. Crecimiento (g) de truchas alimentadas con distintas concentraciones de timol en el alimento.

Tratamiento	M0	M1	M2	M3	M4	M5	Delta Peso
Control 1	8,24	11,03	13,66	14,34	17,05	17,40	9,16
2 ppm	8,27	10,47	12,20	12,51	17,07	19,18	10,91
4 ppm	7,33	9,59	11,82	12,17	14,92	16,83	9,5
8 ppm	8,20	10,15	11,53	14,62	15,54	17,81	9,61
Control 2	7,90	10,23	12,71	15,75	18,49	20,58	12,68
16 ppm	8,29	10,87	11,63	14,35	18,00	19,82	11,53
32 ppm	7,62	9,54	11,85	14,17	18,14	20,47	12,85
64 ppm	8,23	10,58	12,47	13,78	16,37	19,25	11,02

1. Si bien en la Etapa 1 todos los grupos que recibieron aceite de timol reflejaron un %GP superior al grupo control, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. A su vez, en la Etapa 2, el grupo que recibió la dieta con 32 ppm mostró el mayor %GP y TEC (Figuras 41 y 42), sin embargo el análisis estadístico de los resultados no arrojó diferencias significativas entre los grupos Control 2 y 16, 35 y 64 ppm.

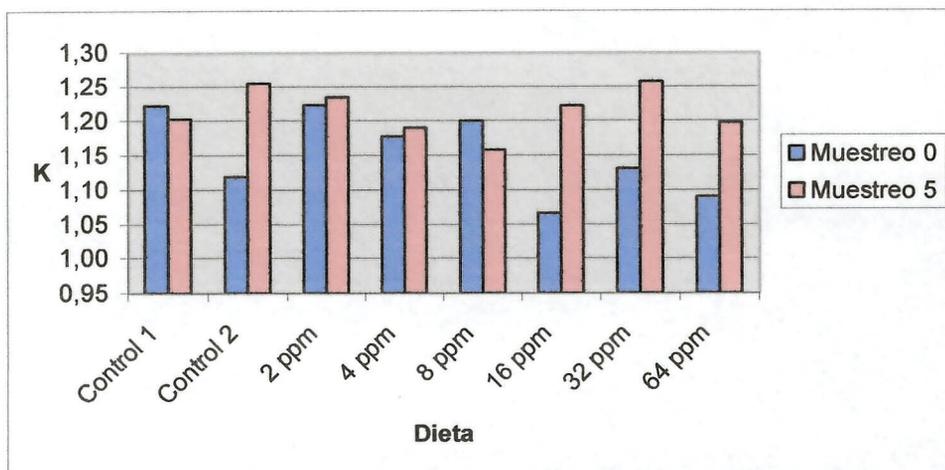


**Figura 41. Porcentaje de Ganancia en peso de peces alimentados con dietas con distinta inclusión de timol.**



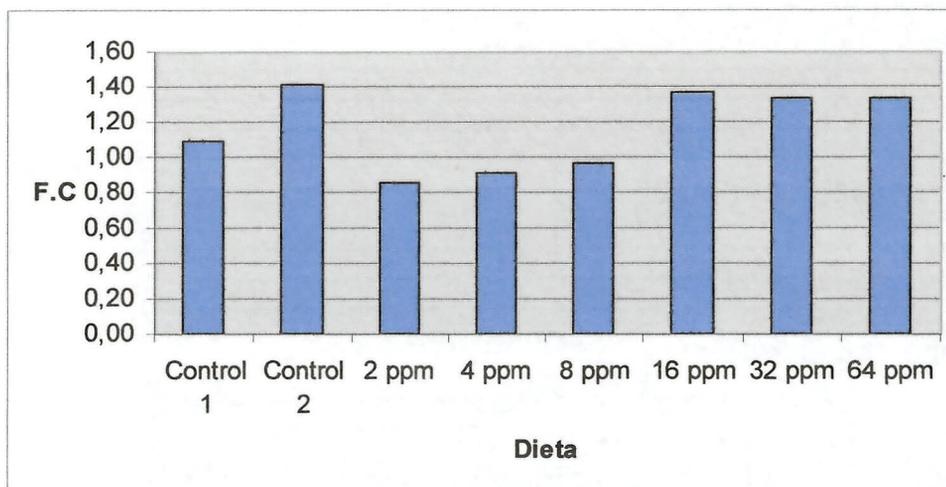
**Figura 42. Tasa específica de crecimiento de peces alimentados con dietas con distinta inclusión de timol.**

Los resultados obtenidos en cuanto al grado de condición de los peces, indican que todos presentaron un buen estado de condición independiente del tipo de dieta. En la etapa 1 los factores K iniciales y finales de los peces fueron similares en todos los grupos. En cuanto a la Etapa 2, si bien la mayor diferencia se obtuvo en los peces alimentados con 16 ppm, (Figura 43) esta no resultó estadísticamente diferente con los otros grupos y el grupo control.



**Figura 43. Factor de Condición de Peces sometidos a distintos tipos de alimento.**

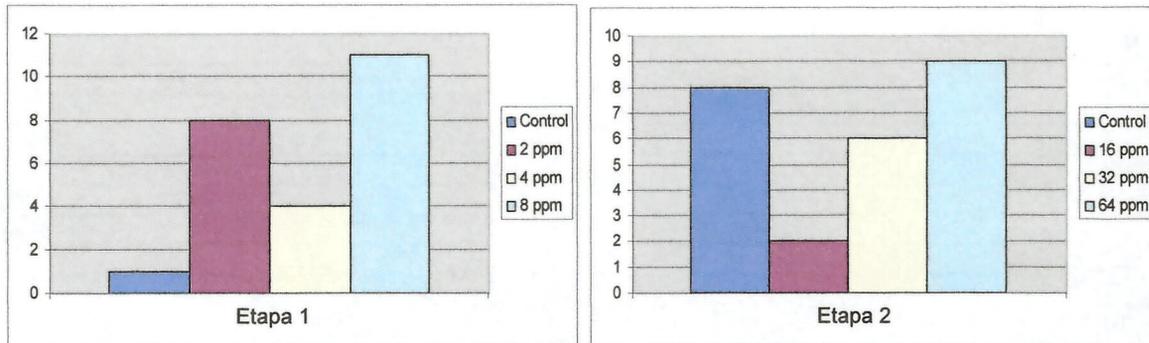
El Factor de Conversión (FC) obtenido en cada una de las dietas de la Etapa 1 fue aumentando levemente a medida que aumentó la concentración de tomillo (Figura 44) lo cual indica la efectividad del alimento para convertirse en carne fue disminuyendo, esto sería posible explicarlo, por una menor ingesta de alimento por parte de los peces. El mejor FC fue obtenido en los peces alimentados con 2 ppm. En términos del efecto de la concentración de timol, el FC resultó mejor a bajas concentraciones, contrariamente a lo que sucede a concentraciones más altas (Figura 44).



**Figura 44. Factor de Conversión de alimentados con dietas con distinta inclusión de timol, del período.**

Finalmente con respecto a la mortalidad registrada en la experiencia, se debe destacar que en la Etapa 1, no se observa una tendencia respecto de la concentración de timol en la dieta, aspecto que no ocurre en la segunda etapa puesto que la mortalidad es mayor a medida que aumenta la concentración de

timol. La alta mortalidad mostrada por la dieta control, en esta etapa se debe principalmente a mortalidad post-muestreo, asociada al stress en los peces producido por el manejo. No se puede descartar algún efecto de toxicidad del timol a concentraciones de 64 ppm, los datos bibliográficos reportan toxicidad de 16 ppm aplicado en baño (Stroh y cols 1998).



**Figura 45. Mortalidad (Nº) de peces alimentados con dietas con distintas concentraciones de timol.**

**Objetivo 3. Determinar las concentraciones de aceite esencial de Tomillo adecuadas para tratamientos preventivo y/o curativo de la *saprolegniosis* en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento, a nivel de laboratorio.**

### 3.1. Resultados de los tratamientos preventivos y/o curativos en ovas por medio de baños.

3.1.2. Resultados de la determinación de la concentración adecuada de aceite esencial para tratamiento preventivo y/o curativo en ovas de trucha arco iris: Luego de aplicar los baños de aceite de tomillo y Bronopol, a concentraciones 0 ppm, 50 ppm de Bronopol y 100 ppm de aceite de tomillo se observó un mayor porcentaje en la sobrevivencia de las ovas ya que durante el periodo de prueba, esta no bajo de un 90%. Por el contrario, a concentraciones más altas (200 ppm, 300 ppm y 400 ppm de aceite de tomillo) la sobrevivencia observada fue menor alcanzando su nivel mas bajo en la concentración de 200 ppm donde esta fue de un 48% terminado el periodo de baños; para las concentraciones de 300 ppm y 400 ppm la sobrevivencia fue menos de un 10%. (Tabla 23).

**Tabla 23. Resultados de sobrevivencia de ovas de trucha en baños a distintas concentraciones de aceite de tomillo y Bronopol**

Concentraciones	Total Ovas	BAÑO1		BAÑO2		BAÑO3		BAÑO4	
		%	%	%	%	%	%	%	%
		S	M	S	M	S	M	S	M
0 ppm	200	100	0	100	0	90	10	<b>90</b>	10
50 ppm Bronopol	200	100	0	100	0	98	2	<b>98</b>	2
100 ppm	200	100	0	99	1	99	1	<b>95</b>	5
200 ppm	200	100	0	70	30	50	50	48	52
300 ppm	200	100	0	20	80	10	90	8	92
400 ppm	200	100	0	10	90	0	100	0	100

**Tabla 24. Resultados final del efecto en baños preventivos y/o curativos en ovas verde de trucha arcoiris empleando distintas concentraciones de aceite de tomillo y Bronopol.**

Bronopol				0 ppm			
Ovas Vivas	Ovas Muertas			Ovas Vivas	Ovas Muertas		
Total	Total	Con Hongos	Sin Hongos	Total	Total	Con Hongos	Sin Hongos
586	14	9	5	540	60	41	19
98%	2%	64%	36%	90%	10%	68%	32%

100 ppm Aceite de tomillo				200 ppm Aceite de tomillo			
Ovas Vivas	Ovas Muertas			Ovas Vivas	Ovas Muertas		
Total	Total	Con Hongos	Sin Hongos	Total	Total	Con Hongos	Sin Hongos
561	39	21	18	290	310	109	201
95%	5%	<b>55%</b>	45%	48%	52%	35%	65%

300 ppm Aceite de tomillo				400 ppm Aceite de tomillo			
Ovas Vivas	Ovas Muertas			Ovas Vivas	Ovas Muertas		
Total	Total	Con Hongos	Sin Hongos	Total	Total	Con Hongos	Sin Hongos
50	550	314	236	0	600	72	528
8%	92%	57%	43	0%	100%	12%	88%

Contrastando los resultados de la Tabla 23 con los resultados indicados en la Tabla 24, es posible proponer que, en relación al efecto preventivo en el tratamiento de hongos, la concentración de 100 ppm es más efectiva que el tratamiento con bronopol ya que se obtiene un 55% de ovas con hongos, mientras que el tratamiento con bronopol presentan un 64% de ovas con hongos. Si bien es cierto que con el tratamiento control, 0 ppm, se registra un 35% de ovas con hongos, la sobrevivencia observada esta por debajo de los tratamientos de 100 ppm de aceite de tomillo y 50 ppm de bronopol. (Tabla 23).

En las concentraciones más altas de aceite de tomillo se observa que las ovas presentan un menor porcentaje de formación y crecimiento de hongos, pero los porcentajes de sobrevivencia son mucho menores

Por lo tanto se puede inferir que a mayores concentraciones no hay formación ni crecimiento de hongos pero se produce una baja sobrevivencia de ovas, de manera inversamente proporcional las menores concentraciones presentan mayor porcentaje en sobrevivencia y se produce un pequeña formación y crecimiento de hongos.

Un porcentaje mayor de ovas muertas con hongos significa que existen en el medio mejores condiciones de propagación para la saprolegnia, efecto que con el tratamiento con 100 ppm de tomillo se estaría anulando. Por lo tanto, con estos resultados es posible indicar que baños con 100 ppm de aceite de tomillo, aplicado como tratamiento preventivo en la formación y crecimiento de hongos, resultarían más efectivos que los otros tratamientos aplicados.

### **3.2. Resultados del tratamiento preventivo y curativo en alevines.**

#### 3.2.1. Resultados de tratamientos preventivos por medio de alimento.

De igual manera a lo enunciado en el punto anterior, esta prueba se vio truncada al producirse una sobrecarga de amonio en el sistema y se está a la espera de la implementación del nuevo sistema de recirculación y tratamiento de amonio para su repetición de la prueba.

No obstante lo anterior, no se observó formación de hongos con ninguno de los tratamientos con aceite de tomillo utilizados en los peces mientras duró la prueba.

#### 3.2.2. Resultados de tratamientos preventivos en alevines por medio de baños.

Se observó que en los primeros minutos luego de realizar los baños con 4 ppm de timol, los peces mostraron un nado errático pero pasado los

5 primeros minutos los peces volvieron a su estado normal. No hubo mortalidad por efecto de la aplicación del aceite de tomillo.

Luego de efectuada la inoculación del hongo en los peces, se continuó realizando los baños para prevenir la aparición de saprolegnia y se obtuvo los resultados señalados en Tabla 25. Se observa que el desarrollo del hongo produjo mayor mortalidad en los peces del tratamiento control, que en los peces sometidos a los baños con 4 ppm de timol.

**Tabla 25. Porcentaje de peces afectados por saprolegnia, con tratamiento preventivo por baños de 4 ppm de timol.**

Concentración de Timol (ppm)	Peces con hongos (%)
0 (Control)	40%
4	13,3 %

### 3.2.3 Resultados de tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris.

3.2.3.1 Resultados de tratamientos curativos en alevines de trucha arco iris por alimento con aceite esencial de tomillo: A pesar de los eventos ocurridos, se observó formación y mortalidad debido a la aparición de saprolegnia como se indica en la Tabla 26 y en Figura 46, donde se observa un mayor porcentaje de peces afectados por el hongo en aquellos tratamientos donde la concentración de timol es menor (control y 1 ppm de timol).

**Tabla 26. Porcentaje de peces afectados por saprolegnia, en tratamiento curativo por alimentos con distintas concentraciones de timol (Ámbar).**

Dieta	Peces con hongos (%)
A1	15
A2	5
CONTROL	35



**Figura. 46. Alevines de trucha arcoiris muertos por proliferación de hongo saprolegnia, en tratamiento control.**

**Objetivo 4. Realizar pruebas a escala piloto de los resultados obtenidos de las pruebas en los objetivos 2 y 3.**

**4.1. Resultados de la validación de tratamiento por medio de alimentos en trucha Arco iris en la Piscicultura de Río Blanco.**

De las pruebas realizadas en Río Blanco con dietas de 1 y 2 ppm de timol Ambar e India, se registraron los pesos promedios por dieta en cada muestreo para ajustar la ración a entregar, los que se muestran en Tabla 27.

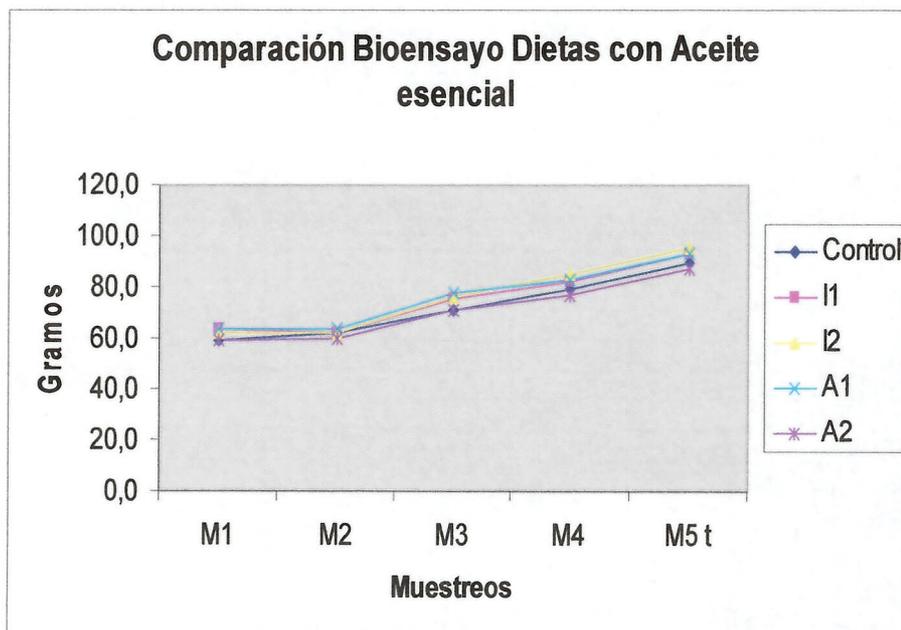
**Tabla 27. Pesos promedio (g) de peces por dieta con distintos aceites y concentraciones de timol.**

<b>Dietas</b>	<b>Muestreo 1</b>	<b>Muestreo 2</b>	<b>Muestreo 3</b>	<b>Muestreo 4</b>	<b>Muestreo 5</b>
<b>Control</b>	59,3	61,9	71,1	79,6	89,6
<b>I1</b>	63,6	62,0	75,5	82,3	93,6
<b>I2</b>	62,4	62,3	75,9	85,5	95,3
<b>A1</b>	63,5	63,4	77,5	83,2	93,7
<b>A2</b>	59,6	60,2	71,1	76,7	87,6

Donde:

I 1 e I 2: Dietas con Aceite India con 1 y 2 ppm de inclusión de timol.  
 A1y A2: Dietas con Aceite Ámbar con 1 y 2 ppm de inclusión de timol.

Se observó que las dietas I 2 y A1 presentaron un mayor crecimiento en peso (85,3 g y 93,6 g) que las dietas A2 y control (87,6 g y 89,6 g). Si bien es cierto con las dietas con aceite de la India se obtuvo mejores resultados en cuanto a crecimiento, en pruebas posteriores se utilizó el aceite Ámbar por presentar una mayor disponibilidad y facilidad en su adquisición, además de poseer mayores concentraciones de timol y carvacrol, principales agentes antifúngicos en el aceite de tomillo, que su símil de India.



**Figura. 47. Pesos promedios en peces alimentados con dietas que contienen distintos aceites y concentraciones de timol.**

Luego de la inoculación del hongo en estos peces, no se desarrolló saprolegnia, lo que probablemente se debió a las bajas temperaturas registradas en la piscicultura durante el período de experimentación Temperatura más baja registrada = 7° C

#### **4.2 Resultados de la validación del aceite esencial de tomillo para su uso en ovas de salmón en tratamientos curativos.**

##### 4.2.1. Resultados del tratamiento curativo en ovas de salmón.

En los tratamientos de los baños de aceite esencial de tomillo en ovas de Salmón Atlántico, (Tabla 28), la mortalidad producida en los tratamientos de 400 y 500 ppm alcanza niveles sobre un 80% luego del primer baño, lo cual probablemente se debió a las altas concentraciones de aceite de tomillo.

La mortalidad registrada en la ovas de los tratamientos control y con 200 ppm de aceite, se debió específicamente a la infección por saprolegnia (Tabla 29 y Figura 23 ).

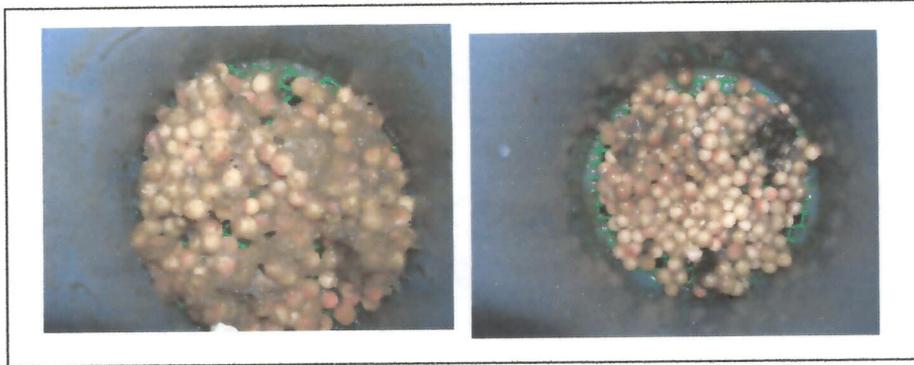
**Tabla 28. Distribución de tratamientos con distintas concentraciones de aceite de tomillo en ovas de S. Atlántico.**

<i>Acuario</i>	<b>1</b>			<b>2</b>			<b>3</b>			<b>4</b>		
<i>Concentración (ppm)</i>	0	200	400	400	0	200	500	500	500	400	0	200
<i>Nº Ovas Verdes/cuna</i>	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

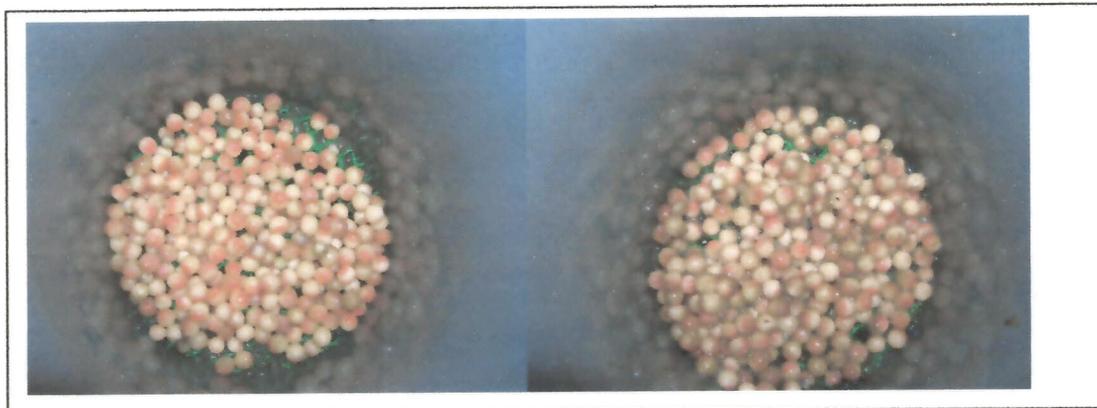
**Tabla 29. Mortalidad producida en ovas verdes de S. Atlántico.**

<i>ppm</i>	<i>Total Ovas</i>	<i>Baño 1</i>		<i>Baño 2</i>		<i>Baño 3</i>		<i>Baño 4</i>	
		<i>%S</i>	<i>%M</i>	<i>%S</i>	<i>%M</i>	<i>%S</i>	<i>%M</i>	<i>%S</i>	<i>%M</i>
0	750	99,7	0,3	83,3	16,7	46,7	53,3	0,0	100,0
200	750	94,3	5,7	81,7	18,3	28,3	71,7	0,0	100,0
400	750	18,3	81,7	21,7	78,3	0,0	100,0	0,0	100,0
500	750	8,3	91,7	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0

Sin embargo, debido a que el mejor sustrato para la propagación del hongo son las ovas muertas, se continuó realizando baños para verificar si efectivamente el aceite esencial de tomillo actúa evitando la propagación del hongo. Lo anterior fue verificado, ya que se observó que en aquellos tratamientos con 400 y 500 ppm de aceite de tomillo el hongo no proliferó pasados 15 días de la muerte de las ovas (Figura 49), al contrario de lo ocurrido en los tratamientos control y con 200 ppm de aceite esencial de tomillo (Figura 48).



**Figura. 48. Ovas muertas de *S. Atlántico* sometidas a baños con 0 ppm y 200 ppm de aceite esencial de tomillo, respectivamente.**



**Figura. 49 Ovas muertas de *S. Atlántico* sometidas a baños con 400 ppm y 500 ppm de aceite esencial de tomillo, respectivamente.**

#### **4.3. Aceite esencial de tomillo validado para su uso en ovas de trucha arco iris, en tratamientos curativos y preventivos.**

Los resultados entregados en este acápite requieren ser complementados y comparados con las estrategias de aplicación de fungicidas que las empresas actualmente están utilizando. Si bien en los fungicidas comerciales se recomienda una **concentración** determinada de aplicación, las empresas ajustan estas concentraciones a las estrategias de manejo y parámetros de cultivo.

Los resultados obtenidos con los baños de aceite de timol son prometedores no obstante es preciso afinar el tiempo de duración y la frecuencia de los baños, como también la longitud de los tratamientos.

#### 4.3.1. Tratamiento curativo en ovas de trucha arco iris.

4.3.1.1. En ovas verdes de trucha arco iris: Los resultados de esta experiencia están dados según el número de ovas vivas, ovas muertas con hongo y sin hongo, así como el área abarcada por el hongo luego de haber efectuado baños cada 48 hrs durante 35 días, hasta la aparición de ojos.

En el tratamiento con 400 ppm de aceite de tomillo (Tabla 30) se puede observar que al término de la experiencia se contabilizaron ovas vivas en las cunas. Aunque la cantidad de ovas vivas es baja, el área abarcada por el hongo también es menor, comparado con las otras dos concentraciones de tomillo utilizadas. Este resultado sugiere que es posible utilizar aceite de tomillo a una concentración de 400 ppm como tratamiento curativo en ovas verdes de trucha arco iris. En los baños a 600 ppm y 800 ppm de tomillo, la totalidad de las ovas, no resistieron estas concentraciones de tomillo, puesto que no se encontraron ovas vivas al final de la experiencia. Para estos tratamientos es posible indicar que no es conveniente el uso de aceite de tomillo en concentraciones de 600 y 800 ppm en tratamiento de *Saprolegnia sp.*, en ova verde de trucha arco iris.

Comparativamente los baños con Bronopol mostraron mejores resultados que los baños de aceite de tomillo. Sin embargo, se hace crítico el tiempo de exposición, ya que en las primeras semanas el micelio del hongo en el tratamiento control era significativamente mayor, el hongo crecía a su máxima expresión, no así con cualquiera de los tratamientos con tomillo. Esto fue más evidente en los primeros 15 días de tratamiento, situación que no se observó al término de los tratamientos.

Por lo tanto es preciso, para los baños con 400 ppm, definir estrategias de aplicación en cuanto a la periodicidad de los baños y longitud del tratamiento. Para esto último se hace necesario verificar en cuanto tiempo se produce la reaparición de la saprolegnia en el agua de cultivo una vez efectuado el tratamiento.

**Tabla 30. Resultados promedio de *tratamientos curativos en ova verde* de trucha arco iris, con baños de aceite de tomillo a distintas concentraciones y 50 ppm de Bronopol**

	Ovas muertas		Ovas vivas	Área hongo (cm <sup>2</sup> )	Nº ovas /área
	Con hongo	Sin hongo			
<b>Aceite de Tomillo</b>					
<b>400</b>	<b>117</b>	<b>153</b>	<b>457</b>	<b>282</b>	<b>914</b>
<b>600</b>	<b>194</b>	<b>132</b>	<b>0</b>	<b>405</b>	<b>1441</b>
<b>800</b>	<b>238</b>	<b>132</b>	<b>0</b>	<b>406</b>	<b>1429</b>
<b>50 ppm Bronopol</b>	<b>52</b>	<b>254</b>	<b>1190</b>	<b>98</b>	<b>317</b>

4.3.1.2 Resultados de tratamiento curativo por baños en ovas con ojo de trucha arco iris: Los resultados de esta experiencia están dados según el número de ovas vivas, ovas muertas con hongo y sin hongo, así como el área abarcada por el hongo al final de la experiencia. Además se incluye el número de alevines eclosionados vivos, muertos con hongo y sin hongo, como un antecedente complementario. (Tabla 31)

**Tabla 31 Resultados promedios de *tratamiento curativo en ova con ojo* con baños a distintas concentraciones de aceite de tomillo y 50 ppm de Bronopol.**

Concentración Ppm Aceite tomillo	Ovas muertas		Ovas vivas	Área hongo (cm <sup>2</sup> )	Alevines al término de la experiencia		
	Con hongo	Sin hongo			Muertos	Muertos c/hongo	Vivos
<b>200</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>1246</b>	<b>44</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>50</b>
<b>400</b>	<b>91</b>	<b>0</b>	<b>964</b>	<b>78</b>	<b>23</b>	<b>0</b>	<b>54</b>
<b>500</b>	<b>108</b>	<b>114</b>	<b>113</b>	<b>278</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>24</b>
<b>50 ppm Bronopol</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>795</b>	<b>103</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>179</b>

Realizar la experiencia previa con concentraciones más altas de tomillo, permitió comparar y establecer cuales eran apropiadas para la realización de los baños en ovas con ojos. Como en la experiencia con ova verde se probaron concentraciones de 400, 600 y 800 ppm, siendo las dos últimas nocivas para las ovas, en la experiencia con ovas con ojo, por lo tanto se probaron concentraciones de 200, 400 y 500 ppm de tomillo.

En esta prueba se obtuvieron mejores resultados con los baños con aceite de tomillo a una concentración de 200 ppm (Tabla 29), ya que se registró al final de la experiencia una mayor cantidad de ovas vivas, una menor área de propagación, así como un menor número de ovas infectadas que con los otros tratamientos. Estos resultados indican que es posible la utilización de 200 ppm de tomillo en el tratamiento curativo de ovas con ojos infectadas por *Saprolegnia sp*, ya que la mortalidad es aceptable comparada con el tratamiento control y los demás tratamientos con tomillo.

Los baños a concentraciones de 400 y 500ppm de aceite de tomillo no arrojaron buenos resultados, por lo que no aparecen recomendables.

#### 4.3.2. Tratamiento preventivo en ovas de trucha arco iris.

##### 4.3.2.1. Resultados de tratamiento preventivo en ova verde de trucha arco iris.

Los resultados de esta experiencia, de la misma manera que la experiencia anterior, están dados según el número de ovas vivas, ovas muertas con hongo y sin hongo, así como el área abarcada por el hongo al final de la experiencia. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 32

**Tabla 32 promedios de tratamiento preventivo en ova verde de trucha arco iris, de baños a distintas concentraciones de aceite de tomillo y 50 ppm de Bronopol.**

Concentración	Ovas muertas		Ovas vivas	Área hongo (cm2)	Nº ovas área
	Con hongo	Sin hongo			
400	199	345	683	107	380
600	339	232	0	327	1177
800	308	438	0	288	1066
50 ppm de Bronopol	178	378	772	135	522

En el tratamiento preventivo, con la utilización de la mínima concentración de tomillo 400 ppm (Tabla 30), se aprecia esta vez una mayor cantidad de ovas vivas (683), que en el tratamiento curativo (457). Lo que se podría considerar un buen resultado, debido a que en condiciones normales existe un picaje de ovas infectadas con el hongo y por lo tanto el número de ovas vivas con esta concentración podría llegar a ser incluso mayor. Además el número de ovas con hongo al final de la experiencia también fue menor, comparada con la misma concentración del tratamiento curativo. En definitiva se podría decir que es factible utilizar esta concentración de tomillo para la prevención del hongo, comparada con las otras dos concentraciones probadas.

Por otro lado con la utilización de concentraciones mayores, es decir 600 y 800 ppm no se encontraron ovas vivas al final de la experiencia, lo que confirmaría que no es factible la utilización de estas concentraciones para el tratamiento de *Saprolegnia sp* en ovas verdes de trucha arcoiris.

Con el tratamiento con baños de Bronopol se pudo apreciar que arrojaron buenos resultados en cuanto a la cantidad de ovas vivas al final de la experiencia. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con 400 ppm de aceite de tomillo, se observa que la cantidad de ovas, así como el área abarcada por el hongo es menor utilizando esta concentración que 50 ppm de Bronopol. La cantidad de ovas muertas sin hongo también resultó ser menor en el tratamiento con tomillo.

Este último resultado nos indica una vez más que es posible utilizar tomillo a una concentración de 400 ppm, ya que se estaría obteniendo una menor cantidad de ovas infectadas por el hongo. Es posible que estos resultados mejoren al afinar estrategias de manejo en la etapa de ova verde.

4.3.2.2. Resultados de tratamiento preventivo en ovas con ojo de trucha arco iris: Al utilizar baños con 200 ppm de aceite de tomillo (Tabla 33), se obtuvieron como resultado 1135 ovas vivas en promedio al final de la experiencia. Esta cifra es levemente menor que el tratamiento control con el cual logró 1159 ovas vivas.

Utilizando una concentración de 400 ppm se obtuvo al final de la experiencia en promedio unas 1227 ovas vivas, cifra mayor a las dos concentraciones de tomillo utilizadas 200 y 500 ppm y al tratamiento control con Bronopol.

**Tabla 33. Resultados promedio de tratamientos preventivo en ova con ojo de trucha arco iris, con baños de aceite de tomillo a distintas concentraciones y 50 ppm de Bronopol**

Concentración	Ovas muertas		Ovas vivas	Área hongo (cm <sup>2</sup> )	Nº ovas área	Alevines al término de la experiencia		
	Con hongo	Sin hongo				Muertos	Muertos c/hongo	Vivos
200	18	16	1135	62	207	4	3	77
400	25	16	1227	26	74	6	11	63
500	33	135	367	220	840	37	14	62
50 ppm bronopol	13	4	1159	61	197	8	11	79

Los resultados registrados con la concentración de 500 ppm de aceite esencial de tomillo, confirman que es demasiado alta para ser utilizada en el control de *Saprolegnia sp.*, en ovas con ojo de trucha arcoiris. En estas pruebas, de las tres concentraciones de tomillo utilizadas, el mejor resultado se obtuvo con una concentración de 400 ppm, en término de mayor N° de ovas vivas, menos área cubierta por hongo y menor número de ovas por área infectada.

#### **4.4 Estudio del riesgo asociado a la eliminación de altas dosis de aceite esencial de tomillo al medio.**

El tiempo promedio de residencia de las partículas que arrastra el agua de desagüe entre las diferentes estaciones correspondió a:

**Tabla 34. Tiempo promedio (en minutos) de residencia de las partículas que arrastra el agua entre estaciones.**

<i>Tramo -Estaciones</i>	<i>Minutos</i>
<i>E1 - E2</i>	2,6
<i>E2 - E3</i>	1,7
<i>E3 - E4*</i>	7,1
<i>E4 - E5*</i>	10,7
<i>E5 - E6</i>	5,2
<b>TIEMPO TOTAL DE RECORRIDO</b>	<b>27,254</b>

Es importante destacar que para los tramos E3 - E4\* y E4 - E5\*, en tres de los ocho recorridos se presentaron valores anormales, demasiado elevados respecto a la media, por lo cual se descartó la medición de estos recorridos en la obtención del promedio final (tal como se indicó en la metodología). La anomalía se presume que se originó por la configuración de la laguna y ráfagas de vientos intermitentes (situaciones ocasionales que se presentan en las tardes en la piscicultura) las cuales afectaron la normal trayectoria del derivador.

Los valores anormales correspondieron a 45–65 min, 20-28 min y 25-30 min respectivamente, para la trayectoria de las estaciones mencionadas (E3 - E4\* y entre E4 - E5). La situación anterior sumado a la configuración de la laguna, permite inferir que en ésta se podría producir una acumulación de aceite esencial (residual) en el tiempo, por lo cual se hace necesario tomar una muestra en un período mayor de tiempo (el cual se definió en 1440 min, un día después de comenzar con los baños).

La Tabla 34 muestra que el tiempo promedio de residencia de una partícula arrastrada por el agua entre estaciones es mínimo (10 minutos) considerando que el tratamiento usado considera baños cada 48 horas. El tiempo total del recorrido, desde la sala de incubación hasta la salida de la piscicultura, corresponde en promedio a 27,3 minutos, lo cual indica que en este tiempo el agua que proveniente de las bateas de tratamiento comienza a ser evacuada de la piscicultura.

El perfil de aceites esenciales en el agua de las bateas al inicio y final del baño para los diferentes tratamientos (baños a ovas) se presentan en Tabla 35, Tabla 36 y Tabla 37.

**Tabla 35. Diferencia en el perfil inicial y final de aceites esenciales en el agua para tratamientos de baños a 400 ppm.**

		Tratamiento de baño 400 ppm		
Tiempo		Inicio del baño > 0 min	Final del baño <30 min	Diferencia final-inicial
Análisis				
Eucaliptol [mg / L]		1,6	2,5	0,9
$\alpha$ - pineno [mg / L]		< 0,3	<0,3	0
$\beta$ -pineno [mg / L]		< 0,3	< 0,3	0
Linalol [mg / L]		19	20	1
p-cimeno [mg / L]		1,6	3,1	1,5
Borneol [mg / L]		2,4	2,1	-0,3
Timol [mg / L]		79	61	-18
Carvacrol [mg / L]		4,3	3,3	-1

**Tabla 36. Diferencia inicial y final en el perfil de aceites esenciales en el agua para tratamientos de baños a 600 ppm.**

		Tratamiento de baño 600 ppm		
Tiempo		Inicio del baño > 0 min	Final del baño <30 min	Diferencia final- inicial
Análisis				
Eucaliptol [mg / L]		4,1	3,4	-0,7
$\alpha$ - pineno [mg / L]		0,4	0,3	0
$\beta$ -pineno [mg / L]		< 0,3	< 0,3	0
Linalol [mg / L]		29	24	-5
p-cimeno [mg / L]		4,5	4,1	-0,4
Borneol [mg / L]		3,3	3,1	-0,2
Timol [mg / L]		83	79	-4
Carvacrol [mg / L]		4,4	4,3	-0,1

**Tabla 37. Diferencia inicial y final en el perfil de aceites esenciales en el agua para tratamientos de baños a 800 ppm.**

Tiempo Análisis	Tratamiento de baño 800 ppm		
	Inicio del baño > 0 min	Final del baño <30 min	Diferencia final-inicial
Eucaliptol [mg / L]	3,9	3,1	-0,8
$\alpha$ - pineno [mg / L]	0,5	0,6	0
$\beta$ -pineno [mg / L]	<0,3	<0,3	0
Linalol [mg / L]	39	35	-4
p-cimeno [mg / L]	2,8	2,1	-0,7
Borneol [mg / L]	6,4	5,6	-0,8
Timol [mg / L]	157	152	-5
Carvacrol [mg / L]	8,5	8,6	0,1

De las Tablas anteriores, independientemente de la concentración de aceite aplicado en cada tratamiento, se observa una disminución del contenido de los aceites esenciales en el agua al final del tratamiento. Lo anterior, es probable atribuirlo a que parte de los aceites esenciales podría pasar a un estado gaseoso y/o quedar adherido en forma de trazas en las paredes de las bateas, cunas y equipos utilizados para el baño (bombas y mangueras).

Los análisis de timol y carvacrol efectuados para verificar la presencia de estos componentes en las estaciones de muestreo, luego de realizado los baños con aceite de tomillo, se presentan en la Tablas 38 y 39.

**Tabla 38. Matriz resumen de análisis de timol en el agua para las diferentes estaciones de muestreo en el tiempo (concentración en mg/l).**

	Tiempo en minutos														
	antes 0	0*	20*	30*	33	40*	50*	53	70*	73	93	113	153	253	1440
E*	PT														
E1.400		79		61	19			< 0,03		< 0,03					
E1.600			83					79	118	< 0,03	0,1				
E1.800							157			152	112	< 0,03	< 0,03		
E9					3,7			5,4		9,5	0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
E2					< 0,03			3,3		4,7	0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	N.D. 0,03
E3					< 0,03			< 0,03		< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,01	< 0,03
E4					0,1			0,4		0,03	0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,01	< 0,01
E5					< 0,03			< 0,03		< 0,03	0,1	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
E6					< 0,03			0,1		0,4	0,2	< 0,03	< 0,03	< 0,03	N.D. 0,03
E0	< 0,03														

PT	Concentraciones obtenidas de análisis de Perfil aceites esenciales
CYT	Concentraciones obtenidas de análisis carvacrol y timol

Nota: 0\* comienzo tratamiento 400 ppm de tomillo  
 20\* comienzo tratamiento 600 ppm de tomillo  
 30\* término tratamiento 800 ppm de tomillo  
 40\* comienzo tratamiento 400 ppm de tomillo  
 50\* término tratamiento 600 ppm de tomillo  
 70\* término tratamiento 800 ppm de tomillo

**Tabla 39. Matriz resumen de análisis de carvacrol en el agua para las diferentes estaciones de muestreo en el tiempo. (Concentración en mg/l).**

	Tiempo en minuto															
	antes 0	0*	20*	30*	33	40*	50*	53	70*	73	93	113	153	253	1440	
E*	PT															
E1.400		4,3		3,3	1,6			< 0,01		< 0,01						
E1.600			4,4					4,3	6,3	< 0,01	< 0,01					
E1.800							8,5			8,6	6,2	< 0,01	< 0,01			
E9					0,2				0,4		0,9	N.D.	< 0,01	< 0,01	N.D.	< 0,01
E2					N.D.				0,2		0,3	< 0,01	N.D.	< 0,01	N.D.	< 0,01
E3					< 0,01						< 0,01	< N.D.	< 0,01	< N.D.	< 0,01	< 0,01
E4					< 0,01						< 0,01	< 0,01	N.D.	< 0,01	< 0,01	< 0,01
E5					< 0,01						< 0,01	< 0,01	N.D.	< 0,01	N.D.	N.D.
E6					< 0,01						< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
E0	ND															

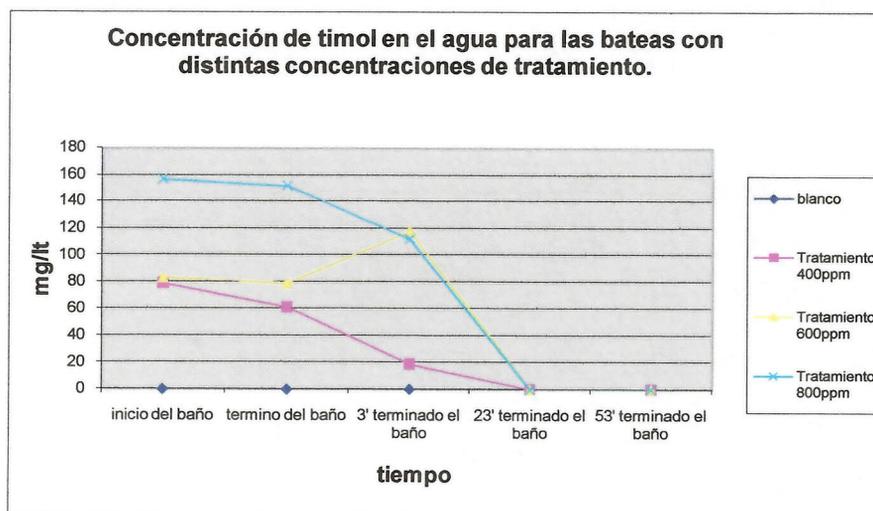
PT	Concentraciones obtenidas de análisis de Perfil aceites esenciales
CYT	Concentraciones obtenidas de análisis carvacrol y timol

Nota: 0\* comienzo tratamiento 400 ppm de tomillo  
 20\* comienzo tratamiento 600 ppm de tomillo  
 30\* término tratamiento 800 ppm de tomillo  
 40\* comienzo tratamiento 400 ppm de tomillo  
 50\* término tratamiento 600 ppm de tomillo  
 70\* término tratamiento 800 ppm de tomillo

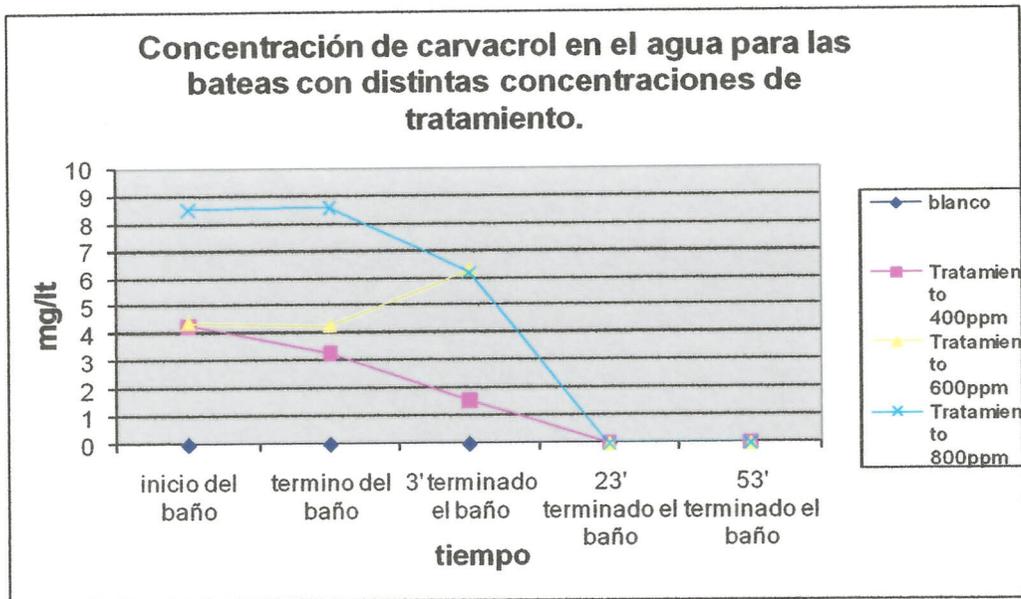
Es importante destacar que en el análisis realizado en la aducción de agua (blanco) se encontró una concentración menor a 0,03 mg/l probablemente

atribuible a concentraciones propias de la fuente de agua o bien a un ruido en el análisis.

En las Tablas anteriores se puede apreciar que en las bateas donde se realizaron los baños, las concentraciones de timol y carvacrol, luego de 3 minutos, eran aptas para la incubación de ovas pero tóxicas para el mantenimiento de peces. Sin embargo, en la siguiente medición realizada a los 30 minutos se encontró que la concentraciones de éstos aceites se reducen considerablemente ( $<0,03$ ) para el caso timol, valor similar a la condición previa al tratamiento (en fuente de agua) y  $<0,01$  para el caso del carvacrol valor que es prácticamente despreciable. Dado lo anterior, es posible indicar que en las bateas, luego de 20 minutos de terminado el baño a las concentraciones trabajadas, se vuelve a la condición inicial (condición normal). Lo anterior se ve graficado en las figuras 50 y 51.

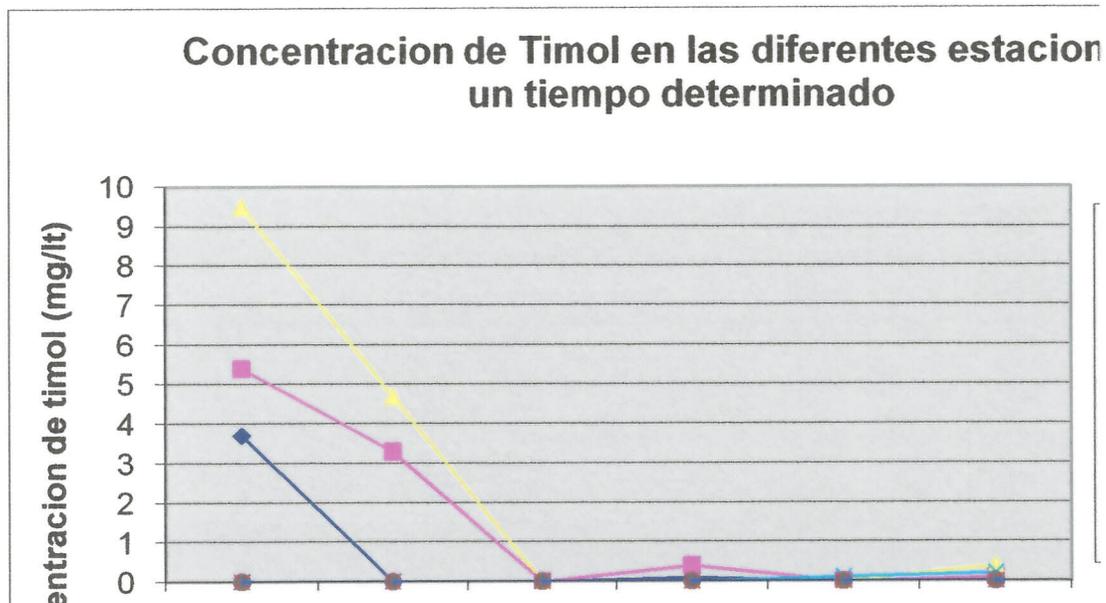


**Figura 50. Concentración de timol en el agua en las bateas para los distintos tratamientos.**

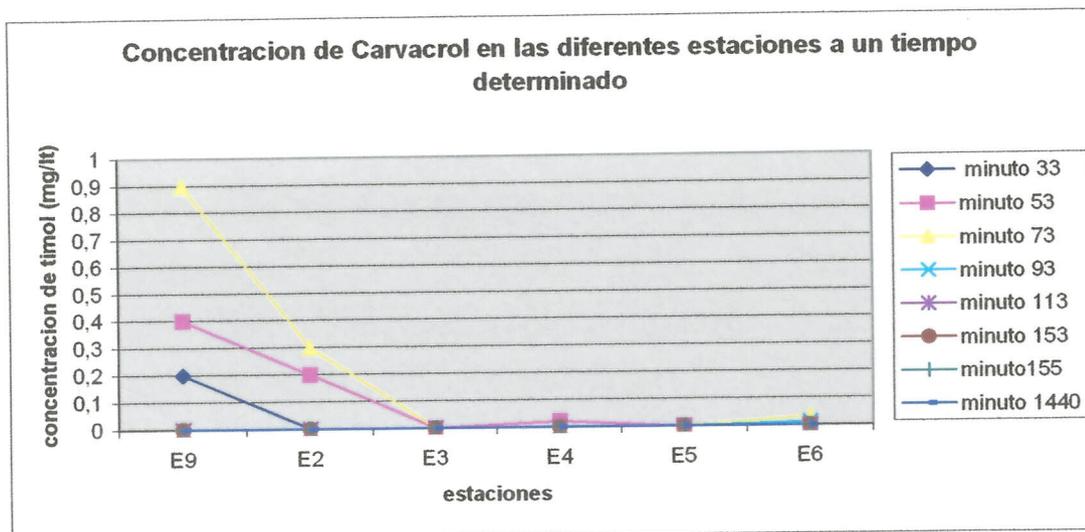


**Figura 51. Concentración de Carvacrol en el agua en las bateas para los distintos tratamientos.**

De las Tablas 36 y 37 también es posible inferir, que a medida que se sigue el recorrido del agua residual por las diferentes estaciones, las concentraciones de timol y carvacrol disminuyen considerablemente, inclusive en el momento que se libera el tratamiento de la batea 800ppm, mayor concentración esperadas en las estaciones (minuto 73 desde el comienzo de los baños). Lo anterior se encuentra visualizado en los gráficos 52 y 53.



**Figura 52. Concentración de Timol a un tiempo determinado (en minutos) en las diferentes estaciones.**



**Figura 53: Concentración de Timol a un tiempo determinado (en minutos) en las diferentes estaciones.**

Tal como se muestra en los gráficos anteriores, el minuto 73, tiempo en el cual se libera el agua del tratamiento con la mayor concentración de aceite de tomillo (800 ppm), corresponde al momento más crítico, en el cual se registran las mayores concentraciones de timol y carvacrol en el agua para estaciones E9 y E2, seguido por los minutos 53 y 33 donde se liberan las concentraciones de 600 y 400 ppm respectivamente. En el resto de las estaciones se encuentran concentraciones que tienden a la normalidad, esto puede ser atribuible porque las estaciones siguientes incorporan nuevas afluentes de aguas de la piscicultura.

Para el caso de la estación 9 (canaleta de desagüe de la sala de incubación) tanto para los minutos 73 (9,5 ppm de timol) y 53 (5,4 ppm timol) se presenta concentraciones de Timol superiores a 4 ppm, las cuales, se presentan tóxicas para los peces según experiencias de toxicidad realizadas previamente. Esta situación se repite para la estación 2 en el minuto 73 con 4,7 ppm.

Para el resto de las estaciones se encuentran valores de concentración bajas en donde el timol presenta una concentración <0,03 mg/l, cifra igual a la detectada en la fuente de agua (blanco) y para el caso del carvacrol se encontraron concentraciones <0,01 cifra que corresponde al limite del umbral detectable en los análisis.

De estas experiencias podemos concluir, para el caso de la piscicultura de Río Blanco, que al usar el aceite esencial de tomillo como tratamiento de ovas en concentraciones de hasta 800 ppm, es factible la inmediata utilización de las unidades de cultivo.

Por los flujos de agua manejados en la piscicultura Río Blanco y la configuración del sistema de canalización de agua de desagüe de esta piscicultura, no se presentarían riesgos de encontrar altos niveles de residuos del

aceite esencial de tomillo que resulten tóxicos para peces durante el desarrollo de los baños ni que estos niveles se acumulasen en el tiempo.

Se debe considerar que no se debe reutilizar el agua residual de los tratamientos por baños en ovas en estanques o bateas con peces. El mayor peligro de toxicidad para peces se origina en el momento en el cual se producen los desagües de los tratamientos, por lo cual se sugiere realizar una dilución de las aguas de desechos de los baños realizados si se desea reutilizar en el cultivo peces.

Por los flujos de agua manejados en la piscicultura Río Blanco y la configuración del sistema de canalización de agua de desagüe de esta piscicultura, no se presentarían riesgos de encontrar altos niveles de residuos del aceite esencial de tomillo que resulten tóxicos para peces durante el desarrollo de los baños ni que estos niveles se acumulasen en el tiempo.

#### **Objetivo 5. Determinar a nivel experimental el costo de un tratamiento curativo y/o preventivo contra la saprolegniosis en salmones y truchas**

Utilizando como referencia el precio del aceite Ambar igual a \$ 254.263, se estimo el costo de tratamientos con baños a distintas concentraciones, para ovas de trucha y salmón y para alevines de truchas. (Tablas 40 a 42)

##### **5.1 En ovas de salmón coho y trucha**

El costo del tratamiento esta determinado para un baño diario y varía en función de la concentración de aceite de timol empleado.

Las cifras están estimadas para un total de 40 mil ovas que es la capacidad promedio de una batea horizontal de

**Tabla 40. Precio estimativo tratamiento baños Ovas de Trucha**

<b>Concentración</b>	<b>ml de aceite</b>	<b>Litros</b>	<b>\$ baño / día / 1000 ovas</b>
400ppm	30 ml	0,03	\$ 190
600ppm	45 ml	0,045	\$ 285
800ppm	60 ml	0,06	\$ 380

**Tabla 41. Precio estimativo tratamiento baños Ovas de Salmon.**

<b>Concentración</b>	<b>ml de aceite</b>	<b>Litros</b>	<b>\$ baño / día / 1000 ovas</b>
200 ppm	15 ml	0,015	\$ 42
400 ppm	30 ml	0,03	\$ 190
500 ppm	45 ml	0,05	\$ 238

### **5.2 En alevines de salmón coho**

Estas pruebas originalmente se realizarían en las instalaciones de Cetecsal. Debido a que en Cetecsal se originó un cambio de orientación, políticas, y un cambio de Gerente, la empresa se orientó al área de evaluación de impacto ambiental, suprimiendo la actividad en los centros de experimentación. En reunión con el Ejecutivo de Proyecto FIA sobre la realización de este objetivo, se nos consultó si al desarrollar estas pruebas se obtendrían resultados diferentes a los ya encontrados en Trucha, a lo cual el equipo de investigación contestó que se obtendrían resultados diferentes, se procedió a prescindir de esta actividad.

### **5.3 En alevines de truchas**

Para la estimación del costo de baños de juveniles alevines se consideró un peso promedio de 31 grs.

**Tabla 42. Precio estimativo tratamiento juveniles de trucha.**

<i>Concentración</i>	<i>ml de aceite</i>	<i>Litros</i>	<i>\$ tratamiento diario 12Kg/m3 de juveniles de trucha</i>
<i>2 ppm</i>	<i>0,3 ml</i>	<i>0,003</i>	<i>\$ 765</i>
<i>4 ppm</i>	<i>0,45 ml</i>	<i>0,0045</i>	<i>\$ 1145</i>

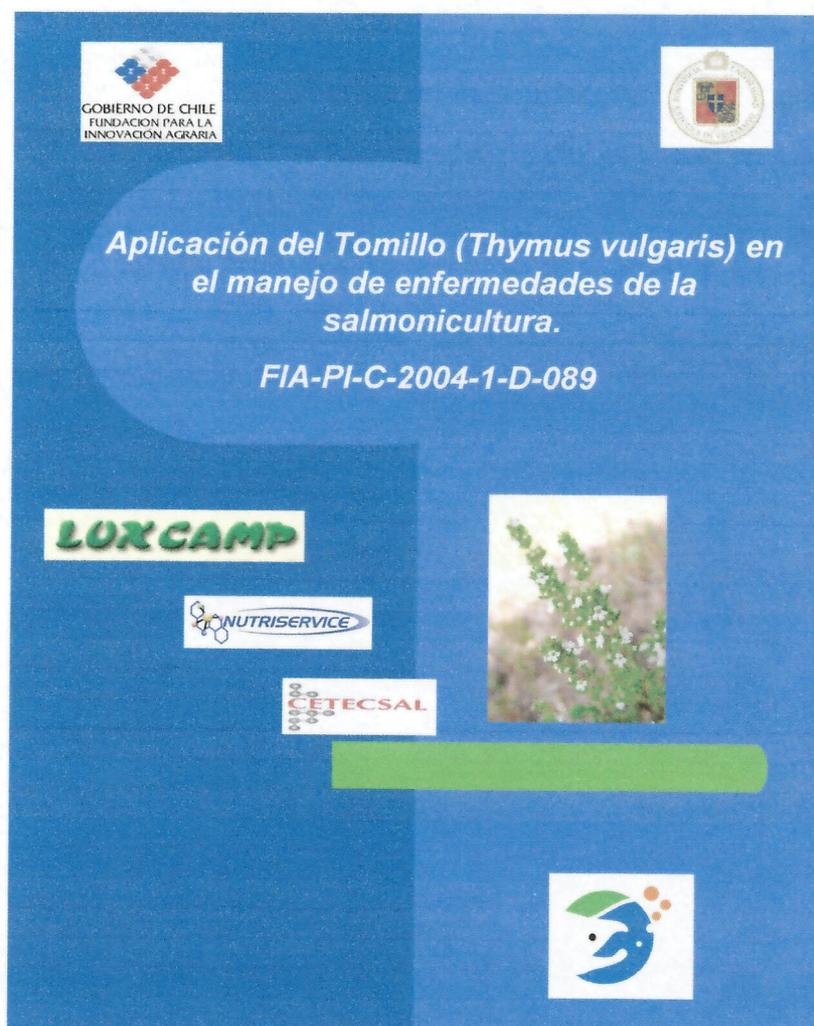
Es preciso indicar que los costos señalados en las Tablas anteriores son referenciales, y solo se ha considerado el costo que significa adquirir el aceite. No se contemplan otros costos operacionales por que se asume que estos son equivalentes para todo tratamiento.

**Objetivo 6. Difundir los resultados al sector acuícola, farmacéutico y agrícola y distribuir un libro-manual para el uso de aceites esenciales de tomillo para el control y/o prevención de la saprolegniosis en salmónidos**

Para el cumplimiento de este objetivo se desarrollaron las siguientes actividades.

### 6.1 Diseño y elaboración póster difusión y papelería.

**Pendón utilizado en el lanzamiento del proyecto, 22 de abril del 2005.**



## Dípticos Lanzamiento

**Lanzamiento Proyecto**  
**Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el  
 manejo de enfermedades de la salmonicultura.**  
 FIA-PI-C-2004-1-D-089

  
 GOBIERNO DE CHILE  
 FUNDACIÓN PARA LA  
 INNOVACIÓN ACUÍCOLA

  
**Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura**  
 LABCPAC, Escuela de Ciencias del Mar  
 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
 Dirección: Av. Altamirano 1480, Of. 204, Valparaíso  
 e-mail: [toledo@uev.cl](mailto:toledo@uev.cl) / [labcpac@uev.cl](mailto:labcpac@uev.cl)  
 Fono/Fax: 02-274263







## Díptico divulgación del proyecto Jornadas de Salmonicultura, Puerto Montt, 25 al 27 de octubre del 2006.

**Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en  
 el manejo de enfermedades de la  
 salmonicultura.**  
 FIA PI C 2004- 1- D -089

De las diversas enfermedades que afectan a los cultivos de salmonidos, la "saprolegniosis" es la que ha llamado la atención de los investigadores desde que el uso del verde malvaletta fue prohibido en Chile, a partir de 1992, por sus notorios efectos carcinógenos y mutagénicos. Esta enfermedad se origina a partir de un hongo acuático, oportunistamente adherente al pez, que pertenece al género *Saprolegnia* e invade tejidos epiteliales, dérmicos e internos, llegando a provocar, desde un 15 a un 25 % de pérdidas en la producción de alevines.

Dada la importancia económica que representa para Chile la producción de salmonidos, y las pérdidas que se originan por la "saprolegniosis", es fundamental buscar productos alternativos al verde malvaletta, sin riesgo para la salud humana, que favorezcan la producción limpia.

En los últimos años, la investigación médica se ha vuelto a las plantas medicinales en búsqueda de nuevos principios activos, puesto que desde un comienzo fueron las plantas medicinales las que proveen las composiciones naturales para diversos medicamentos. Es así que este proyecto con el objetivo de utilizar plantas medicinales para el tratamiento y control de la saprolegniosis en la salmonicultura, entre las cuales se encuentra el tomillo.

En pruebas experimentales preliminares, desarrolladas en el Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura (LABCPAC) de la PUCV, se ha aplicado aceite esencial de tomillo, específicamente sus aceites ricos en carvacrol y timol, y se ha observado efectos antibióticos contra *Saprolegnia*. El objetivo de esta investigación es utilizar los aceites esenciales del tomillo como agentes fungicidas para el control y prevención de la saprolegniosis.

**Laboratorio de Cultivo de Peces y de Alimentación  
 para la Acuicultura**





El Laboratorio de cultivo y alimentación para la acuicultura (LABICA) es una unidad de investigación perteneciente a la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Tienen por misión realizar investigación en el área de cultivo de peces y alimentación de especies acuáticas.

Investigación en la investigación y desarrollo de proyectos relacionados con la recuperación de nuevas materias primas de origen animal, efecto de los aditivos en los parámetros de crecimiento, efecto y tratamiento de riesgo en los peces y/o, otros proyectos correspondientes en su materia de Fondeo condonable.

#### ÁREA DE INVESTIGACIÓN

- Cultivo de Peces
- Alimentación de Especies Acuáticas
- Biorreactores de peces y acuicultura
- Manejo Alimentario
- Vaciamiento Gástrico/frecuencia de alimentación
- Uso de nuevas materias primas en la alimentación acuícola
- Utilización de materias primas de origen vegetal en la alimentación de salmonídeos



#### ALGUNOS PROYECTOS DE SALMONICULTURA

- Alimentación de Reproductoras: incidencia de la plasmación y su efecto en la calidad de los huevos de *Trachurus trachurus* y posteriores etapas de incubación y larvicultura. Proyecto FONDECYT 0481095
- Nueva Alimentación: Evaluación de un plan de manejo alimentario para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa de crecimiento. DGI 00V222-766
- Diversificar el uso del leño, utilizándolo como fuente proteica alternativa en la alimentación de la salmonicultura. Proyecto FIA PI-C-2004-1-D-089
- Generación de fuentes alternativas de materia prima para la alimentación de especies acuáticas basadas de productos abates. Fovis "Proyecto FONDECYT 0481095"
- Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la Salmonicultura. FIA PI-C-2004-1-D-089 (En desarrollo)

#### CORTEC 204

Maria Isabel Toledo D.  
[itoledo@ucv.cl](mailto:itoledo@ucv.cl)  
 Alex Henriquez E.  
[alex.henriquez@ucv.cl](mailto:alex.henriquez@ucv.cl)  
 Gerardo Olivares C.  
[gerardo.olivares@ucv.cl](mailto:gerardo.olivares@ucv.cl)  
 Andrea Soto A.  
[andrea.soto@ucv.cl](mailto:andrea.soto@ucv.cl)  
 Avenida Almirante 1480, oficina 204  
 Valparaíso - Chile  
 Fono: 36 32 2214239 Fono/Fax: 36 32 2274263





## “Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la salmonicultura”



### JUSTIFICACION

Dentro de las diversas enfermedades que afectan a los cultivos de salmonidos, se presenta un hongo altamente invasivo que pertenece al género *Saprolegnia* y corresponde a un hongo saprofito oportunista que invade tejidos epidérmicos dañados o muertos de los peces. La enfermedad es denominada “saprolegniosis”.

El compuesto más efectivo para combatir este hongo es el Verde Malaquita, sin embargo, se ha probado que es altamente dañino para la salud humana, se sabe que es un agente cancerígeno. Esta es la razón por la cual está prohibido su uso en Chile y en el mundo.

El presente proyecto propone el uso de plantas medicinales para el control y/o prevención de la saprolegniosis. Se propone el uso de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). Este contiene importantes cantidades de timol en su perfil de ácidos esenciales. El timol, entre muchas propiedades, tiene acción antifúngica.

### OBJETIVO

Validar el uso del aceite esencial de tomillo para el control y prevención de la saprolegniosis en salmonidos en centros productivos comerciales.

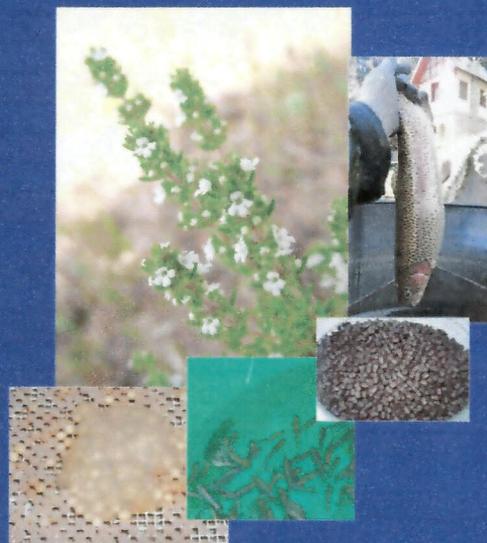
### ACTIVIDADES LOGRADAS

- ✓ Se elaboró un catastro de productores y comercializadores de aceite esencial de *Thymus vulgaris* a nivel internacional.
- ✓ Se disponen de 4 cepas de *Saprolegnia parasitica*, las cuales se han identificado, clasificado y caracterizado.
- ✓ La identificación de la cepa solicitada es *Saprolegnia parasitica* coker y su código (N.JM18629) ATCC : 200015.



### RESULTADOS A LA FECHA

1. El aceite de tomillo efectivamente tendría un efecto antifúngico.
2. Una concentración tolerable de 2 ppm de timol sería la más apropiada para ser incluida en el alimento para alevines de salmonidos.
3. Baños con 100 ppm de aceite de tomillo, resultarían efectivos como tratamiento en ovas de trucha arco iris para prevenir la formación y crecimiento de hongos.
4. Al utilizar dosis de 4 ppm de timol, para baños de alevines de trucha arco iris, no se producen mortalidades, por lo que se confirma la no toxicidad de la dosis.
5. Las concentraciones de 400 y 500 ppm de aceite esencial de tomillo resultan tóxicas para ovas de salmón Atlántico, esto probablemente porque esta especie se caracteriza por ser más frágil que los demás salmonidos.
6. Según resultados obtenidos en ovas de trucha en ECM a menor concentración de aceite esencial de tomillo, mayor es la propagación de hongo.



## **6.2 Diseño y construcción página web del proyecto.**

[www.proyectosaprolegniafia.cl](http://www.proyectosaprolegniafia.cl).

## **6.3 Lanzamiento del proyecto.**

Con fecha 22 de abril de 2005 se realizó el lanzamiento del proyecto FIA "Aplicación del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la salmonicultura", código FIA PI C 2004- 1- D -089 EN LAS Instalaciones de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Esta actividad de difusión se desarrollo con el propósito de dar inicio oficial al proyecto, FIA I-C-2004-1-D-089 dando a conocer los objetivos y parte de las actividades a realizar. Se invito tanto a empresarios del área acuícola como del ámbito agrícola, además de docentes y a la comunidad universitaria.

Dentro de los expositores del evento participaron miembros de las entidades contrapartes que participan de proyecto, tales como Luxcamp y Nutriservice.

## **6.4 Reunión con empresarios**

Se organizaron reuniones con las empresas participantes, para programar y realizar en conjunto las distintas actividades a desarrollar durante el proyecto, actividad que asegura el traspaso de los hitos del proyecto y el intercambio de información. Se visitaron las instalaciones de LUXCAMP, durante la visita se observo las plantaciones agrícolas y la planta de empaquetamiento de los productos de las agricultoras.

## **6.5 Desarrollo de Seminarios.**

Con fecha 13 de septiembre se realizó en el Hotel Los Alerces de Puerto Varas, Seminario en el marco de la culminación del proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089, "Aplicación de tomillo (*Thymus vulgaris*) en el manejo de enfermedades de la Salmonicultura" donde se entregaron los resultados finales del proyecto, reuniéndose personas del ámbito salmonicultor, agrícola Universitario entre otros.

Se invito a participar en este seminario final al Profesor Jorge Ringuélet de la Universidad de La Plata Argentina, el cual presento sus trabajos relacionados con el empleo de aceites esenciales en el control de plagas en el agro y apporto conocimientos a los participantes del Seminario relacionados en la parte agrícola.



Seminario  
**Usos de Aceites Esenciales y Plantas Medicinales  
en la Acuicultura y el Agro**

13 de Septiembre de 2007

Hotel Los Alerces, Puerto Varas - Chile

**Auspician:**

FUNDACION PARA LA INNOVACION AGRARIA. **FIA.**

**Organizan:**

Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura  
(LABCPAC), Escuela de Ciencias del Mar, PUCV.



e-mail: [info@fiasa.cl](mailto:info@fiasa.cl) Fonos: (56) (32) 274263 - 274241- 274279.  
Fax: (56) (32) 274263 - 274206

<b>Programa Seminario Proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089.</b>		
<b>13 de septiembre</b>	<b>8.45 - 9.15 hrs.</b>	Inscripciones.
	<b>9.15 – 9.45 hrs.</b>	Inauguración del seminario: "Aportes al fortalecimiento del Cluster del salmón." Gonzalo Romero Muñoz, Gerente del Cluster del Salmón.
	<b>9.45 – 10.15 hrs.</b>	"El cultivo del tomillo", Adriana Llanca Garrido y Germán Gallegos. Agrícola Luxcamp S.A.
	<b>10.15- 10.45 hrs.</b>	"Producción de aceites esenciales a partir de especies aromáticas", Jorge Ringuelet, Universidad de La Plata, Argentina.
	<b>10.45 – 11.15 hrs.</b>	Ronda de Preguntas
	<b>11.15 – 11.45 hrs.</b>	Café
	<b>11.45 – 12.15 hrs.</b>	"Uso de aceites esenciales para el control de plagas en el agro", Jorge Ringuelet, Universidad de La Plata, Argentina.
	<b>12.15- 12.45 hrs.</b>	"La saprolegniosis en la salmonicultura". Sandra Bravo, Instituto de Acuicultura; Universidad Austral de Chile
	<b>12.45 – 13.15 hrs.</b>	"Aplicación de tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) en el manejo de la saprolegniosis". Resultados Proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089. M <sup>a</sup> Isabel Toledo Donoso, Germán Olivares y Alex Manríquez, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
	<b>13.15 -13.45 hrs.</b>	Ronda de preguntas y Cierre.
	<b>14.00 hrs.</b>	Almuerzo

## **6.6 Elaboración y distribución de boletín informativo para la prensa.**

Diario El Llanquihue.

### **Aceite de Tomillo podría prevenir enfermedades de salmones**

La iniciativa está a cargo de la Fundación para la Innovación Agraria, FIA, organismo que analizará las ventajas de utilizar el aceite esencial del Tomillo en las ovas y alevines de salmónidos, con el objetivo de prevenir enfermedades contraídas por los peces.



Las cualidades medicinales del Tomillo podrían ser utilizados en la industria salmonera, para prevenir las enfermedades que afectan principalmente a las ovas y alevines, a través del aceite esencial de la hierba.

El innovador proyecto, es impulsado por la Fundación para la Innovación Agraria, FIA, del Ministerio de Agricultura, que investigará las cualidades antibacterianas y antihongos del Tomillo. "Existen antecedentes que señalan que el tomillo contiene un compuesto activo que se llama Timol, que en determinadas dosis y concentraciones, tiene propiedades antibacterianas y antihongos. Se ha comprobado en diferentes partes del mundo su efectividad y también en Chile se han realizados ensayos preliminares in vitro que permiten asegurar que efectivamente el Tomillo tiene bactericida y fungicida", sostuvo Tomás García-Huidobro, supervisor del proyecto.

La investigación, que se inició en abril de este año en la Universidad Católica de Valparaíso, se funda en otras investigaciones que han comprobado que el tomillo posee un alto poder antibacteriano, que sirve para la prevención del desarrollo de microorganismos, y que no deja rastros químicos en el organismo receptor.

Tomás García-Huidobro, señaló que "el esfuerzo apunta a validar el uso de sustancias naturales, inocuas para el ser humano y el medioambiente, que controlen las enfermedades que afectan a la industria salmonera y que no generen rastros químicos, a fin de que los ejemplares maduros no encuentren trabas comerciales cuando sean exportados. De este modo se espera contribuir al fortalecimiento tanto de la industria nacional del salmón como de la producción de hierbas medicinales chilenas".

El proyecto estará radicado en el Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, y se desarrollará

durante un poco más de tres años. En el laboratorio ya se han realizado pruebas preliminares que han registrado efectos positivos del tomillo como fungicida.

"De todas maneras, eso no es suficiente para poder elaborar un producto comercial, para concretarlo necesitamos indagar mucho más al respecto y hacer un proyecto un poco más acabado. La aplicación en acuicultura puede ser utilizada durante todo el cultivo, principalmente su uso va orientado en la fase inicial, cuando se están incubando las ovas, hay altas probabilidades que proliferen hongos y contaminen los huevos y los destruya", dijo García-Huidobro.

### **Diario La Nación**

Fuente: Diario La Nación:

Las propiedades medicinales del tomillo podrían encontrar una nueva aplicación en la industria salmonera, gracias a un proyecto que impulsa la Fundación para la Innovación Agraria del Ministerio de Agricultura ((FIA), y la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, que investigará de qué manera se podrían controlar ciertas enfermedades que afectan a las ovas y alevines de salmones mediante el aceite esencial de la hierba.

La investigación, que se inicia este mes en la Universidad porteña, se funda en otras investigaciones que han comprobado que el tomillo posee un alto poder antibacteriano, que sirve para la prevención del desarrollo de microorganismos, y que no deja rastros químicos en el organismo receptor.

El esfuerzo de este proyecto apunta a validar el uso de sustancias naturales, inocuas para el ser humano y el medioambiente, que controlen las enfermedades que afectan a la industria salmonera sin dejar rastros químicos, a fin de que los ejemplares maduros no encuentren trabas comerciales cuando sean exportados. Se espera así contribuir al fortalecimiento tanto de la industria nacional del salmón como de la producción de hierbas medicinales chilenas.

El proyecto, presentado oficialmente ayer en el salón Obispo Emilio Tagle, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, será desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura de la Escuela de Ciencias del Mar de la citada casa de estudios, durante un periodo de tres años.

Por lo pronto, ya se han realizado pruebas preliminares que han registrado efectos positivos del tomillo como fungicida.

La investigación desarrollará pruebas piloto en las regiones V, VII, X y contará con la colaboración de empresas como Cetecsal, Luxcamp y Nutriservice, además del Laboratorio LABCPAC, de la misma universidad. En conjunto estas empresas, se definirán las concentraciones con efecto preventivo y/o curativo de aceite esencial de tomillo sobre el hongo *Saprolegnia* en las etapas de ova y alevines de los peces.

Isabel Reveco, Jefa de Estudios y Proyectos de FIA, comenta que "es importante el avance logrado en el rubro de plantas medicinales. Hace seis ó siete años partimos con respaldar la incorporación de todas las exigencias de la parte productiva, para llegar hoy a la fase de darle mayor valor agregado a los productos, como el caso del Salmón, que es lo que nos va a permitir diversificar la producción nacional y mejorar la competitividad de todos quienes dependen de este mercado".

### ***Enfermedad del salmón***

La enfermedad *saprolegniosis* es una de las más frecuentes en los salmones. Se origina por la proliferación de un hongo altamente invasivo, del género *Saprolegnia*, que ocupa tejidos epidérmicos dañados o muertos de los peces.

El compuesto más efectivo para combatir este hongo es el verde malaquita, comprobado agente cancerígeno prohibido en Chile, Estados Unidos y Europa.

La detección de esta sustancia genera el inmediato rechazo de los mercados compradores, que demandan productos sin trazas químicas.

Por ello, los investigadores explican que resulta fundamental buscar productos alternativos al verde malaquita que no sean contaminantes y favorezcan la producción limpia, debido a que al utilizar un producto natural se disminuye el riesgo de barreras para-arancelarias por parte de los países importadores en relación al uso de sustancias químicas en el manejo de los cultivos de salmónidos.

Además de validar el uso del aceite esencial de tomillo para el control o prevención de la *saprolegniosis* en los salmones mediante el uso de baños, el proyecto también investigará si el tomillo puede suministrarse a través de su alimentación, mediante el desarrollo de dietas que contengan aceite esencial de la hierba.

Actualmente, la presencia del hongo saprolegnia sp se presenta en la mayoría de los centros de cultivo del salmón y constituye una de las grandes preocupaciones del sector en la etapa del cultivo de agua dulce, debido a las pérdidas económicas que causa, y que pueden llegar al 50% de la población.

El verde malaquita fue durante un tiempo el fungicida químico más utilizado en los cultivos dulceacuícolas de peces para la prevención y tratamiento de hongos, hasta que se comprobó su acción cancerígena sobre la salud humana.

### ***Bondades del tomillo***

Globalmente, el tomillo se emplea en el campo de la medicina como un eficaz tónico que fortalece el sistema inmunitario, actuando de manera eficiente para mitigar episodios de bronquitis, tos y asma. También es aplicado en inhaladores antisépticos, inflamación de encías y emulsiones para quemaduras solares.

Otros de los productos que contienen tomillo, son utilizados para realizar tratamientos de aromaterapia y varios productos alimenticios, tales como sopas deshidratadas, conservas, aceites y vinagres.

En Chile, esta singular hierba medicinal se emplea desde hace siglos atrás, siendo cultivada casi por tradición en jardines y huertas especialmente de la zona sur. Algunos usos populares lo recomiendan para el estómago (atonía), contra dolores de cabeza, en casos de reumatismo (en baños) y gota.

Dado que su esencia es altamente irritante, no es aconsejable aplicar dosis concentradas si hay heridas abiertas. Su característica es amarga, astringente, tónica y estimulante, siendo utilizado con regularidad como condimento casero.

### **El Mercurio**

Salmones estarán de fiesta

Proyecto analizará ventajas de aplicar aceites esenciales del tomillo en las ovas y alevines de estos peces.



El verde malaquita fue durante un tiempo el fungicida químico más utilizado en los cultivos dulceacuícolas de peces para la prevención de hongos.

### **Patologías**

La enfermedad "*saprolegniosis*" es una de las más frecuentes en los salmones. Se origina por la proliferación de un hongo altamente invasivo, del género *Saprolegnia*, que ocupa tejidos epidérmicos dañados o muertos de los peces.

El compuesto más efectivo para combatir este hongo es el verde malaquita, comprobado agente cancerígeno prohibido en Chile, Estados Unidos y Europa.

La detección de esta sustancia genera el inmediato rechazo de los mercados compradores, que demandan productos sin trazas químicas.

Por ello, los investigadores explican que resulta fundamental buscar productos alternativos al verde malaquita que no sean contaminantes y que favorezcan la producción limpia. "Al utilizar un producto natural se disminuye el riesgo de barreras para-arancelarias por parte de los países importadores en relación al uso de sustancias químicas en el manejo de los cultivos de salmónidos. Contribuimos así, en alguna medida, a la denominada "acuicultura sustentable" indica Tomás García-Huidobro de FIA.

Las propiedades medicinales del tomillo podrían encontrar una nueva aplicación en la industria salmonera, gracias a un proyecto que impulsa la Fundación para la Innovación Agraria, del Ministerio de Agricultura, y que investigará de qué manera se podrían controlar ciertas enfermedades que afectan a las ovas y alevines de salmones mediante el aceite esencial de la hierba.

La investigación, que se inicia este mes en la Universidad Católica de Valparaíso, se funda en otras investigaciones que han comprobado que el tomillo posee un alto poder antibacteriano, que sirve para la prevención del desarrollo de microorganismos, y que no deja rastros químicos en el organismo receptor.

### **Sustancias Inocuas**

Tomás García-Huidobro, supervisor de la entidad, explica que "el esfuerzo apunta a validar el uso de sustancias naturales, inocuas para el ser humano y el medioambiente, que controlen las enfermedades que afectan a la industria salmonera y que no generen rastros químicos, a fin de que los ejemplares maduros no encuentren trabas comerciales

cuando sean exportados. De este modo se espera contribuir al fortalecimiento tanto de la industria nacional del salmón como de la producción de hierbas medicinales chilenas".

El proyecto estará radicado en el Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura de la Escuela de Ciencias del Mar de la P.UCV, y se desarrollará durante un poco más de tres años. En el laboratorio ya se han realizado pruebas preliminares que han registrado efectos positivos del tomillo como fungicida.

### ***Pruebas Piloto***

La investigación desarrollará pruebas piloto en las regiones V, VII, X y contará con la colaboración de empresas como Cetecsal, Luxcamp y Nutriservice, además del Laboratorio LABCPAC, de la misma universidad. En conjunto con las empresas, se definirán las concentraciones con efecto preventivo y/o curativo de aceite esencial de tomillo sobre el hongo *Saprolegnia* en las etapas de ova y alevines de los peces.

Además de validar el uso del aceite esencial de tomillo para el control o prevención de la saprolegniosis en los salmones mediante el uso de baños, el proyecto de FIA también investigará si el tomillo puede suministrarse a través de su alimentación, mediante el desarrollo de dietas que contengan aceite esencia de la hierba.

Actualmente la presencia del hongo *saprolegnia* sp. se presenta en la mayoría de los centros de cultivo del salmón y constituye una de las grandes preocupaciones del sector en la etapa del cultivo de agua dulce, debido a las pérdidas económicas que causa, y que pueden llegar al 50% de la población.

El lanzamiento del proyecto será este viernes 22 de abril, con la presencia del Rector del plantel, Alfonso Muga, y ejecutivos de FIA, y tendrá lugar a contar de las 11:30 hrs. en el salón Obispo Emilio Tagle, de la PUC de Valparaíso, ubicado en Brasil 2950 de Valparaíso.

### ***AQUA NOTICIAS***

#### **En Chile prueban hierba medicinal para evitar hongos en salmónidos**

Noticia publicada el 28/04/2005.

Un proyecto de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), perteneciente al Ministerio de Agricultura, analizará las ventajas de

aplicar aceites esenciales de tomillo en alevines de salmónidos con el fin de prevenir la aparición de la enfermedad saprolegniosis. Los investigadores aseguran que el tomillo podría ser un sustituto a sustancias dañinas, como por ejemplo, el verde malaquita.

La investigación se inició en la Universidad Católica de Valparaíso y nació como fruto de otras investigaciones que habían comprobado que el tomillo tiene un alto poder antibacteriano, de acuerdo con una noticia publicada hoy por Intrafish.

Según expresó Tomás García-Huidobro, responsable del estudio, “el esfuerzo apunta a validar el uso de sustancias naturales, inocuas para el ser humano y el medioambiente, que controlen las enfermedades que afectan a la industria salmonicultura y que no generen rastros químicos, a fin de que los ejemplares maduros no encuentren trabas comerciales cuando sean exportados. De este modo, se espera contribuir al fortalecimiento tanto de la industria nacional del salmón como de la producción de hierbas medicinales chilenas”.

El proyecto se está desarrollando en el Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura de la Escuela de Ciencias del Mar de la Universidad Católica de Valparaíso y tendrá una duración de tres años.

#### Contra Saprolegnia

La FIA informó a través de su página web que ya se han realizado en el laboratorio pruebas preliminares que han registrado efectos positivos del tomillo como funguicida en salmones. La hierba se utilizaría específicamente en el tratamiento de la enfermedad saprolegniosis que es una de las más frecuentes en los salmones que se origina por la proliferación de un hongo altamente invasivo, del género *Saprolegnia*, y que ocupa tejidos epidérmicos dañados o muertos de los peces.

Además de validar el uso del aceite esencial de tomillo para el control o prevención de la saprolegniosis en los salmones mediante el uso de baños, el proyecto de FIA también investigará si el tomillo puede suministrarse a través de la alimentación, mediante el desarrollo de dietas que contengan aceite esencial de la hierba.

Contra verde malaquita El compuesto más efectivo para combatir este hongo era el verde malaquita, comprobado agente cancerígeno cuyo uso fue hace algún tiempo prohibido en Chile, Estados Unidos y Europa.

La detección de esta sustancia genera el inmediato rechazo de los mercados compradores, que demandan productos sin trazas químicas. Es por ello que era de vital importancia contar con otras sustancias alternativas que cumplieran la misma función pero que no sean contaminantes y que favorezcan la producción limpia.

“Al utilizar un producto natural se disminuye el riesgo de barreras parancelarias por parte de los países importadores en relación al uso de sustancias químicas en el manejo de los cultivos de salmónidos. Contribuimos así, en alguna medida, a la denominada “acuicultura sustentable” indicó Tomás García–Huidobro de FIA.

Actualmente la presencia del hongo saprolegnia sp. se presenta en la mayoría de los centros de cultivo del salmón y constituye una de las grandes preocupaciones del sector en la etapa del cultivo de agua dulce, debido a las pérdidas económicas que causa, y que pueden llegar al 50% de la población.

La investigación desarrollará pruebas piloto en las regiones V, VII, X y contará con la colaboración de empresas como el Centro Tecnológico del Salmón (Cetecsal), Luxcamp y Nutriservice, además del Laboratorio LABCPAC, de la misma universidad.

En conjunto con las empresas, se definirán las concentraciones con efecto preventivo y/o curativo de aceite esencial de tomillo sobre el hongo Saprolegnia en las etapas de ova y alevines de los peces.

### **Cidere Bio-Bio**

[www.ciderebiobio.cl](http://www.ciderebiobio.cl)

Tomillo Para salmones

Las propiedades medicinales del tomillo podrían encontrar una nueva aplicación en la industria salmonera, gracias a un proyecto que impulsa la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) que investigará de qué manera se podría controlar ciertas enfermedades que afectan a las ovas y alevines de salmones mediante el aceite esencial de la hierba. La investigación, que se inicia este mes en la Universidad Católica de Valparaíso, se funda en otras investigaciones que han comprobado que el tomillo posee un alto poder antibacteriano, que sirve para la prevención del desarrollo de microorganismos, y que no deja rastros químicos en el organismo receptor.

## 6.7 Elaboración de manual.

El manual esta en etapa de edición, definición de diseño y colores, corrección de maqueta.

## 6.8 Participación en Congreso-seminario Multisectorial.

Con fecha 25 de octubre al 27 de octubre 2006 se participó en la VII Jornadas de Salmonicultura donde se difundió los resultados del proyecto mediante reuniones con los participantes y empresarios del rubro acuícola, se tiene un stand donde se entrega material acerca del proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089.

Las actividades realizadas fueron las siguientes:

Previo a la asistencia a la Jornada de salmonicultura:

- Diseño y confección de díptico con la información del proyecto.
- Recolección de material de difusión del proyecto y de FIA para ser entregado en la Jornada de Salmonicultura.

25 de Octubre 2006.

- Traslado de materiales de difusión.
- Viaje Valparaíso – Santiago - Pto. Montt – Puerto Varas.
- Preparación de stand con material del proyecto y de FIA.
- Instalación de pendón del proyecto y pendón FIA.
- Participación de la inauguración oficial de las VII Jornadas de Salmonicultura.

26 de Octubre 2006

- Coordinación y Distribución de material del proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089 y de la Fundación para la Innovación Agraria en el stand de la Escuela Ciencias del Mar.
- Asistencia y participación de Charlas.
- Difusión del proyecto mediante conversaciones técnicas con los asistentes a las Jornadas de Salmonicultura.

27 de octubre 2006

- Distribución de material del proyecto FIA-PI-C-2004-1-D-089 y de la Fundación para la Innovación Agraria en el stand de la Escuela Ciencias del Mar.
- Asistencia y participación de Charlas.
- Difusión del proyecto mediante conversaciones con participantes y expositores.

- Se desmontó stand y pendones del proyecto.
- Asistencia a la clausura de las VII Jornadas de Salmonicultura.

28 de octubre 2006

- Puerto Varas - Pto. Montt– Santiago –Valparaíso.

## FERIA AGRISAL 2006

Con fecha 5 de diciembre se asistió a Feria Agrisal, se presentó un póster y se realizaron reuniones para difundir los resultados a la fecha

Las actividades realizadas fueron las siguientes:

Previo a la asistencia a Agrisal 2006:

- Diseño y confección póster con resultados parciales
- Preparación de material de difusión del proyecto para ser presentado en Agrisal 2006.

4 de diciembre 2006.

- Viaje Valparaíso – Santiago - Pto. Montt – Puerto Varas.
- Preparación de stand con material del proyecto.
- Instalación póster del proyecto

5 de diciembre 2006.

- Asistencia y participación a seminario Agrisal 2006.
- Difusión del proyecto mediante conversaciones técnicas con los asistentes a la Agrisal 2006.
- Puerto Varas - Pto. Montt– Santiago –Valparaíso





## 7.2 CALENDARIO REAL

Nombre de tarea	Comienzo	Fin	M A M J J A S O N D E F M A M J														
			M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M
Aplicación del tomillo <i>Thymus vulgaris</i> en el manejo de enfermedades de la salmonicultura	mar 15-03-05	mar 15-05-07	■														
Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo	mar 15-03-05	jue 30-06-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>A. AREA DE GESTION Y DESARROLLO</b>	lun 13-12-04	lun 13-12-04															
1 Evento apertura del Proyecto	mar 25-01-05	mar 25-01-05															
2 Contrataciones y adquisiciones	lun 27-12-04	lun 14-05-07	■														
Contrataciones y adquisiciones	lun 27-12-04	lun 14-05-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3 Administración financiera Contable	jue 13-01-05	lun 14-05-07	■														
Administración Financiera Contable	jue 13-01-05	lun 14-05-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4 Reunión Coordinación Investigación	lun 10-01-05	lun 16-04-07	■														
5 Reunión Coordinación Investigación	lun 13-12-04	lun 14-05-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6 Entrega de Informe Final	mar 15-05-07	mar 15-05-07															
<b>B. AREA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO</b>	lun 13-12-04	lun 13-12-04															
<b>1.1 Obtención y purificación de cepas.</b>	mar 15-03-05	lun 16-05-05															
1.1.1 Recolección de muestras de saprolegnia en centro de cultivo	mar 15-03-05	lun 11-04-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1.1.2 Cultivo de cepas	lun 21-03-05	vie 15-04-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1.1.3 Purificación de cepas	mié 30-03-05	mié 20-04-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1.1.4 Clasificación e identificación de hongos	jue 21-04-05	lun 16-05-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Res. 1.1 Cepas caracterizadas y definidas de saprolegnia para el estudio</i>	mié 20-04-05	mié 20-04-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>1.2 Determinación de la actividad antifúngica Preventiva.</b>	lun 16-05-05	mié 15-06-05															
1.2.1 Catastro Adquisición de productos en base a aceite esencial de tomillo a nivel nacional	lun 16-05-05	lun 30-05-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1.2.2 Análisis químico de aceites esenciales.	vie 20-05-05	lun 06-06-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1.2.3 Evaluación distintas concentraciones de aceite esencial	lun 06-06-05	mié 15-06-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Res. 1.2 Actividad antifungica preventiva evaluada para reducir la mortalidad observada</i>	lun 20-06-05	lun 20-06-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>1.3 Determinación de la actividad antifúngica Curativa.</b>	mié 15-06-05	jue 30-06-05															
<i>Res 1.3 Determinación de la actividad antifungica Curativa</i>	lun 20-06-05	lun 20-06-05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■



<b>4 Realizar pruebas a escala piloto para validar los resultados obtenidos en los objetivos :</b>	<b>lun 02-10-06</b>	<b>jue 28-12-06</b>	
<b>4.1 Ensayo en truchas en Río Blanco</b>	<b>lun 02-10-06</b>	<b>jue 28-12-06</b>	
4.1.2 Tratamiento preventivo y/o curativo por baños	lun 02-10-06	jue 28-12-06	
<b>Res. 4.1 Aceite esencial de tomillo validado para su uso en trucha, en tratamientos preve</b>	lun 13-12-04	lun 13-12-04	
<b>4.3 Ensayos en salmón coho</b>	<b>lun 02-10-06</b>	<b>jue 28-12-06</b>	
4.3.1 Tratamiento curativo y/o preventivo con alimento	lun 02-10-06	jue 28-12-06	
4.3.2 Tratamiento preventivo y/o curativo con baños	mié 01-11-06	mié 27-12-06	
<b>Res. 4.3 Aceite esencial de tomillo validado para su uso en ovas de salmón coho, en trata.</b>	vie 19-01-07	vie 19-01-07	
<b>4.4 Estudio del riesgo asociado a la eliminación de altas dosis de aceite esencial de tomil</b>	<b>jue 02-11-06</b>	<b>jue 30-11-06</b>	
<b>Res. 4.4 Efecto evaluado del a.e. De tomillo en el agua</b>	jue 30-11-06	jue 30-11-06	
<b>C. AREA DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA</b>	lun 13-12-04	lun 13-12-04	
<b>6 Difundir los resultados al sector acuícola.</b>	<b>dom 05-11-06</b>	<b>mar 15-05-07</b>	
<b>6.4 Transferencia del Proyecto</b>	<b>lun 15-01-07</b>	<b>mar 20-03-07</b>	
6.4.1 Transferencia de los resultados al sector acuícola: Seminario	lun 15-01-07	lun 15-01-07	
6.4.2 Transferencia de los resultados al sector acuícola: prensa	sáb 20-01-07	mar 20-03-07	
6.5 Preparación de Documento para Publicación en revista científica	dom 05-11-06	mar 05-12-06	
6.6 Elaboración manual	mar 02-01-07	vie 30-03-07	
6.7 Seminario Multisectorial	mié 04-04-07	mié 04-04-07	
Preparación y Entrega informe final	jue 01-03-07	mar 15-05-07	



## 8. CUADRO DE COSTOS

### 8.1. Costo total de proyectos propuesto.

ITEM	COSTO TOTAL	FINANCIAMIENTO	
		AGENTE POSTULANTE	FIA
1. RECURSOS HUMANOS	49.840.600	20.314.000	29.526.600
2.3.EQUIPAMIENTO e INFRAESTRUCTURA	69.160.000	69.160.000	0
4.MOVILIZACIÓN, VIÁTICOS y COMBUSTIBLE	19.563.200	4.366.000	15.197.200
5. MATERIALES e INSUMOS	14.365.000	1.925.000	12.440.000
6. SERVICIOS A TERCEROS	15.750.000	2.100.000	13.650.000
7.DIFUSIÓN	11.270.000	2.280.000	8.990.000
8. GASTOS GENERALES	11.579.100	5.227.300	6.351.800
9. IMPREVISTOS	2.600.000	0	2.600.000
<b>TOTAL</b>	<b>194.127.900</b>	<b>105.372.300</b>	<b>88.755.600</b>
PORCENTAJE	100%	54.28%	45.72%

### 8.2. Costo total del proyecto efectivo.

ITEM	COSTO TOTAL	FINANCIAMIENTO	
		AGENTE POSTULANTE	FIA
1. RECURSOS HUMANOS	50.190.600	20.314.000	29.876.600
2.3.EQUIPAMIENTO e INFRAESTRUCTURA	69.160.000	69.160.000	0
4. MOVILIZACIÓN, VIÁTICOS y COMBUSTIBLE	19.563.200	4.366.000	15.197.200
5. MATERIALES e INSUMOS	15.223.000	1.925.000	12.298.000
6. SERVICIOS A TERCEROS	15.750.000	2.100.000	13.650.000
7.DIFUSIÓN	11.270.000	2.280.000	8.990.000
8. GASTOS GENERALES	11.579.100	5.227.300	6.351.800
<b>9 IMPREVISTOS</b>	<b>2.600.000</b>	<b>0</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>195.335.900</b>	<b>105.372.300</b>	<b>89.963.600</b>
PORCENTAJE	100%	54%	46%

## 9. CONCLUSIONES EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

1. *Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo y/o curativo para distintas cepas de saprolegnia.*

Se concluye que el aceite esencial de tomillo es efectivo para inhibir el crecimiento de Saprolegnia en placas. Las concentraciones y tiempo de aplicación dependen en cierto modo de las cepas. De las 4 cepas estudiadas la cepa de la Piscicultura de Río Blanco resultó ser la más resistente, por lo cual fue escogida para realizar todas las pruebas, se logro inhibición de crecimiento en concentraciones de 200 ppm a los 90 min. Mientras que en las cepas obtenidas de la zona sur, se logró inhibir el crecimiento a los 60 min en concentraciones de 150 a 200 ppm. De lo anterior se concluye que es preciso ajustar las dosis de tratamiento según el lugar geográfico en el cual se aplique el tratamiento.

2. *Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.*

- Ovas

Se determinó que ovas sometidas a baños a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200 ppm de aceite esencial por 3 horas, se obtiene un 90% sobrevivencia. Por lo que se concluye que la tolerancia en ovas es de 200 ppm en baños de 3 horas.

En pruebas con concentraciones entre los 300 ppm hasta 1000 ppm ovas expuestas por una hora, se obtiene el 100% de sobrevivencia de ovas solo a concentraciones de 600 ppm. Se concluye que a mayores concentraciones la tolerancia disminuye a baños de una hora a 600 ppm.

A mayores concentraciones el tiempo de exposición disminuye y aumenta la mortalidad.

- Alevines

De las experiencias realizadas con concentraciones entre 10 a 50, es posible utilizar baños de aceite esencial de tomillo a una concentración de 10 ppm por 24 horas, obteniendo un 100% de viabilidad, puesto que en todo momento los alevines mostraron nado normal.

Baños por una hora a concentraciones de 20, 30 y 40 ppm, son viables de aplicar ya que es posible recuperar parte de los alevines si luego son traspasados a agua fresca. Los alevines pueden tolerar concentraciones más altas, 100 y 150 ppm, por 10 a 30 minutos, posteriormente todos los alevines mueren en ambas concentraciones.

Los alevines resultan ser menos resistentes a altas concentraciones de aceite esencial de tomillo que las ovas, las que por lo general toleran mayores concentraciones en igual o más tiempo.

**3 Determinar las concentraciones de aceite esencial de tomillo adecuadas para tratamientos preventivo y/o curativo de la saprolegniosis en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento, en laboratorio.**

- Ovas

Baños con 100 ppm de aceite de tomillo, resultarían efectivos como tratamiento en ovas de trucha arco iris para prevenir la formación y crecimiento de hongos.

Es posible la utilización de 200 ppm de aceite de tomillo para el tratamiento curativo de ovas con ojos de trucha arco iris infectadas con *Saprolegnia sp*, ya que la mortalidad es aceptable comparada con el tratamiento control y los demás tratamientos con tomillo.

Para prevenir el desarrollo de *Saprolegnia* tanto en etapa de ova verde y de ojo de trucha arco iris, es posible utilizar baños de aceite de tomillo a una concentración de 400 ppm por 30 min cada 48 hrs.

Las concentraciones de 400 y 500 ppm de aceite esencial de tomillo resultan tóxicas para ovas de salmón Atlántico, esto probablemente porque esta especie se caracteriza por ser más frágil que los demás salmónidos.

- Alevines

De acuerdo a los resultados obtenidos en el tratamiento por baños preventivos y/o curativos en alevines de trucha arco iris, la concentración de 4 ppm de timol permitiría una menor propagación de *saprolegnia*. Por consiguiente, utilizar dosis de 4 ppm de timol para baños de alevines de trucha arco iris, no se producen mortalidades, por lo que se confirma la no toxicidad de la dosis.

- Alimento

El alimento con aceite esencial que presenta la mejor tolerancia y palatabilidad por parte de los peces es aquél que posee 2 ppm de timol en la mezcla.

Según los resultados obtenidos, el alimento que permitiría un mejor control curativo sobre *saprolegnia* en alevines de trucha arco iris sería aquél con 2 ppm de timol. Por lo tanto una concentración tolerable de 2 ppm de timol sería la más apropiada para ser incluida en el alimento para alevines de salmónidos.

Como conclusión final, es posible la utilización de aceite esencial de tomillo como control natural de la *saprolegniosis* en salmónidos. Sin embargo, esta utilización dependerá del tiempo al cual se expongan ovas y peces y la concentración utilizada.

#### 4. Estudio del riesgo asociado a la eliminación de altas dosis de aceite esencial de tomillo al medio.

Desde el punto de vista ambiental la aplicación de tratamientos contra la saprolegniosis con aceites de tomillo no tendrían impacto en el medio, por su alta volatilidad y baja capacidad de residencia.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Catastro de proveedores de aceite esencial de tomillo.

Producto	Productor o vendedor	País	Precio	www.	e-mail
A.E.T	Health Leads	España	€5.17 (10 ml)	<a href="http://www.healthleadsuk.com">www.healthleadsuk.com</a>	<a href="mailto:dani@healthleadsuk.com">dani@healthleadsuk.com</a>
A.E.T	Botica Francesa	Perú		<a href="http://www.boticafrancesa.com">www.boticafrancesa.com</a>	<a href="mailto:info@boticafrancesa.com">info@boticafrancesa.com</a>
A.E.T	Cedrosa	México		<a href="http://www.cedrosa.com.mx">www.cedrosa.com.mx</a>	<a href="mailto:info@cedrosa.com.mx">info@cedrosa.com.mx</a>
A.E.T	Ecobotiga	España	€12 (10 ml)	<a href="http://www.ecobotiga.com">www.ecobotiga.com</a>	<a href="mailto:info@egobotiga.com">info@egobotiga.com</a>
A.E.T	Health Leads	UK	£3.6 (10ml)	<a href="http://www.healthleadsuk.com">www.healthleadsuk.com</a>	<a href="mailto:dani@healthleadsuk.com">dani@healthleadsuk.com</a>
A.E.T Rojo	Red Safari	Canadá	US\$ 26.95(0.12 Kg)	<a href="http://www.Zooscape.com">www.Zooscape.com</a>	<a href="mailto:Help@ZooScape.com">Help@ZooScape.com</a>
A.E.T Blanco	Red Safari	Canadá	US\$ 26.95(0.12 Kg)	<a href="http://www.Zooscape.com">www.Zooscape.com</a>	<a href="mailto:Help@ZooScape.com">Help@ZooScape.com</a>
A.E.T.	Bulgarian Pharmaceutical Group Ltd.	Bulgaria	\$198 Kg	<a href="http://www.Bpg.bg">www.Bpg.bg</a>	s/i
A.E.T	Esoteric Oils (Pty) Ltd	SudAfrica	\$8.75 (10 ml)	<a href="http://www.essentialoils.co.za">www.essentialoils.co.za</a>	<a href="mailto:info@essentialoils.co.za">info@essentialoils.co.za</a>
A.E.T	Productores y vendedores	India		<a href="http://www.Indianindustry.com">www.Indianindustry.com</a>	
A.E.T	Global Herbal Supplies	Australia	US\$184.5( 200 ml)	<a href="http://www.globalherbalsupplies.com">www.globalherbalsupplies.com</a>	<a href="mailto:health@globalherbalsupplies.com">health@globalherbalsupplies.com</a>
A.E.T	FLAVEX Naturextrakte GMBH	Alemania		<a href="http://www.flavex.com">www.flavex.com</a>	<a href="mailto:info@flavex.com">info@flavex.com</a>
A.E.T	Geobell AG	Suiza		<a href="http://www.geobell.ch">www.geobell.ch</a>	<a href="mailto:geobell@geobell.ch">geobell@geobell.ch</a>
A.E.T	VOGELE	Dinamarca		<a href="http://www.voegele-lauffen.de">www.voegele-lauffen.de</a>	<a href="mailto:essential.oils@voegele-lauffen.de">essential.oils@voegele-lauffen.de</a>
A.E.T	Biomedica, spol. s r.o.	República		<a href="http://www.biomedica-prague.cz">http://www.biomedica-prague.cz</a>	
A.E.T	Vitamin Usa	USA	US\$7.99 (10 OZ)	<a href="http://www.vitaminusa.com/thymesoil1oz.html">www.vitaminusa.com/thymesoil1oz.html</a>	<a href="mailto:VitaminUSA@VitaminUSA.com">VitaminUSA@VitaminUSA.com</a>
A.E.T	The Crystal Garden	USA	US\$11 (5 ml)	<a href="http://www.thecrystalgarden.com">www.thecrystalgarden.com</a>	<a href="mailto:info@thecrystalgarden.com">info@thecrystalgarden.com</a>

**( Cont) ANEXO 1: Catastro de proveedores de aceite esencial de tomillo.**

A.E.T		Austria			<a href="mailto:ashokajain@aon.at">ashokajain@aon.at</a>
A.E.T	Green Tech S.A	Francia		<a href="http://www.greentech.fr">www.greentech.fr</a>	<a href="mailto:greentech@wanadoo.fr">greentech@wanadoo.fr</a>
A.E.T	Mehul Chemicals Industries	India		<a href="http://www.mehulchem.com">www.mehulchem.com</a>	<a href="mailto:response@mehulchem.com">response@mehulchem.com</a>
A.E.T (Rojo y blanco)	Frutarom (UK) Ltd	UK		<a href="http://www.frutarom.com">www.frutarom.com</a>	
A.E.T	Essencia, Aetherische Oele AG	Suiza		<a href="http://www.essencia.ch">www.essencia.ch</a>	<a href="mailto:info@essencia.ch">info@essencia.ch</a>
A.E.T	Florame	Francia	€8.5 (5 ML)	<a href="http://www.florame.com">www.florame.com</a>	<a href="mailto:florame@florame.com">florame@florame.com</a> < <a href="mailto:florame@florame.com">florame@florame.com</a> >
A.E.T	Science Lab	U.S.A	US\$178.74 (500 ml)	<a href="http://www.sciencelab.com">www.sciencelab.com</a>	<a href="mailto:orders@sciencelab.com">orders@sciencelab.com</a>
A.E.T	Jade Oils	UK	£4.94(32 ml)	<a href="http://www.jadeoils.com">www.jadeoils.com</a>	<a href="mailto:avril@jadeoils.demon.co.uk">avril@jadeoils.demon.co.uk</a>
A.E.T	Sigma Aldrich Co.	USA	\$US 202.4 (1 Kg)	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>	<a href="mailto:sarquote@sial.com">sarquote@sial.com</a>
A.E.T	Loaves and Fishing		\$US 10.4 (0.5 oz)		<a href="mailto:karma@loaves-n-fishes.com">karma@loaves-n-fishes.com</a>
A.E.T	Marlin Chemical Products	Mexico		<a href="http://www.marlin-chemicals.com.mx">www.marlin-chemicals.com.mx</a>	Contacto en página web
A.E.T	Manuel Riesgo S.A	España		<a href="http://www.manuelriesgo.com">www.manuelriesgo.com</a>	<a href="mailto:pedidos@manuelriesgo.com">pedidos@manuelriesgo.com</a>

## ANEXO 2 Análisis Químicos aceite esencial

### - Cromatogramas de CG – MS

- **Registro - 1:** Se muestran los perfiles cromatográficos de las tres muestras:

- ✓ Cromatograma inferior corresponde al perfil de la muestra TOM – FLA. CO<sub>2</sub> - SE-RO. Se muestra la identificación de **Timol** (peak a 27,838 minutos) y **Carvacrol** (peak a 28,038 minutos).
- ✓ Cromatograma central corresponde al perfil de la muestra TOM – AM. AROM - BL. Se muestra la identificación de **Timol** (peak a 27,853 minutos) y **Carvacrol** (peak a 28,053 minutos).
- ✓ Cromatograma superior corresponde al perfil de la muestra TOM – LUX. NAT - BL. Se muestra la identificación de **Timol** (peak a 27,803 minutos) y **Carvacrol** (peak a 28,020 minutos).

- **Espectros de masas de los peaks identificados según se muestra en el registro – 1, comparados con espectros de compuestos estándares que están incluidos en la biblioteca del equipo:**

- **Registro - 2:** Espectro inferior corresponde a peak de la muestra TOM – LUX. NAT – BL del peak a 27,803 minutos. Espectro superior corresponde a estándar de timol.

- **Registro – 3:** Espectro inferior corresponde a peak de la muestra TOM – LUX. NAT – BL del peak a 28,020 minutos. Espectro superior corresponde a estándar de carvacrol.

- **Registro – 4:** Espectro inferior corresponde a peak de la muestra TOM – AM. AROM - BL del peak a 27,853 minutos. Espectro superior corresponde a estándar de timol.

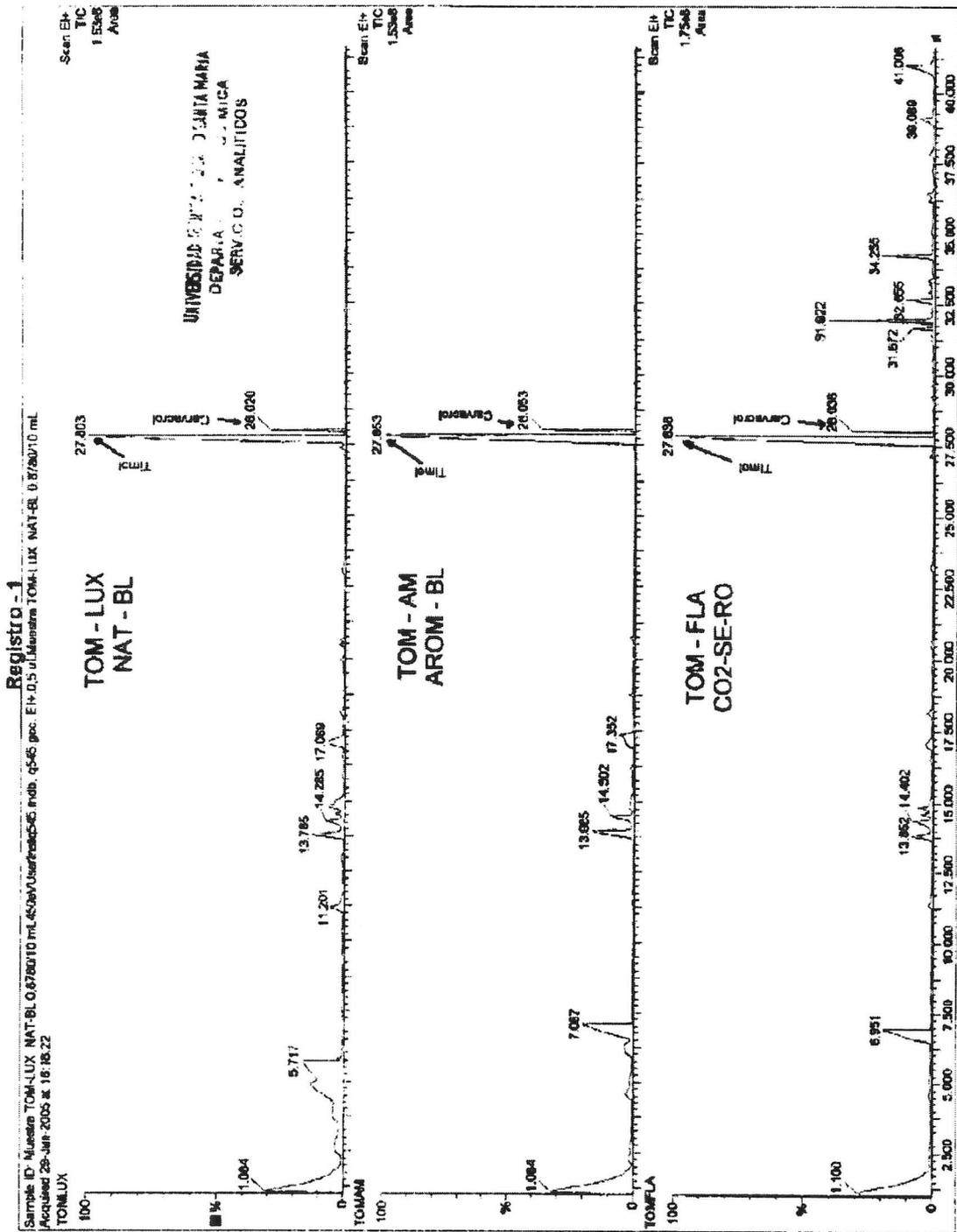
- **Registro – 5:** Espectro inferior corresponde a peak de la muestra TOM – AM. AROM - BL del peak a 28,053 minutos. Espectro superior corresponde a estándar de carvacrol.

- **Registro – 6:** Espectro inferior corresponde a peak de la muestra TOM – FLA. CO<sub>2</sub>-SE-RO del peak a 27,838 minutos. Espectro superior corresponde a estándar de timol.

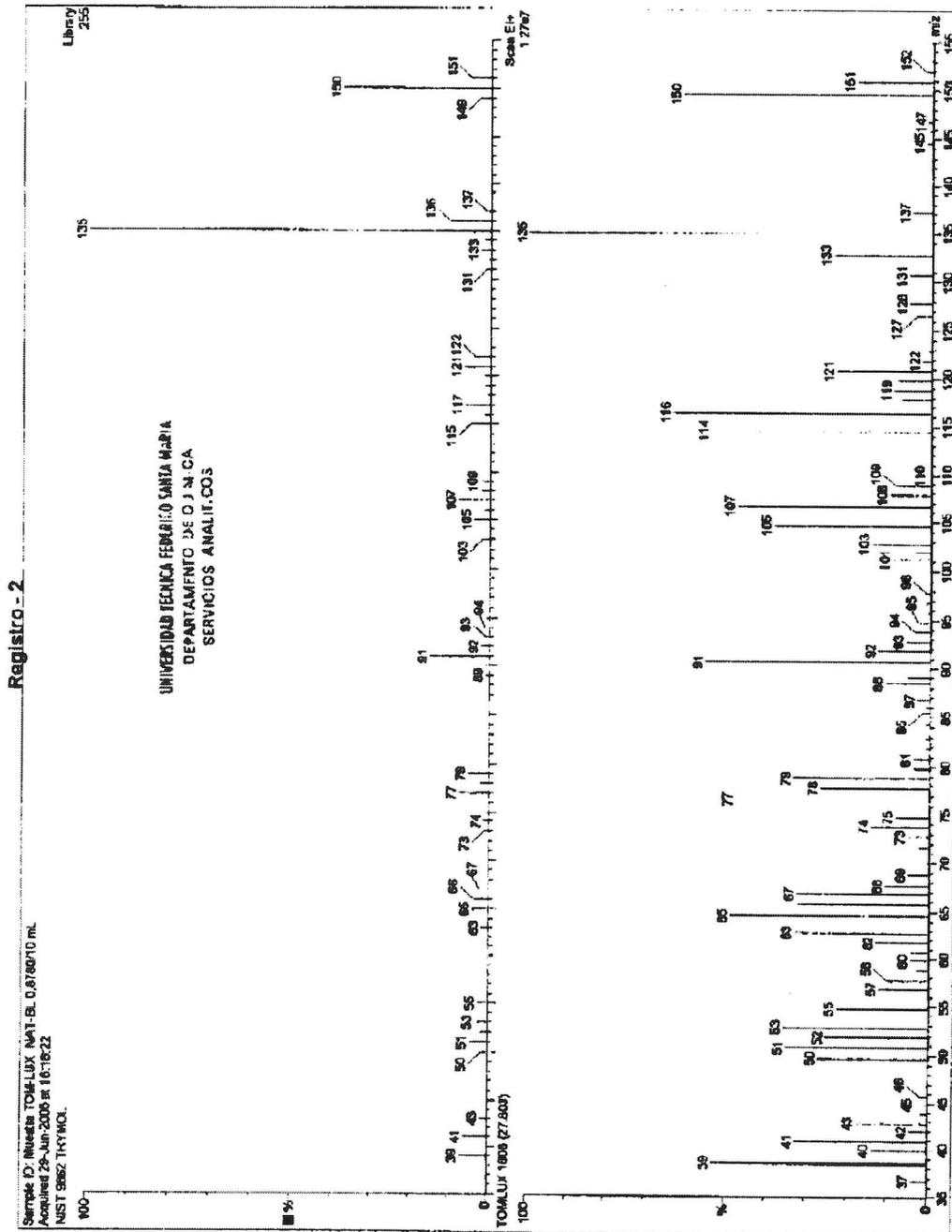
- **Registro – 7:** Espectro inferior corresponde a peak de la muestra TOM – FLA. CO<sub>2</sub>-SE-RO del peak a 28,038 minutos. Espectro superior corresponde a estándar de carvacrol.

María Elena Ortiz.  
Jefe Laboratorio Análisis Químicos  
Valparaíso, 8 de Julio de 2005

Nota: Los resultados informados en este Certificado solo se refieren a los ítems ensayados.  
Este Certificado no debe ser reproducido parcialmente sin la aprobación escrita de este Laboratorio.

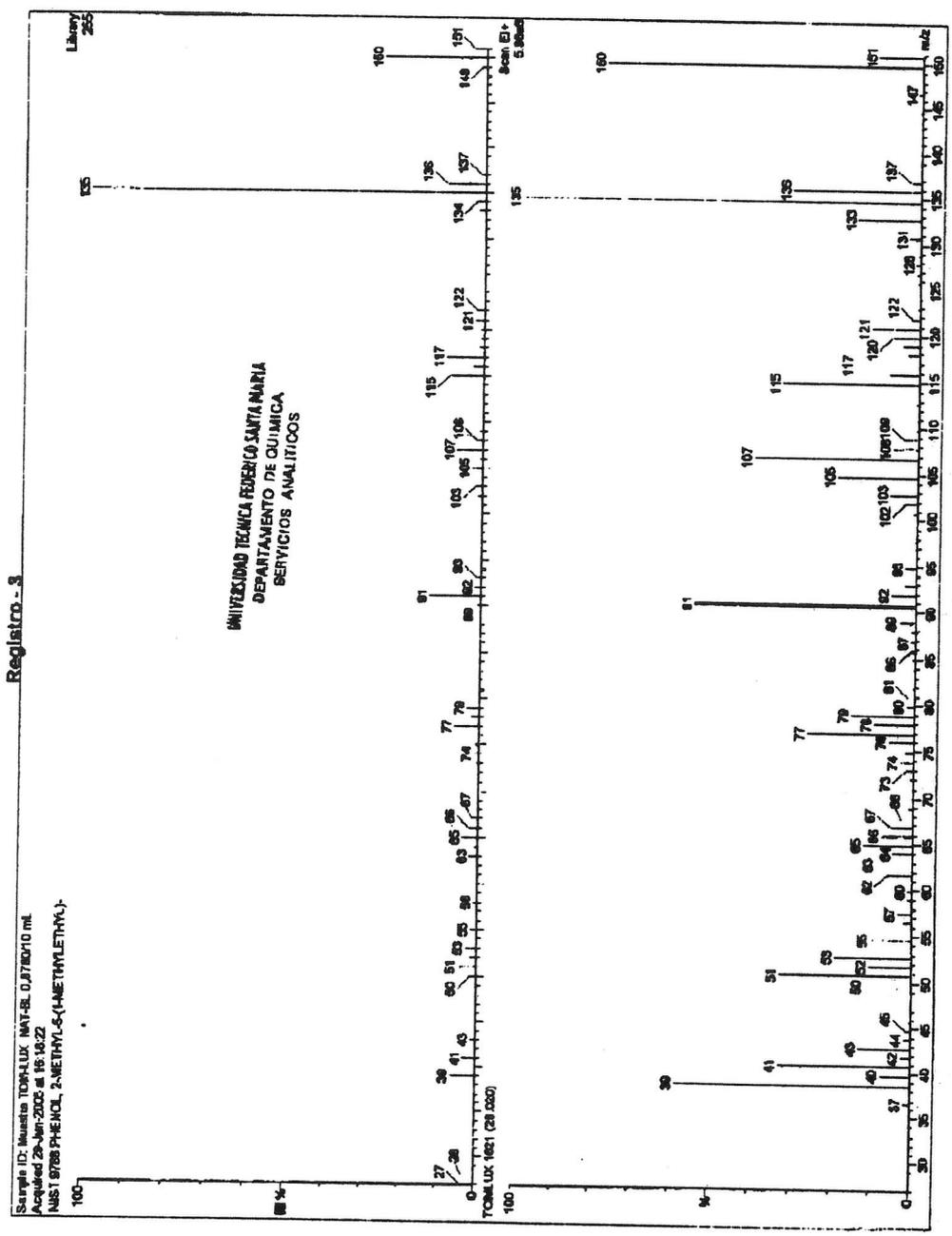


**Figura 54: Perfil Cromatografico para 3 muestras**  
**TOM-LUX, NAT BL: Aceite esencial de Tomillo, origen LUXCAMP.**  
**TOM-AM, AROM-BL: Aceite esencial de Tomillo, origen AMBAR.**  
**TOM-FLA, CO-SE-RO: Aceite esencial de Tomillo, origen FLAVEX.**



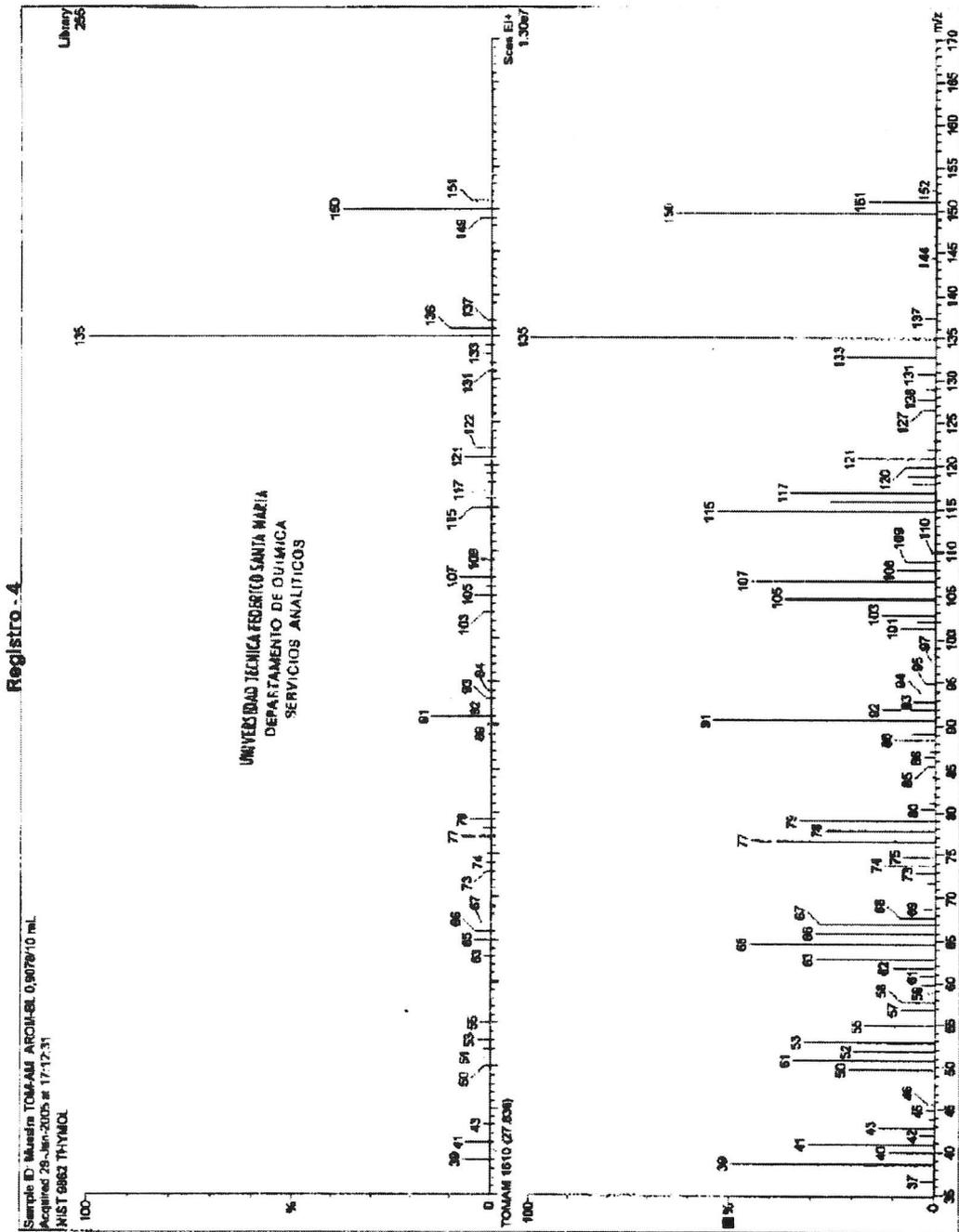
**Figura 55: Análisis Cromatografico de espectros de masas. TOM-LUX, NAT B. (27.803 minutos)**

TOM-LUX, NAT BL: Aceite esencial de Tomillo, origen LUXCAMP.

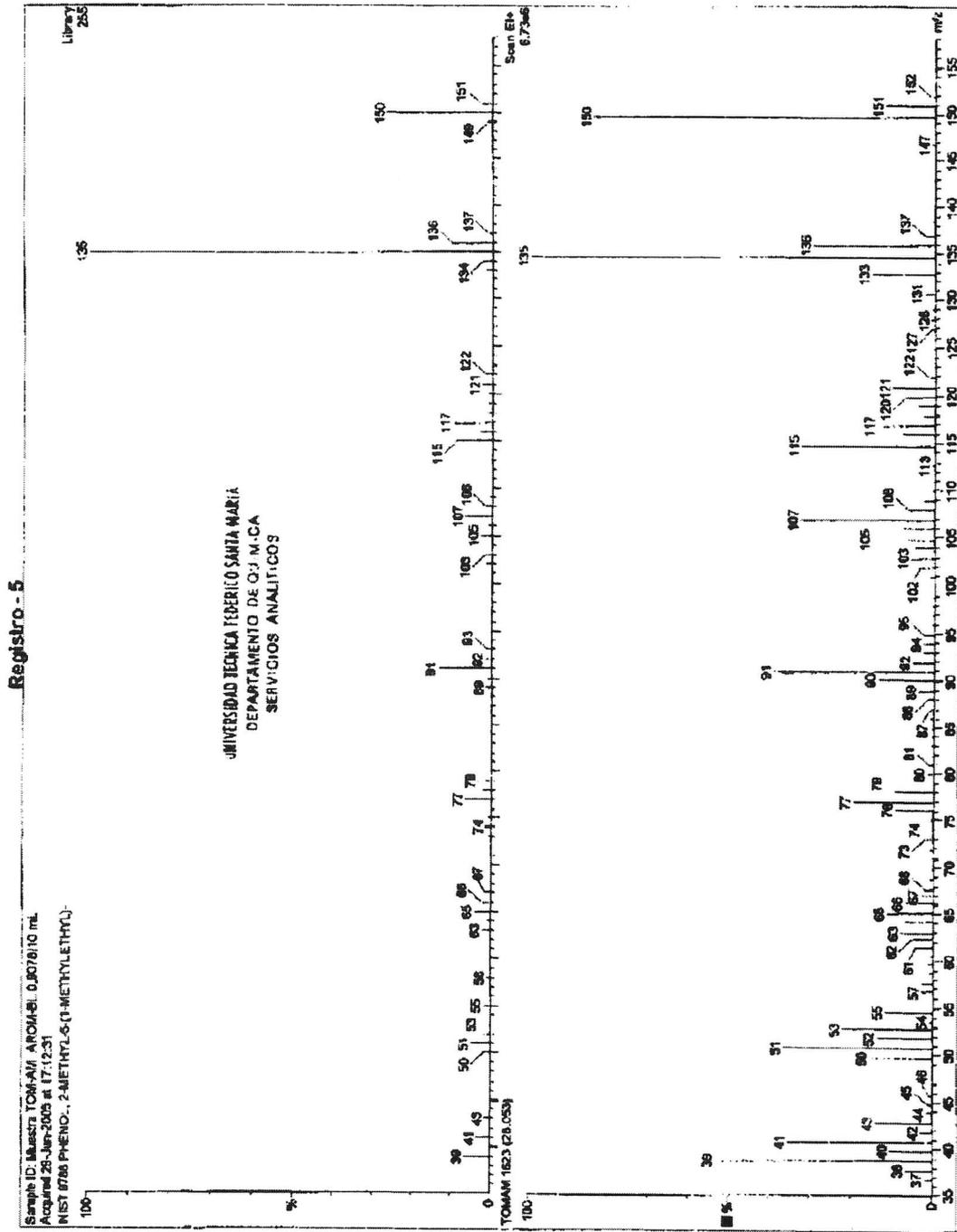


**Figura 56: Análisis Cromatografico de espectros de masas. TOM-LUX, NAT B. (28.020 minutos)**

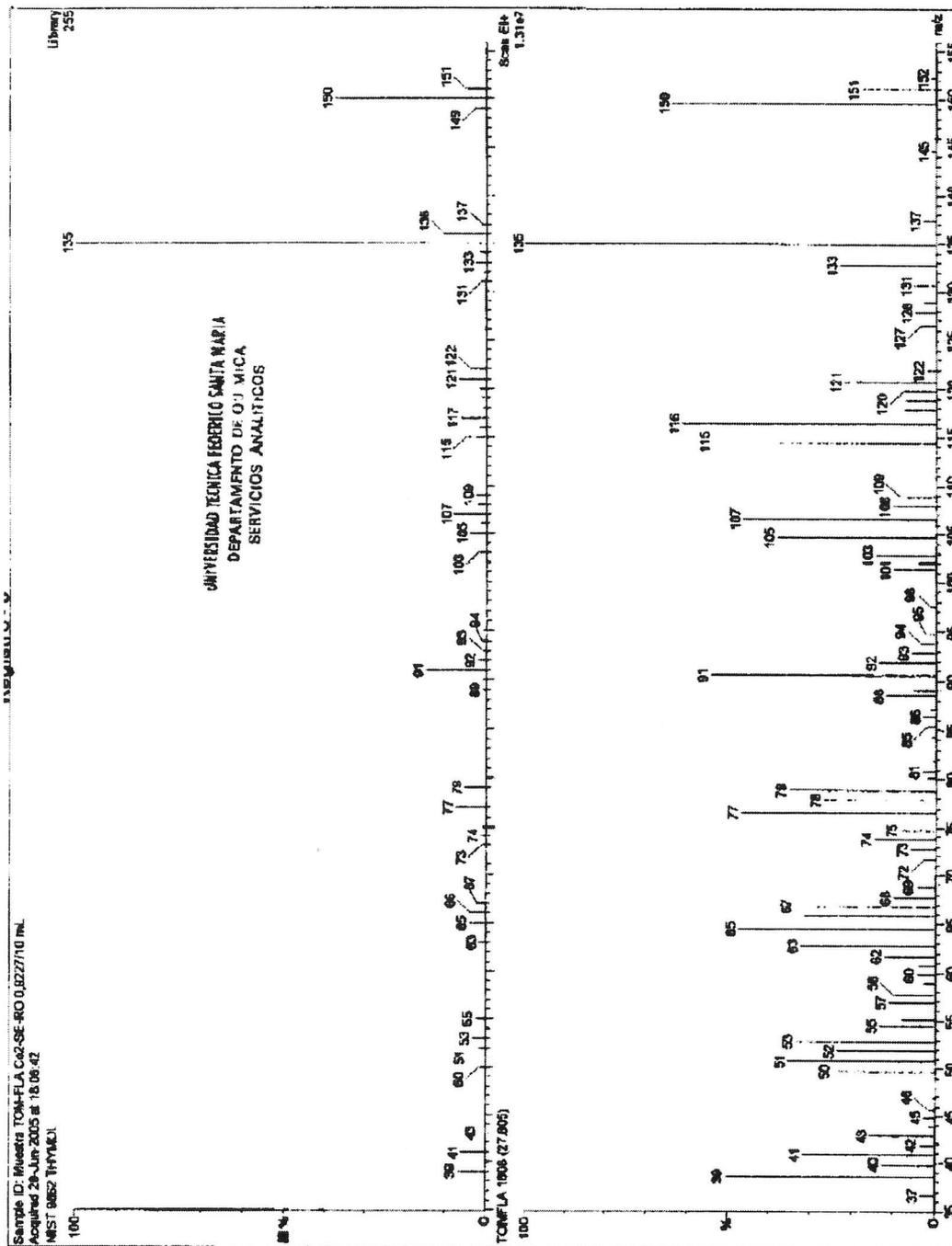
TOM-LUX, NAT BL: Aceite esencial de Tomillo, origen LUXCAMP.



**Figura 57: Análisis Cromatografico de espectros de masas. TOM-AM, AROM-BL (27.853 minutos)**  
TOM-AM, AROM-BL: Aceite esencial de Tomillo, origen AMBAR.



**Figura 58: Análisis Cromatográfico de espectros de masas. TOM-AM, AROM-BL. (28.053 minutos)**  
TOM-AM, AROM-BL: Aceite esencial de Tomillo, origen AMBAR.



**Figura 59: Análisis Cromatográfico de espectros de masas. TOM-FLA, CO2. (27.838 minutos)**

TOM-FLA, CO2-SE-RO: Aceite esencial de Tomillo, origen FLAVEX

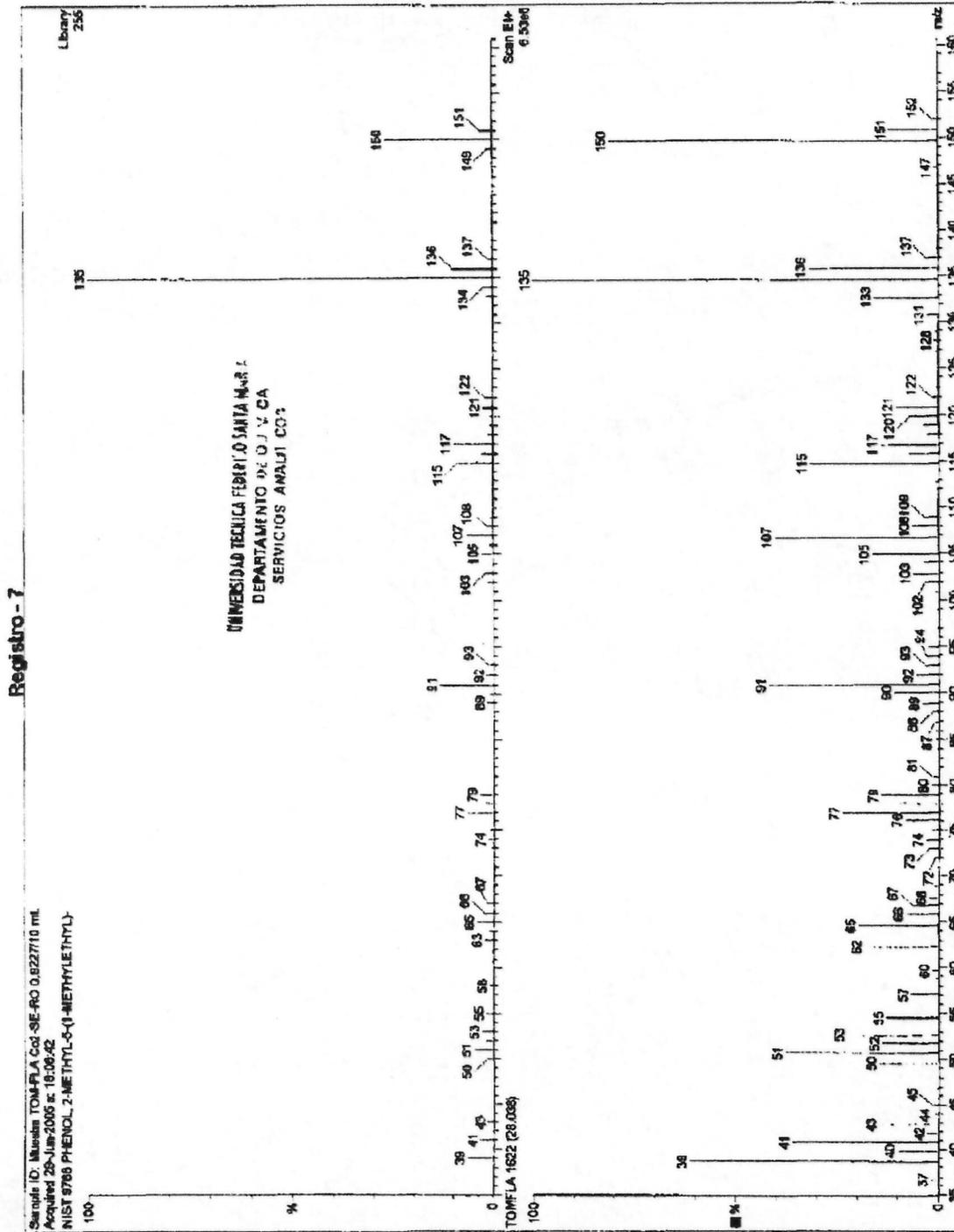


Figura 60: Análisis Cromatografico de espectros de masas. TOM-FLA, CO2. (28.038 minutos) TOM-FLA, CO2-SE-RO: Aceite esencial de Tomillo, origen FLAVEX



### ANEXO 3: PRINCIPALES PROBLEMAS METODOLOGICOS ENFRENTADOS

- Demora en la adquisición de Aceite esencial de tomillo. Generó un retaros en las actividades posteriores.
- Demora en la importación de cepa patrón. Generó un retraso en las actividades de pruebas en placas.
- Mortalidad de peces durante el proceso de aclimatación, de los peces transportados de Río Blanco a ECM
- Eclosión de ovas debido a las altas temperaturas de LABCPAC impiden realizar las pruebas de baños en ovas. Se corren los plazos debido a la disponibilidad de ovas de Río Blanco.
- Bajas temperaturas en Piscicultura Río Blanco impide el desarrollo de hongos en los peces infectados, demora en la puesta de las hembras para la obtención de ovas para las pruebas de baños.
- Mortalidad de peces por acumulación de amonio impide el término de las pruebas realizadas con tratamiento preventivo y curativo en alevines a nivel de laboratorio.
- Demora en la entrega de los resultados de los análisis químicos solicitados a la Universidad Federico Santa María por problemas en el ajuste de los equipos para análisis
- Reprogramación de actividades en el Hatchery de ECM, por instalación de sistema de circulación.

#### • MODIFICACIONES DURANTE EL PROYECTO

##### Actividades incorporadas

1.1 Obtención y purificación de cepas.

1.1.5 Mantención de cepas en laboratorio.

1.2 Determinación de la actividad antifúngica preventiva.

1.2.4 Pruebas de efecto inhibitorio de agente emulsificante: éter, alcohol y DMS, (Dimetilsulfoxido).



1.2.5 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite procedente de India, diluido en éter, alcohol y DMS (Dimetilsulfoxido).

1.2.6 Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite procedente de India, en agar y en semillas de cáñamo.

1.2.7 Pruebas para determinar tiempo mínimo de inhibición de la actividad fúngica del aceite de tomillo.

2.1 Evaluación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.

2.2.3.1 Adquisición de alimento.

2.2.2.2 Determinación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo diluido en Dimetilsufoxido (DMS) en alevines de truchas.

2.2.3.2 Preparación alimentos de prueba.



## Anexo 4: ACTIVIDADES Y TAREAS REALIZADAS.

Para la consecución de los objetivos se efectuaron las siguientes tareas y actividades:

**Obj.1 Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo y/o curativo para distintas cepas de saprolegnia.**

**Actividad 1.1: Obtención y purificación de cepas.**

- 1.1.1. Recolección de muestras de saprolegnia en centros de cultivo.
- 1.1.2. Cultivo de cepas.
- 1.1.3. Purificación de cepas.
- 1.1.4. Clasificación del hongo.

**Actividad 1.2: Determinación de la actividad antifúngica preventiva.**

- 1.2.1. Catastro de productos en base a aceite esencial de tomillo a nivel nacional e internacional.
- 1.2.2. Análisis químicos de los aceites.
- 1.2.3. Preparación de medio de cultivo.
- 1.2.3a Siembra de esporas
- 1.2.3b Desafío con producto comercial

**Actividad 1.3: Determinación de la actividad antifúngica curativa.**

- 1.3.1a Determinación de las CMI (Menor concentración inhibitoria).
- 1.3.2b Inoculación de las cepas en medio de cultivo.
- 1.3.2c Incubación de las placas

**Actividad 2: Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.**

- 2.1 Evaluación concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas por medio de baños.
  - 2.1.1 Traslado de ovas de Río Blanco al Laboratorio de cultivo de peces y Hatchery de la Escuela de Ciencias del Mar
  - 2.1.2 Determinación concentración tolerable.
- 2.2 Evaluación de concertación tolerable de aceite esencial de tomillo
  - 2.2.1a Traslado de peces de la piscicultura a LABCPAC
  - 2.2.1b Selección de truchas.
  - 2.2.2 Determinación concentración tolerable por medio de baños.
    - 2.2.2a Mantención de peces.
  - 2.2.3 Determinación concentración tolerable por alimento.
    - 2.2.3.1 Formulación de los alimentos.
      - 2.2.3.1a Elaboración de los alimentos.
    - 2.2.3.2 Prueba de tolerancia de alimento con aceite esencial de tomillo dentro de la mezcla

**Actividad 3: Determinar las concentraciones de aceite esencial de tomillo adecuadas para tratamiento preventivo y/o curativo de la saprolegniosis en ovas y alevines de salmónidos en el alimento y por medio de baños, a nivel de laboratorio Recepción de resultados.**



- 3.1.1 Traslado de Ovas desde la piscicultura de Río Blanco a LABCPAC
- 3.1.2 Determinación de concentración para tratamiento preventivo.
- 3.2 Mantención de Alevines
- 3.2a Alimentación previa
- 3.2b exposición al hongo
- 3.2.1.2 Baños
- 3.2.2.1 Tratamiento curativo por alimento
- 3.2.2.2 Tratamiento curativo por medio de baños

**Actividad 4: Realizar pruebas a escala piloto para validar los resultados obtenidos en los objetivos 2 y 3**

- 4.1 Ensayos en truchas de cultivo Piscicultura Río Blanco
- 4.2 Ensayos en Salmón Coho.
- 4.3 Ensayos en ovas Salmón Coho
- 4.4 Evaluar el efecto del aceite esencial de tomillo en el agua.

**Actividad 5: Determinar a nivel experimental el costo de un tratamiento curativo y/o preventivo contra saprolegniosis en salmones y truchas.**

- 5.1 Costos en ovas de salmón coho
- 5.1a Determinar Dosis de aceite esencial a aplicar por 1000 ovas.
- 5.1b Determinación del periodo de aplicaron de baño.
- 5.1c Determinación del precio del aceite esencial.
- 5.2 Costos en alevines de Salmon Coho.
- 5.2a Determinar dosis de aceite esencial a aplicar por metro cúbico
- 5.2b Determinar el periodo de aplicación
- 5.2c Determinación del precio del aceite
- 5.3 Costos del tratamiento en alevines de trucha.
- 5.3a Determinar dosis de aceite esencial a aplicar por metro cúbico
- 5.3b Determinar el periodo de aplicación
- 5.3c Determinación del precio del aceite

**Actividad 6: Difundir los resultados al sector acuícola.**

- 6.1 Diseño y elaboración de póster de difusión y papelería.
- 6.2 Diseño y construcción pagina Web.
- 6.3 Lanzamiento del proyecto.
- 6.4 Organización de reuniones con empresas.
- 6.5 Elaboración de seminarios.
- 6.6 Elaboración y distribución de boletín informativo para la prensa.
- 6.7 Elaboración de libro manual
- 6.8 Participación en Congreso-seminario Multisectorial.



## ANEXO 5: ANÁLISIS DE BRECHA.

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha de inicio	Fecha de término	% de Ejecución
1		<b>Definir en placas de cultivo la concentración de aceite esencial de tomillo con efecto preventivo y/o curativo para distintas cepas de saprolegnia.</b>	15/3/2005	30/6/2005	
1	1.1	<b>Obtención y purificación de cepas.</b>	15/3/ 2005	15/5/2005	100
1	1.1.1	<i>Recolección de muestras de saprolegnia en centro de cultivo</i>	15/3/ 2005	11/4/2005	100
1	1.1.2	<i>Cultivo de cepas</i>	21/3/2005	15/4/2005	100
1	1.1.3	<i>Purificación de cepas</i>	30/3/2005	20/4/2005	100
1	1.1.4	<i>Clasificación e identificación de hongos</i>	20/4/2005	16/5/005	100
1	1.1.5	<i>Mantencion de cepas en laboratorio</i>			
1	1.2	<b>Determinación de la actividad antifúngica Preventiva.</b>	16/5/2005	30/6/2005	100
1	1.2.1	<i>Catastro Adquisición de productos en base a aceite esencial de tomillo a nivel nacional e internacional.</i>	16/5/2005	30/5/2005	100
1	1.2.2	<i>Análisis químico de aceites esenciales.</i>	20/5/2005	6/6/2005	100
1	1.2.3	<i>Evaluación distintas concentraciones de aceite esencial</i>	6/6/2005	15/6/2005	100
1	1.2.4	<i>Pruebas de efecto inhibitorio de agente emulsificante: éter, alcohol y DMS, (Dimetilsulfoxido).</i>	20/06/05	25/06/05	100
1	1.2.5	<i>Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite procedente de India, diluido en éter, alcohol y DMS (Dimetilsulfoxido).</i>	20/06/05	25/06/05	100
1	1.2.6	<i>Pruebas para determinar concentración inhibitoria con aceite procedente de India, en agar y en semillas de cáñamo.</i>	25/06/05	30/06/05	100
1	1.2.7	<i>Pruebas para determinar tiempo mínimo de inhibición de la actividad fúngica del aceite de tomillo.</i>	25/06/05	30/06/05	100
1	1.3	<b>Determinación de la actividad antifúngica Curativa.</b>	15/06/2005	30/06/2005	100
2		<b>Objetivo 2: Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en alimentos.</b>	15/09/05	13/10/05	100
2	2.1	<i>Evaluación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas por medio de baños.</i>	15/09/05	13/10/05	100
2	2.1.1	<i>Traslado de Ovas desde la piscicultura de Río Blanco al Laboratorio de cultivo de peces LABCPAC de la escuela de Ciencias del Mar de la PUCV.</i>	15/09/05	15/09/05	100
2	2.1.2	<i>Determinación de la concentración tolerable en ovas en laboratorio de río Blanco.</i>	19/09/05	13/10/05	100
2	2.2	<b>Evaluación de la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en alevines de salmónidos por medio de baños y en el alimento.</b>	01/09/05	10/04/06	100
2	2.2.1	<i>Traslado de peces desde la Piscicultura de Río Blanco al Laboratorio LABCPAC de la ECM.</i>	01/09/05	01/09/05	100
2	2.2.2	<i>Determinar la concentración tolerable en alevines mediante baños.</i>	02/09/05	20/09/05	100



2	2.2.3	Determinar la concentración tolerable por medio de alimentos en alevines.	06/03/06	10/04/06	100
2	2.2.3.1	Formulación de los alimentos.	06/03/06	13/03/06	100
2	2.2.3.2	Prueba de tolerancia de alimento con aceite esencial de tomillo dentro de la mezcla.	14/03/06	10/04/06	100
3	3.	<b>Objetivo 3: Determinar la concentración esencial de tomillo adecuada para el tratamiento curativo y preventivo de la saprolegniosis en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños.</b>	10/03/06	11/04/06	100
3	3.1	Tratamiento preventivo y curativo en ovas por medio de baños.	10/03/06	11/04/06	100
3	3.1.1	Traslado de ovas al LABCPAC de la Escuela de Ciencias del MAR (ECM).	10/03/06	15/03/06	100
3	3.1.2	Determinar la concentración preventiva y curativa de aceite esencial de tomillo en ovas.	16/03/06	11/04/06	100
3	3.2	Tratamiento preventivo y curativo en alevines.	06/03/06	06/04/06	100
3	3.2.1	Tratamiento preventivo y curativo en alevines por medio de baños.	06/03/06	06/04/06	100
3	3.2.2	Tratamiento preventivo y curativo en alevines por medio del alimento.	15/03/06	28/03/06	100
4	4	<b>Objetivo 4: Realizar pruebas a escala piloto para validar los resultados obtenidos en los objetivos 2 y 3</b>	01/03/06	28/07/06	100
4	4.1	Ensayo en truchas de Río Blanco	01/03/06	28/07/06	
4	4.1.1	Pruebas en Piscicultura Río Blanco tratamiento preventivo por medio de alimentos en trucha arcoiris	01/03/06	28/07/03	100
4	4.1.2	Pruebas piloto en Piscicultura Río Blanco tratamiento preventivo por medio de baños en trucha arcoiris.	01/04/06	28/06/06	100
4	4.2	Ensayo en Ovas de Salmon Coho	02/03/06	30/05/06	100
4	4.4	Estudio del riesgo asociado a la eliminación de altas dosis de aceite esencial de tomillo al medio.	02/11/06	30/11/06	100
5	5	<b>Objetivo 5: Determinar a nivel experimental el costo de un tratamiento curativo y/o preventivo contra la saprolegniosis en salmones y truchas</b>	30/12/06	30/01/07	100
5	5.1	En ovas de salmón coho	30/12/06	10/01/07	100
5	5.2	En alevines de salmón coho	11/01/07	20/01/07	100
5	5.3	En alevines de truchas	20/01/07	30/01/07	100
6	6	<b>Objetivo 6: Difundir los resultados al sector acuícola.</b>	01/04/05	01/04/07	100
6	6.1	Diseño y elaboración postér difusión y papelería	04/04/05	30/04/05	100
6	6.2	Diseño y construcción Pasgina Web	01/04/05	30/04/05	100
6	6.3	Lanzamiento del proyecto	30/04/05	30/04/05	100
6	6.4	Transferencia del proyecto	15/09/06	17/11/06	100
6	6.4.1	Transferencia de los resultados al sector acuícola Seminario	15/09/06	15/09/06	100
6	6.4.2	Transferencia de los resultados al sector acuícola: prensa	20/09/06	17/11/06	100
6	6.5	Publicación en revista científica	05/1/06	05/12/06	100
6	6.6	Elaboración de un manual	02/01/07	30/03/07	100
6	6.6	Seminario Multisectorial	13/09/07	13/09/07	100



## ANEXO 6: PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCION DEL PROYECTO

### LEGALES

No se encontraron problemas de tipo legal en el desarrollo y ejecución del proyecto

### TECNICOS

En el segundo periodo los problemas que se suscitaron fueron los siguientes:

Traslado de peces: Luego del traslado de 200 peces desde río Blanco al Laboratorio LABCPAC para realizar las pruebas preliminares de tolerancia de alevines de trucha a distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo, durante el proceso de aclimatación, que duro aproximadamente 4 días y por dificultades en las diferencias de temperaturas entre la piscicultura de Río Blanco y el Laboratorio de la escuela de Ciencias del Mar se produjo la mortalidad total de los peces. Por lo anterior se debió realizar las pruebas nuevamente con el consiguiente retraso en las actividades planificadas.

En relación a las pruebas con ovas con tratamiento preventivo y curativo no se han realizado en el periodo correspondiente, por lo siguiente: En una primera instancia se trajeron ovas de Río Blanco, se mantuvieron en el sistema de cunas desarrolladas para tal efecto, pero las condiciones de temperatura en el LABCPAC eran mas altas a las temperaturas en la piscicultura, por tal motivo, el periodo de aclimatación fue muy corto y las ovas eclosionaron.

Esas pruebas se realizaron con las últimas ovas de la piscicultura, y la posibilidad de poder realizar nuevos bioensayos se realizarían en marzo por la disponibilidad de ovas.

En el Tercer informe se produjeron los siguientes problemas técnicos:

1. Bajas temperaturas registradas en la Piscicultura de Río Blanco al momento de realizar las pruebas lo cual provocó:
  - a. Ausencia de desarrollo de hongos en peces infectados en Piscicultura de Río Blanco: pese a haber efectuado el procedimiento de inoculación debidamente, las bajas temperaturas registradas en la piscicultura impidieron el desarrollo de saprolegnia.
  - b. Retraso en las experiencias con las ovas de trucha, producto del retraso en la puesta de las hembras destinadas al proyecto.



- c. Extensión del periodo de ova con en ojo aproximadamente una semana mas de lo normal, con lo cual las ovas estuvieron mayor tiempo expuestas al tratamiento lo que pudo haber incidido en una mayor mortalidad.
  - d. Cristalización y precipitación del aceite esencial de tomillo. En conversaciones con los especialistas del Laboratorio de Análisis de la Universidad Federico Santa María, se nos indico que el precipitado originado correspondería probablemente al timol y carvacrol, los cuales se presentan en estado sólido a bajas temperaturas. Este efecto podría haber afectado el poder antifúngico del aceite. Es preciso realizar otros ensayos para evaluar la efectividad de este evento.
2. Muerte de peces por efectos de amonia los que impidió dar buen término a las actividades correspondientes al tratamiento preventivo y curativo en alevines a nivel de laboratorio.
  3. Los resultados de los análisis para determinar las concentraciones de aceite esencial de tomillo en los alimentos están a la espera producto de una ajuste en los equipos del Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Federico Santa María.

#### **ADMINISTRATIVOS**

No se encontraron problemas de tipo legal en el desarrollo y ejecución del proyecto

#### **GESTION**

En la primera parte del proyecto los principales problemas que se originaron correspondieron a problemas de gestión, los cuales fueron los siguientes.

- Demora en la adquisición de Aceite esencial de tomillo: A pesar de que al realizar el catastro de productores y comercializadores de aceite esencial de tomillo se observó que existen numerosos posibles proveedores del producto, la nula respuesta obtenida por ellos en un principio, retrasó todas las actividades, que dependían de la adquisición del aceite esencial. Una vez logrados los contactos con empresas como FLAVEX (Alemania) y Yash export (India). Con éste último proveedor, el proceso de importación ha sido demoroso, retrasando aún más el inicio de las pruebas.  
Para agilizar este proceso se ha mantenido un constante diálogo y correspondencia con el departamento encargado de importaciones de la administración Central de la PUCV.
- Demora en la importación de cepa patrón: Se contactó a la empresa que posee la cepa patrón, se hicieron los contactos, pero debido a la demora en la respuesta de los bancos receptores del depósito, se ha retrasado la llegada de la muestra. Al igual que en el punto anterior se



ha mantenido una constante comunicación con el departamento correspondiente en la PUCV.

Segundo periodo:

### ADMINISTRATIVOS

En el área de gestión Financiera y económica la demora en la corrección del segundo informe y la no entrega de los valores finales aceptados por FIA respecto al saldo restante de las cuentas no permite completar las próximas tablas debido a que esos valores son necesarios para proyectar las cifras para los periodos siguientes.

### TECNICOS

Objetivo 2: Determinar la concentración tolerable de aceite esencial de tomillo en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños y en alimentos.

En este objetivo, los principales gastos corresponden a Materiales e insumos, por efecto de la compra de materias primas para la reelaboración de los alimentos, alimento para peces y otros. Como las actividades se han atrasado por la demora y la no respuesta en algunos casos para obtener aceite esencial, los viajes a Río Blanco también se han pospuesto ya que sin aceite que incorporar no se pueden solicitar alimentos y realizar los bioensayos, además que junto con los alimentos, los viajes a la Piscicultura son gastos importantes dentro del desarrollo del proyecto.

Otro punto importante también son los análisis químicos de las materias primas y de los alimentos que también tienen alta prioridad dentro de los resultados y también son costo importante que no se han realizado por las mismas causas anteriores.

Objetivo 3: Determinar la concentración esencial de tomillo adecuada para el tratamiento curativo y preventivo de la *saprolegniosis* en ovas y alevines de salmónidos por medio de baños.

Los principales gastos que se deben incurrir dentro de este objetivo corresponden a Movilización, viáticos y combustibles, Materiales e Insumos, Servicios a terceros y gastos generales e imprevistos subdivididos ya sea por Viajes a Puerto Montt para las experiencias en las empresas, Viajes a Río Blanco para bioensayos, Arriendos, Análisis químicos a las muestras de aceite, alimentos y materias primas etc. Por los mismos problemas indicados en el objetivo 2 no se han realizado las pruebas y no se han gastado los dineros designados para estas actividades por eso son los excedentes que se



encuentran al finalizar este periodo.

No se han gastado la totalidad de los fondos del periodo, debido al atraso de algunas actividades que implicaban gastos de operación como son las pruebas en alimentos en truchas en Río Blanco, compra de alimentos para las pruebas.

Periodo Final:

Manual de Difusión.

El material esta finalizado y se encuentra en pruebas de impresión. Sin embargo la edición e impresión finales del manual se ha visto retrasada por el cierre de la Universidad en el periodo de vacaciones.