

EFFECTO DE *Lactobacillus plantarum* Lab 9 SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA  
DE ALEVINOS Y JUVENILES DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis* sp.)

DIANA MARCELA BETANCOURT GORDILLO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2014

EFFECTO DE *Lactobacillus plantarum* Lab 9 SOBRE EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA  
DE ALEVINOS Y JUVENILES DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis* sp.)

DIANA MARCELA BETANCOURT GORDILLO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Asesores

Cristina Ramírez Toro  
PhD: Procesos Biotecnológicos

Milena Guerrero Flórez  
MSc: Microbiología

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2014

## NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”

Artículo 1ro del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

Cristina Ramírez Toro PhD.  
Asesora

---

Milena Guerrero Flórez MSc.  
Asesora

---

Ariel Gómez  
Jurado

---

Alvaro Pazos  
Jurado

San Juan de Pasto, Febrero de 2014

## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas aquellas personas que no solo me ayudaron a la realización de este trabajo, sino que además contribuyeron en gran medida al enriquecimiento de mi formación académica, profesional y moral.

Antes que nada quiero manifestar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Ramírez docente de la Universidad del Valle, por haber aceptado amablemente ser mi tutora, por la confianza en mi persona, por brindarme todo su apoyo, interés y conocimientos para culminar con éxito esta investigación.

Un agradecimiento muy especial a la profesora Milena Guerrero, por haberme guiado en todo momento, por sus consejos, por ser mi amiga, profesora y un gran ejemplo de persona.

Agradezco todo el apoyo y colaboración ofrecida por el Dr. German Bolivar quien no solo me abrió las puertas de su laboratorio y me hizo parte de su grupo de investigación, sino que además puso a mi disposición todo lo que necesité para llevar a cabo este trabajo.

También quiero dar las gracias a Martha Ceballos, Jefe del Laboratorio de Morfología e Histología de la Universidad del Valle y a Efrén Muñoz del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Colombia (Sede-Palmira), por su orientación y asesoría durante los procesamientos de las muestras de tejido para microscopía.

Gracias al ICA-Villavicencio y a todo el personal de Langostinos del Llano, por permitirme trabajar en sus instalaciones y utilizar sus equipos, gracias por toda su colaboración y disposición.

Gracias al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo financiero que hizo posible la realización de este trabajo, mediante la financiación del proyecto macro “Mejoramiento en la Producción, Sanidad y Comercialización de la Tilapia Mediante el Uso de Probióticos”

Gracias a mis dos jurados el profesor Alvaro Pazos y Ariel Gómez por abrir un espacio para leer y evaluar este trabajo.

Gracias a mis amigos y compañeros de carrera, que me apoyaron, me alentaron y estuvieron para mí dentro y fuera de un salón de clases, amigos con quienes compartí diariamente momentos de estudio, diversión, tristezas y alegrías; su ayuda ha sido invaluable en mi formación.

A todos mis maestros y auxiliares de laboratorio del programa de Biología, gracias por todo el tiempo y la dedicación que me brindaron durante todos estos años, por compartir sus valiosos conocimientos los cuales serán indispensables para mi futura vida profesional.

A Ivan Castro, muchas gracias por todo el amor, por haber estado presente en todo momento principalmente en aquellos de estrés total, por tu paciencia y ayuda incondicional.

A todos mis mayores reconocimientos y gratitud.

## DEDICATORIA

Al culminar mis estudios universitarios dedico este trabajo de investigación, resultado de mi esfuerzo, empeño y dedicación:

A Dios que es mi compañero y mi amigo, por ser mi guía en cada paso que doy, por llenar mi vida de dicha y de bendiciones.

A mi adorada madre por creer en mí, por brindarme una caricia en el momento indicado, por su constancia, por apoyarme en cada escalón de mi vida, por los regaños que merecía y no entendía, por su constante sacrificio y entrega total. Mami aquí tienes mi esfuerzo, tarde pero seguro.

A mi hermana, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por preocuparse por mí, por su amor y compañía, por ser una de las motivaciones más importantes de mi vida.

A mis abuelitos, ya que sin su sólida base de principios morales, no hubiera superado los obstáculos de la vida.

A mis tías, por su apoyo, cariño y por tenerme siempre en sus oraciones.

Al señor Javier Narváez, porque gracias a él, pude culminar mi carrera y ser una profesional, por todo el apoyo y ayuda incondicional, porque ha velado siempre por mi bienestar y educación.

A mis amigas Jennifer, Claudia y Karen, por su invaluable amistad, consejos, apoyo, ánimo, compañía y lealtad durante todos estos años.

A Isabel Gómez, por su constante compañía, por soportar innumerables trasnochos a mi lado, por su amistad incondicional.

A todas esas personas que me quieren, me apoyan, me cuidan, me piensan y siempre están pendientes de mí.

## RESUMEN

La intensificación del cultivo de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) provoca reducciones en las tasas de crecimiento, mortalidades significativas y con ello el uso indiscriminado de antibióticos, los cuales afectan directamente el ambiente, el animal y la salud humana. Para contrarrestar este efecto se utilizan probióticos o microorganismos vivos que confieren beneficios a la salud del hospedero, por esta razón esta investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento y sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Para ello, fueron llevados a cabo dos ensayos experimentales. En el ensayo experimental I que tuvo lugar en las instalaciones de Langostinos del Llano (Restrepo-Meta), un grupo de alevinos y juveniles de tilapia fueron alimentados con un concentrado suplementado con *L. plantarum* Lab 9 (concentrado probiótico) y otro grupo con un concentrado sin la bacteria probiótica (concentrado control), durante 30 días. En el ensayo experimental II, que tuvo lugar en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Marina de la Universidad del Valle (Cali), juveniles de tilapia roja se alimentaron con el concentrado probiótico y control por periodos de 10, 20 y 30 días. Posterior al periodo de alimentación con el probiótico, los análisis microbiológicos del intestino de alevinos y juveniles del ensayo experimental I, revelaron que *L. plantarum* Lab 9 no se adhiere al intestino de ninguno de los dos estadios. Por el contrario, en los intestinos de los animales que fueron sometidos a las condiciones del ensayo experimental II, fue posible detectar a la bacteria en concentraciones  $> 3,4 \times 10^{11}$  UFC/g posterior a 10 días de tratamiento, concentración que fue disminuyendo a niveles de  $1,4 \times 10^4$  UFC/g y  $< 30$  UFC/g después de 20 y 30 días de tratamiento con el probiótico, respectivamente. Además, se determinó que *L. plantarum* Lab 9 permanece viable en el intestino de los juveniles hasta 10 días después de haber suspendido la administración del alimento probiótico, alcanzando una concentración de  $4,6 \times 10^4$  UFC/g. Los parámetros de crecimiento en las tilapias juveniles que recibieron el tratamiento probiótico demostraron mejores resultados ( $P < 0.01$ ) que aquellas que se alimentaron con el concentrado control. No obstante no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los alevinos del grupo probiótico ( $P > 0.01$ ), con respecto a los del grupo control. Durante el tratamiento con el probiótico *L. plantarum* Lab 9 no tuvo un efecto significativo sobre la sobrevivencia de los alevinos y juveniles de tilapia roja.

Palabras claves: Adherencia, Crecimiento, *Lactobacillus plantarum* Lab 9, *Oreochromis* sp., Probióticos, Sobrevivencia.

## ABSTRACT

Farming intensification of red tilapia (*Oreochromis* sp.) causes reductions in growth rates, significant mortalities and thus the indiscriminate use of antibiotics, which directly affect the environment, animal and human health. To counter this effect, probiotics or live microorganisms that confer health benefits to the host are used. Therefore this research aimed to assess the effect of *Lactobacillus plantarum* Lab 9 on growth and survival of fry and juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). For that purpose, were carried out two experiments. In the experimental test I conducted on the premises of Langostinos del Llano (Restrepo-Meta), a fingerlings and juveniles tilapia group were fed with concentrate supplemented by *L. plantarum* Lab 9 (probiotic concentrate) and another group with a concentrate without the probiotic bacteria (concentrated control), over 30 days. In the experimental test II, which took place in the Laboratory of Microbiology and Marine Biotechnology at the Universidad del Valle, red tilapia juveniles were fed with boot probiotic and control concentrate for periods of 10, 20 and 30 days. After the feeding period with probiotic gut microbiological analyzes of fingerlings and juveniles experimental trial I, revealed that Lab 9 strain does not adhere to any of the intestine stages. By contrast, in the intestines of the animals were subjected to the experimental II test conditions, it was possible to detect bacteria at concentrations of  $> 3.4 \times 10^{11}$  UFC/g after 10 days of treatment, concentration, which decreased to levels of  $1.4 \times 10^4$  UFC/g and  $< 30$  UFC/g after 20 and 30 days of treatment with the probiotic, respectively. Also, it was found that *L. plantarum* Lab 9 remains viable in the gut of juveniles up to 10 days after stop probiotics administration, reaching a concentration of  $4.6 \times 10^4$  UFC/g. The growth parameters in juvenile tilapia receiving probiotic treatment showed better results ( $P < 0.01$ ) than those fed with the control concentrate. However, no significant differences was found in the growth of fingerlings probiotic group ( $P > 0.01$ ) compared to the control group. During treatment with the probiotic *L. plantarum* Lab 9 had no significant effect on the survival of juvenile and fingerlings red tilapia.

Key words: Adhesion, Growth, *Lactobacillus plantarum* Lab 9, *Oreochromis* sp., Probiotics, Survival.

## TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
	INTRODUCCIÓN.....	21
1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
2.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
3.	JUSTIFICACIÓN.....	26
4.	OBJETIVOS.....	27
5.	ANTECEDENTES.....	28
6.	MARCO TEÓRICO.....	34
6.1	Generalidades sobre tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.).....	34
6.1.1	Parámetros de calidad de agua óptimos para el cultivo de tilapia.....	34
6.1.2	Generalidades del intestino de tilapia. ....	35
6.1.3	Microbiota intestinal en los peces. ....	36
6.1.4	Factores que alteran la microbiota intestinal en los peces.....	36
6.2	Microorganismos Probióticos.....	36
6.2.1	Funciones de los Probióticos .....	37
6.2.2	Mecanismos de acción de los probióticos.....	38
6.2.3	Selección de cepas probióticas.....	38
6.2.4	Bacterias ácido lácticas: probióticos potenciales en la acuicultura.....	39
6.2.5	Limitaciones que presenta el estudio en probióticos destinados para acuicultura.....	40
6.2.6	Influencia del tiempo de administración sobre el efecto probiótico.....	41
7.	METODOLOGÍA.....	42
7.1	Localización de la zona de estudio: EE-I.....	42
7.2	Localización de la zona de estudio: EE-II.....	43
7.3	Diseño experimental del EE-I.....	43
7.3.1	Descripción de las principales condiciones de trabajo en EE-I.....	45
7.4	Diseño experimental del EE-II.....	46
7.4.1	Descripción de las principales condiciones de trabajo en EE-II.....	47
7.5	Registro de parámetros de calidad de agua.....	48
7.5.1	Registro de los parámetros de calidad de agua durante el EE-I.....	48
7.5.2	Registro de los parámetros de calidad de agua durante el EE-II.....	49
7.6	Preparación de la dieta experimental.....	49
7.6.1	Prueba de viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 contenida en el concentrado probiótico.....	50

7.6.2	Prueba de esterilidad del concentrado control.....	50
7.7	Evaluación de la adherencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 al intestino de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) a través de análisis microbiológico, microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	50
7.7.1	Análisis microbiológico del intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-I.....	50
7.7.2	Análisis microbiológico del intestino de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-II.....	51
7.7.3	Toma de muestras de intestino y procesamiento para análisis microbiológico...	51
7.8	Determinación del efecto de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 sobre el crecimiento de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) a través de parámetros biométricos.....	53
7.9	Estimación del porcentaje de sobrevivencia de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) luego de la alimentación con <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9.....	54
7.10	Análisis estadístico.....	54
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
8.1	Seguimiento de la viabilidad de <i>L. plantarum</i> Lab 9 en el concentrado probiótico suministrado durante el EE-I.....	55
8.2	Seguimiento de la viabilidad de <i>L. plantarum</i> Lab 9 en el concentrado probiótico suministrado en el EE-II.....	56
8.3	Parámetros de calidad de agua registrados durante el EE-I.....	58
8.4	Parámetros de calidad de agua registrados durante el EE-II.....	58
8.5	Adherencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 al intestino de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.).....	59
8.5.1	Análisis microbiológico del intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) sometidos a las condiciones del EE-I.....	59
8.5.2	Análisis microbiológico del intestino de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) sometidos a las condiciones del EE-II.....	60
8.5.3	Tiempo de permanencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 en el intestino de los juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) tras suspender el suministro del concentrado probiótico.....	61
8.5.4	Microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (TEM) del intestino de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) posterior al tratamiento probiótico.....	63
8.5.4.1	Microscopía de luz del intestino de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.).....	63
8.5.4.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del intestino de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) posterior al tratamiento probiótico y control.....	65
8.6	Determinación del efecto de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 sobre el crecimiento de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) a través de parámetros biométricos.....	67

8.6.1	Determinación del efecto de <i>L. plantarum</i> Lab 9 sobre el crecimiento de los alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-I.....	67
8.6.2	Determinación del efecto de <i>L. plantarum</i> Lab 9 sobre el crecimiento de los juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-II.....	70
8.7	Estimación de la sobrevivencia de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) luego de la alimentación con <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9.....	72
8.7.1	Estimación de la sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE I.....	72
8.7.2	Estimación de la sobrevivencia de los juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE II.....	73
	CONCLUSIONES.....	75
	RECOMENDACIONES.....	76
	BIBLIOGRAFÍA.....	77
	ANEXOS.....	93

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Adherencia de microorganismos probióticos en el intestino, posterior a su administración en la dieta.....	29
Tabla 2. Efecto de los probióticos suministrados en el agua de cultivo.....	30
Tabla 3. Adherencia de microorganismos probióticos a diferentes tiempos de administración.....	31
Tabla 4. Tiempo de permanencia de microorganismos probióticos en el intestino luego de suspender su suministro en la dieta.....	32
Tabla 5. Efecto de los probióticos en el crecimiento y la sobrevivencia.....	33
Tabla 6. Parámetros Físico-Químicos óptimos del agua para el cultivo de tilapia.	35
Tabla 7. Condiciones experimentales durante la etapa de adaptación de alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) en el EE-I.....	44
Tabla 8. Condiciones experimentales que se implementaron durante el periodo de alimentación con el concentrado probiótico en alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) del EE-I.....	44
Tabla 9. Condiciones experimentales durante la etapa de adaptación de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) en el EE-II.....	46
Tabla 10. Condiciones experimentales que se implementaron durante el periodo de alimentación con el concentrado probiótico en juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) del EE-II.....	47
Tabla 11. Seguimiento de la viabilidad de <i>L. plantarum</i> Lab 9 en el alimento almacenado a 4 °C, suministrado durante el EE- I en alevinos de tilapia roja.....	55
Tabla 12. Seguimiento de la viabilidad de <i>L. plantarum</i> Lab 9 en el alimento almacenado a 4 °C, suministrado durante el EE- I en juveniles de tilapia roja.....	55
Tabla 13. Seguimiento de la viabilidad de <i>L. plantarum</i> Lab 9 en el alimento almacenado a 4 °C, suministrado durante el EE-II en juveniles de tilapia roja.....	56
Tabla 14. Parámetros de calidad de agua registrados en las piletas que recibieron el tratamiento probiótico y control durante el EE-I.....	58
Tabla 15. Parámetros de calidad de agua registrados en los acuarios que recibieron el tratamiento probiótico y control durante el EE-II.....	58
Tabla 16. Resultados del análisis microbiológico del intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) posterior al tratamiento con el probiótico.....	59
Tabla 17. Resultados del análisis microbiológico del intestino de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) posterior a los 10, 20 y 30 días de tratamiento con el probiótico.....	60

Tabla 18. Tiempo de permanencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lab 9 en el intestino de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) luego de suspender la alimentación con el concentrado probiótico.....	62
Tabla 19. Parámetros de crecimiento de alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) posterior a 30 días de alimentación con el concentrado probiótico y concentrado control.....	68
Tabla 20. Parámetros de crecimiento de juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) posterior a 10, 20 y 30 días de alimentación con el concentrado probiótico y concentrado control.....	70

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Localización de Langostinos del Llano Ltda.....	42
Figura 2. Localización Universidad del Valle.....	43
Figura 3. Instalaciones utilizadas durante el EE-I.....	45
Figura 4. Instalaciones utilizadas durante el EE-II.....	48
Figura 5. Micrografía en microscopía de luz del intestino de un juvenil de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) alimentado durante 10 días con el concentrado probiótico.....	64
Figura 6. Micrografía TEM del intestino de un juvenil de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.).....	66
Figura 7. Porcentajes de sobrevivencia de los alevinos y juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) a los 30 días de tratamiento con el concentrado probiótico y control.....	72
Figura 8. Porcentajes de sobrevivencia de los juveniles de tilapia roja ( <i>Oreochromis</i> sp.) a los 10, 20 y 30 días de tratamiento.....	73

ANEXO

ANEXO A. Composición proximal e ingredientes del concentrado Mojarra 38®.....	Pág. 93
---	------------

## GLOSARIO

**ACLARAMIENTO:** también conocida como diafanización, técnica histológica mediante la cual el tejido de estudio se torna transparente o claro, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

**ACUICULTURA:** abarca todas las actividades dirigidas a la producción y comercialización de organismos acuáticos como peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas.

**ADHERENCIA:** proceso de unión de bacterias a células u otras superficies, previo a la proliferación.

**AD LIBITUM:** expresión del latín que significa a saciedad, denota el libre acceso de un animal al alimento donde el consumo está regulado según sus necesidades biológicas.

**AGUA SALOBRE:** es aquella que tiene más sales disueltas que el agua dulce, pero menos que el agua de mar. Técnicamente, se considera agua salobre la que posee entre 0,5 y 30 g de sal por L.

**ALEVINO:** Cría de pez que incluye la fase comprendida entre la larva y el juvenil.

**ANTAGONISMO:** interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos.

**ANTIBIÓTICOS:** son las drogas de origen natural o sintético que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos.

**ANTICUERPO:** proteína producida por los linfocitos de la sangre como respuesta a la presencia de un antígeno en el organismo.

**CAUTIVIDAD:** mantener en cautiverio a los animales, dentro de espacios cerrados o limitados por barreras físicas.

**CEPA:** variante fenotípica de una especie.

**CICHLIDAE:** es una familia compuesta principalmente por peces de agua dulce propios de América Central y del sur, África y Madagascar. Se encuentran generalmente en pozas y orillas de ríos y/o lagunas, siempre cerca de piedras, incluso pueden estar presentes en aguas salobres. Su alimentación depende del lugar geográfico de procedencia, existen cíclidos omnívoros y herbívoros.

**COLONIZACIÓN:** capacidad de las bacterias para establecerse y multiplicarse en la piel y/o mucosas del huésped en cantidades suficientes que permitan mantener un cierto número poblacional; sin que su presencia determine respuestas clínicas ni inmunológicas.

**COMPOSICIÓN PROXIMAL:** incluye un análisis de la humedad, proteínas, lípidos, cenizas, fibra y carbohidratos que permiten determinar el valor nutritivo y/o calórico de los alimentos.

**CONCENTRADO EXTRUDIZADO:** alimento elaborado mediante un proceso de extrusión, una forma de cocción rápida, continua y homogénea. Mediante este proceso mecánico de inducción de energía térmica y mecánica, se aplica al alimento procesado alta presión y temperatura durante un breve espacio de tiempo. Como resultado, se producen una serie de cambios en la forma, estructura y composición del producto.

**DIENTES BICÚSPIDES:** los dientes que tienen dos puntas redondeadas o cúspides.

**DIENTES TRICÚSPIDES:** los dientes que tienen tres puntas redondeadas o cúspides.

**DIGESTIÓN:** es el proceso de transformación de los alimentos previamente ingeridos en sustancias más sencillas para ser absorbidos.

**DOSIS PROBIÓTICA:** se puede definir como la concentración de microorganismos probióticos (en número de células/mL probiótico) que está disponible para el organismo acuático.

**EFECTO BACTERICIDA:** proceso causante de la eliminación de bacterias (manifestación – consecuencia – de agentes causantes de eliminación de bacterias)

**EFECTO BACTERIOSTÁTICO:** proceso causante de la inhibición de crecimiento bacteriano (manifestación –consecuencia – de agentes causantes la inhibición del crecimiento bacteriano)

**ESTADÍO:** estado diferenciado en el proceso o desarrollo de un organismo.

**ESTANQUE:** depósito construido para recoger agua para la cría de peces.

**FITOPLANCTON:** o plancton vegetal, son un conjunto de organismos microscópicos que tienen capacidad fotosintética y viven dispersos en el agua, haciendo parte de la dieta de organismos acuáticos. Dentro de este grupo se incluyen las diatomeas y las algas verdes azules así como otras formas de algas.

**GANANCIA DE PESO:** se refiere a la ganancia de peso obtenido por un individuo en un determinado periodo de tiempo

**GANANCIA DIARIA DE PESO:** estima cuantos gramos diarios aumentan los individuos.

**HOSPEDERO:** organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí.

**IMAGEN LANDSAT:** imagen tomada del satélite Landsat para la observación en alta resolución de la superficie terrestre.

**INCLUSIÓN:** en histología, técnica utilizada para incluir y envolver los cortes finos de tejido, con una sustancia de consistencia firme generalmente parafina.

**INCREMENTO DE LONGITUD:** es el aumento de longitud durante el periodo experimental.

**INGESTIÓN:** proceso por el cual los alimentos son incorporados al organismo, mediante estructuras especializadas como los tentáculos en los pulpos, las mandíbulas en los insectos, el pico en las aves y la boca en los mamíferos.

**JUVENIL:** estadio del pez que no alcanza la madurez sexual.

**LACTOBACILLUS:** o bacteria del ácido láctico, es un género de bacterias Gram positivas anaerobios aerotolerantes, denominados así debido a que la mayoría de sus miembros convierte la lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico.

**LIPASA:** enzima que hidroliza las grasas desdoblándolas en glicerol y ácidos grasos.

**LONGITUD TOTAL:** extensión que comprende la medida desde la boca hasta el final de la cola del pez

**MICROBIOTA:** se refiere a la comunidad de microorganismos vivos residentes en el intestino.

**NASA:** red de pesca

**PARÁMETROS BIOMÉTRICOS:** medidas o datos biológicos que se toman de un individuo para realizar un análisis particular.

**PATÓGENO:** todo agente que puede producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero (humano, animal o vegetal) sensiblemente predispuesto.

**PERMANENCIA:** condición o cualidad de mantenerse sin alteraciones en un estado o lugar.

**PERSISTENCIA:** condición o cualidad de mantener un efecto posterior a la eliminación de la causa.

**PESO HUMEDO:** peso de una muestra, incluido el del agua que contiene.

**PILETA:** tanque de concreto donde se mantienen a los peces durante la experimentación

**PREBIÓTICO:** son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al hospedero mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un grupo de bacterias en el intestino, mejorando así la salud del organismo hospedero.

**PROBIÓTICO:** microorganismos vivos, que al ser administrados en dosis adecuadas confieren beneficios en la salud del hospedero.

**PROMOTOR:** factor que promueve o induce un efecto particular.

**PROTEASA:** enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas.

**RACIÓN:** cantidad de alimento proporcionado a un animal durante un periodo de tiempo específico.

**SEMBRAR O INOCULAR:** introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación

**SIFONEO:** técnica mediante la cual se extraen desechos y agua del fondo del acuario mediante una manguera unida a un dispositivo de boca ancha.

**SISTEMA DE CULTIVO ACUÍCOLA:** clasificación de según la densidad poblacional de animales acuáticos.

**SOBREVIVENCIA:** es la capacidad de un individuo para poder conservar su vida, especialmente cuando es a pesar de una situación difícil, el hábitat donde vive, en general en donde su vida corre peligro.

**TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO:** es el incremento de peso expresado en porcentaje, ganado por un individuo durante un periodo de observación.

**TILAPIA:** es el nombre genérico con el que se denomina a un grupo de peces de origen africano, que habita mayormente en regiones tropicales del mundo. Entre sus especies más conocidas destacan la del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y la azul (*Oreochromis aureus*).

**TILAPIA ROJA:** también conocida como mojarra roja, es un híbrido del cruce de cuatro especies de Tilapia: tres de ellas de origen africano y una cuarta israelí. Este pez tiene una buena demanda en el mercado, buen crecimiento y un buen desarrollo.

**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA:** expresión del número viable de bacterias por muestra.

**VIABILIDAD:** capacidad de la bacteria de dividirse y formar una colonia en medio de cultivo, expresada como UFC.

**ZOOPLANCTON:** el plancton animal, son organismos generalmente microscópicos que se alimentan de materia orgánica ya elaborada y se encuentran suspendidos en los cuerpos de agua. Este grupo está constituido principalmente por protistas, por larvas de equinodermos, de moluscos, de crustáceos y de peces.

## LISTA DE SIGLAS

Ac: código de acuario  
cm: centímetro  
EE-I: ensayo experimental uno  
EE-II: ensayo experimental dos  
g: gramos  
GDP: ganancia diaria de peso  
GP: Ganancia de peso  
H&E: hematoxilina y eosina  
h: horas  
IL: incremento de longitud  
L: litros  
m: metro  
M: molar  
min: minutos  
mL: mililitro  
msnm: metros sobre el nivel del mar  
N: Norte  
nm: nanometros  
O: Oeste  
°C: grados centígrados  
P: código piletta  
ppm: partes por millon  
t: toneladas  
TEC: tasa especifica de crecimiento  
TEM: microscopía electrónica de transmisión  
v/v: volumen/volumen  
Vbg: Verbigracia  
µm: micrómetros

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, la tilapia roja (*Oreochromis* sp.) es catalogada como una de las especies más representativas e importantes en el sector acuícola (Vega et al., 2011; Usgame et al., 2008), especialmente en los departamentos de Huila, Tolima, Antioquia, Santander, Meta y Valle del Cauca, los cuales aportan aproximadamente con el 58,5 % de la producción nacional (FAO-Incoder 2011), producción que en el año 2011 alcanzó las 48,433 t (Autoridad Nacional de Pesca y Acuicultura [AUNAP], 2013).

En respuesta a su alta demanda y con el fin liderar los mercados acuícolas, los acuicultores incrementan las densidades de cultivo en niveles cada vez mayores (FAO, 2009), situación que genera condiciones altamente estresantes que predisponen a los organismos acuáticos al ataque de bacterias patógenas y/o bacterias oportunistas, las cuales afectan directamente el crecimiento, la sobrevivencia, el desarrollo en general y la calidad final del producto (Rubio et al., 2010; Pedrosa, 2009; Yousefian y Amiri, 2009; Aly et al., 2008; Marzouk et al., 2008; Escobar et al., 2006)

Para prevenir (uso profiláctico) y tratar (usos terapéutico) el ataque de dichos agentes nocivos, se utilizan una serie de antibióticos, cuyo uso masivo e indiscriminado ya sea para el tratamiento de enfermedades o para promover el crecimiento (Brunt y Austin, 2008; Hernández, 2005), inducen la proliferación de bacterias resistentes y efectos muchas veces irreversibles en el animal, en el ambiente, en la microbiota gastrointestinal de los organismos e incluso en el hombre, como consecuencia de la acumulación de residuos tóxicos (Nayak, 2010; Villamil y Martínez 2009; Aly et al., 2008; Wang et al., 2008a; Escobar et al., 2006)

Un método alternativo al uso de antibióticos que está ganando gran aceptación en la industria acuícola, por ser más amigable con el medio ambiente, no perjudicial en el hospedero y que representa bajos costos de producción (Kolndadacha et al., 2011; Khalafalla, 2010; El-Haroun et al., 2006), son los “Probióticos” o microorganismos vivos que confieren beneficios a la salud (FAO/WHO, 2001).

Entre los probióticos mayormente utilizados en la acuicultura se encuentran el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) (Ringø et al., 2010), las cuales tienen la capacidad de producir compuestos antibacterianos como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido butírico y otros ácidos de cadena corta que inhiben o matan a bacterias nocivas como patógenos e influyen positivamente en el estado de salud del individuo (Jatobá et al., 2008; Escobar et al., 2006; Estrada et al., 2005). Algunas investigaciones reportan que este tipo de bacterias probióticas maximizan sus efectos cuando se adhieren y colonizan el tracto intestinal (TI) de los peces (Van y Miller, 2011; Vendrell et al., 2008; Balcázar et al., 2007; Carnevali et al., 2006), debido a que de esta manera se prolonga el periodo de contacto del probiótico con el hospedero y con ello sus efectos benéficos en el organismo (Lara, 2011).

Dichos efectos se han hecho evidentes después de un determinado tiempo de alimentación con el probiótico, tiempos que han incluido periodos tan cortos como de seis días (Jöborn et al., 1997) e incluso de hasta siete meses (Ali et al., 2010), sin embargo en la mayor parte de los casos los periodos de alimentación se establecen sin bases sólidas y sin ningún tipo de criterio (Qi et al., 2009). En este contexto es importante considerar el tiempo durante el cual se suministre el

probiótico, debido a que las respuestas que estos microorganismos ejercen en el hospedero, pueden ir en función del tiempo de exposición que estos tengan con el individuo (Sharifuzzaman y Austin, 2009).

Teniendo en cuenta los beneficios que aportan los probióticos en el bienestar y salud de los organismos acuáticos, en este estudio se evaluó el efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento y sobrevivencia en alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.), a partir del estudio de la adherencia, tiempos de administración y permanencia de esta bacteria en el intestino de tilapia. Para este fin fueron llevados a cabo análisis microbiológicos intestinales, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de luz, biometrías de cada uno de los individuos y recuentos diarios de la mortalidad.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tilapia es una de las especies dulceacuícolas más exitosa a nivel mundial, debido a su rápido crecimiento, fácil reproducción, alta productividad, gran tolerancia a las altas densidades de cultivo, alta adaptabilidad a las condiciones del medio, gran resistencia a enfermedades y a factores extremos (Aguilar et al., 2010; Delgado et al., 2009; Barrera y Paz, 2006; Escobar et al., 2006; Lara et al., 2002). Sin embargo, y pese a todas estas cualidades la intensificación de dicho cultivo, provoca que los organismos estén sometidos a continuas condiciones de estrés, condiciones que retardan los crecimientos y favorecen la propagación de enfermedades infecciosas, las principales causantes de mortalidades masivas (Kubitza, 2009). En Colombia, en los departamentos de Huila, Tolima y Meta se estima que en conjunto un 20% de las tilapias cultivadas en estanque y un 30% en jaulas, se pierden cada año debido a las enfermedades (Autoridad Nacional de Pesca y Acuicultura [AUNAP], 2013).

Como alternativa a esta problemática se generalizó el uso de antibióticos, los cuales no solo se promueven para el tratamiento y control de enfermedades, sino como un método para acelerar el crecimiento animal. No obstante, su manejo inapropiado puede causar efectos adversos no sólo en el animal, sino también perturbaciones medio ambientales, al igual que en la salud humana (Romero et al., 2012; Defoirdt et al., 2011; Hernández, 2005). A fin de reducir el uso indiscriminado de antibióticos en los sistemas de producción y de garantizar la obtención de animales de alta calidad y con alto valor nutricional (Merrifield et al., 2010a; Escobar et al., 2006; Burr y Gatlin, 2005), se exploran otras alternativas como los probióticos o microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas en el alimento o en el agua de cultivo, favorecen el crecimiento y el estado de salud del organismo hospedero (Gatesoupe, 2008).

Entre los efectos benéficos que los probióticos pueden ejercer en los organismos acuáticos se evidencia el crecimiento y sobrevivencia, debido a la capacidad de dichos microorganismos para mejorar el balance de la microbiota intestinal, estimular el apetito, favorecer la producción de varios tipos de vitaminas, minerales y elementos traza que proporcionan energía y ayudan a estimular el crecimiento y fortalecer la salud y la nutrición del organismo (Faramarzi et al., 2011; Khalafalla, 2010; Merrifield et al., 2010a; Denev et al., 2009; Villamil y Martínez, 2009; Marzouk et al., 2008; Escobar et al., 2006).

Dichos efectos dependen de la capacidad que tengan los microorganismos probióticos de adherirse y colonizar la superficie intestinal, condición que se considera necesaria para prolongar los efectos benéficos del probiótico en el hospedero y para favorecer la formación de una barrera de protección o defensa que limite la fijación directa o interacción de las bacterias patógenas al intestino de los peces (Lara, 2011; Denev et al., 2009), reduciendo el daño a la mucosa intestinal, las infecciones por patógenos, efectos dañinos en la salud del organismo y con ello una mejora en las tasas de sobrevivencia (Merrifield et al., 2010a).

Sin embargo, adherirse y colonizar el tracto intestinal constituye un verdadero desafío, dado que el microorganismo debe soportar las continuas variaciones de pH, las concentraciones de sales biliares y jugos pancreáticos, los constantes movimientos y flujos, la tasa de evacuación gastrointestinal relativamente alta entre otros factores, que hacen de este órgano un lugar hostil de difícil adherencia y colonización permanente (Escobar et al., 2006; Ringø et al., 2001). Por lo cual para prevenir la

remoción o eliminación del probiótico del intestino, surge la necesidad de que su suministro sea continuo, con el fin de que el microorganismo alcance al menos un predominio artificial en el tracto intestinal del hospedero y que los efectos benéficos puedan prolongarse por mucho más tiempo (Balcázar et al., 2007; Burr y Gatlin, 2005; Fuller, 2006; Verschuere et al., 2000).

Cabe resaltar que los probióticos no suelen colonizar el intestino permanentemente, su presencia es temporal (Van y Miller, 2011; Fuller, 2006), de hecho se desconoce durante cuánto tiempo sobrevive el microorganismo en el hospedero o cuánto dura el efecto probiótico después de cesar su suministro en la dieta (Verschuere et al., 2000), situación que dependerá principalmente del tipo de probiótico utilizado, del hospedero, de la viabilidad del producto y del tiempo durante el cual se lo administre (Mohapatra et al., 2012; Nayak, 2010; Fuller, 2006). Este último, es uno de los factores clave que pueden determinar la permanencia y la inducción de una respuesta favorable del probiótico en el animal hospedero (Merrifield et al., 2010a; Nayak, 2010; Qi et al., 2009), dado que tiempos de administración muy cortos como de seis días (Jöborn et al., 1997) pueden ser pocos suficientes para obtener el efecto deseado y tiempos de administración muy largos podrían generar efectos muchas veces adversos en los individuos (Sun et al., 2010).

Aunque en la actualidad existen varias investigaciones en acuicultura que evalúan el efecto de los probióticos en el desempeño de los parámetros zootécnicos, en las tasas de sobrevivencia, en los parámetros inmunológicos y en la nutrición; en Colombia, se desarrollan pocos trabajos en el área, de hecho solo existe un probiótico aprobado para uso en acuicultura denominado *Bactocell*, situación que impulsa a la investigación de nuevos probióticos que permitan obtener animales con buenos rendimientos, sanos y de buena calidad, especialmente en especies de importancia comercial como lo es la tilapia roja.

Basándose en los efectos significativos que los probióticos otorgan en la salud de los organismos acuáticos, y ante la falta de estudios en Colombia que promuevan su utilización, en esta investigación se utilizó un probiótico potencial *Lactobacillus plantarum* Lab 9, una bacteria que fue directamente aislada de tilapias adultas por Villa (2009) y que demostró mediante pruebas *in vitro* propiedades antagónicas y de competencia frente a diversos microorganismos patógenos destacados en acuicultura, gran resistencia a pH bajos, producción de sustancias antimicrobianas y otras características que permitieron determinar que esta bacteria es un candidato probiótico óptimo que se puede implementar en los sistemas de cultivo de tilapia roja.

Basándose en los impactos significativos que los probióticos otorgan en la salud de los organismos acuáticos, en esta investigación se utilizó un probiótico potencial *Lactobacillus plantarum* Lab 9, una bacteria que fue directamente aislada de tilapias adultas por Villa (2009) y que demostró mediante pruebas *in vitro* propiedades antagónicas y de competencia frente a diversos microorganismos patógenos destacados en acuicultura, gran resistencia a pH bajos, producción de sustancias antimicrobianas y otras características que permitieron determinar que esta bacteria es un candidato probiótico óptimo que se puede implementar en los sistemas de cultivo de tilapia roja.

Por tanto, tomando como referencia el potencial probiótico que esta bacteria ácido láctica demostró en el trabajo de Villa (2009), en esta investigación se evaluó el efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 como promotor de crecimiento y sobrevivencia en juveniles y alevinos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.).

## 2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Para responder al objetivo de este estudio, se planteó la siguiente pregunta de investigación.

*Lactobacillus plantarum* Lab 9 actúa como promotor de crecimiento y sobrevivencia en juveniles y alevinos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.)?

### 3. JUSTIFICACIÓN

Con la finalidad de contrarrestar los efectos nocivos que la intensificación de cultivos genera en las tilapias (alteración en las tasas de crecimiento y mortalidades) y de minimizar el uso indiscriminado de antibióticos en los sistemas de producción, varios países están implementando el uso de probióticos. Sin embargo, en Colombia, la disponibilidad de dichos probióticos es limitada, de hecho solo existe un producto probiótico destinado para uso en acuicultura denominado Bactocell® (bacteria ácido láctica *Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5M), el cual ha sido aprobado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y autorizado por la Unión Europea como aditivo para alimentación de salmónidos y camarones (Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios (ICA), 2013). Esta situación pone de manifiesto la gran necesidad de buscar microorganismos probióticos potenciales que puedan ser implementados en los diferentes sistemas de producción acuícola, preferiblemente nativos o aislados a partir del mismo hospedero en el cual se van a usar, debido a que los probióticos importados probablemente contengan microorganismos que no resistan los ambientes en los cuales se van a desarrollar ni las condiciones de cultivo propias de nuestro país.

Un microorganismo nativo que podría ser un candidato probiótico potencial en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) es *Lactobacillus plantarum* Lab 9, la cual demostró mediante pruebas *in vitro* características probióticas que podrían resultar favorables en condiciones reales de cultivo. Por lo tanto, aprovechando la potencialidad de esta bacteria, en este estudio se evaluó el efecto de *L. plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento y sobrevivencia en alevinos y juveniles de tilapia roja, con la finalidad de no solo promover la salud y el bienestar de esta especie, sino también de aportar conocimiento científico que pueda ser relevante para mejorar su productividad.

De igual manera, con la idea de poder optimizar los efectos de *L. plantarum* Lab 9 en las tilapias, en esta investigación se estudiaron los tiempos de administración del probiótico, uno de los factores importantes que determinan la efectividad de estos microorganismos, pero que desafortunadamente no se los considera al momento de implementarlos en los sistemas de producción acuícola. Los resultados de este estudio, podrán motivar a los investigadores y acuicultores a que se programen tiempos de alimentación con el probiótico, a fin de optimizar los efectos y de minimizar los costos de producción.

Finalmente y siguiendo todas estas consideraciones, la incorporación de probióticos en los sistemas de cultivo de tilapia roja podrían ejercer varios atributos funcionales sobre el crecimiento, desarrollo, sobrevivencia y en general sobre el mantenimiento de la salud, dando como resultado productos inocuos libres de compuesto químicos, semillas sanas y disminución de los tiempos de crianza para alcanzar la talla comercial.

#### 4. OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento y sobrevivencia en alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.)

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la adherencia de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 al intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.).
2. Determinar el efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.).
3. Estimar la sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) luego de la alimentación con *Lactobacillus plantarum* Lab 9.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Estudios sobre *Lactobacillus plantarum* Lab 9.

Villa (2009), aisló y caracterizó microorganismos ácido lácticos del intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp.), los cuales fueron sometidos a una serie de pruebas experimentales con el fin de determinar la existencia de características probióticas. Algunas de las pruebas *in vitro* que llevo a cabo fueron: actividad de catalasa, formación de gas a partir de glucosa, tolerancia a NaCl, resistencia a pH bajos, análisis de producción de ácidos orgánicos, ensayos de inhibición frente a diferentes patógenos y antibióticos, entre otras pruebas que son indispensables para establecer si un microorganismo es un candidato probiótico potencial. Con estos ensayos el autor determinó que *Lactobacillus plantarum* Lab 9 es una bacteria ideal para ser utilizada como probiótico en cultivos de tilapia roja, debido a que presentó el mejor desempeño frente a las pruebas antes mencionadas.

Londoño (2011), elaboró una ración probiótica a partir de la impregnación de *L. plantarum* Lab 9 en un concentrado comercial. Para ello diseñó y seleccionó un medio de crecimiento cuyos componentes (suero de leche bovino, leche de soya, salvado de trigo, sacarosa) permitieron el crecimiento óptimo de esta bacteria. Esta selección la llevo a cabo mediante cinéticas de fermentación, en las cuales consideró el pH, conteo de células viables UFC/mL, consumo de azúcares y producción de ácidos orgánicos, como variables fundamentales que le permitieron determinar las mejores condiciones para la producción de biomasa y de inóculos de *L. plantarum* Lab 9. Igualmente, en este mismo estudio se determinó las condiciones adecuadas para el proceso de secado del concentrado Mojarra 38®, una vez este haya sido impregnado con el inóculo (45 °C de temperatura y 0.8 m/s de flujo de aire). Éste último paso se realizó a fin de minimizar la contaminación por el personal de campo encargado y por microorganismos que podrían aprovechar las condiciones de humedad en el alimento.

### 5.2 Estudios sobre la inclusión o impregnación del microorganismo probiótico en el alimento.

Existen algunos estudios en acuicultura, en los cuales se impregna el microorganismo probiótico en la ración de alimento, se homogeniza y se lleva a incubación para permitir el crecimiento bacteriano sobre el sustrato. Este protocolo lo han seguido Bolívar (2008); Buglione et al. (2008); Vieira et al. (2008) y Ramírez (2005) en raciones de concentrado para alimentación de camarones (*Litopenaeus vannamei*); Dotta (2008) y Jatobá et al. (2008) en raciones para suministro en tilapia negra (*Oreochromis niloticus*); Pereira (2013) en raciones para surubíes (*Pseudoplatystoma* sp.); y Jurado (2010) para raciones de cerdos.

### 5.3 Estudios sobre adherencia de microorganismos probióticos en el intestino.

Se considera que un microorganismo probiótico puede ejercer sus efectos benéficos en la salud del organismo cuando éste se adhiere y coloniza el intestino (Rinkinen et al., 2003), debido a que de esta manera el probiótico puede persistir durante más tiempo en tracto intestinal y por tanto tener una mayor posibilidad de que sus beneficios se prolonguen (Saarela et al., 2000). A continuación se describen algunos estudios en los cuales se demostró la adherencia del microorganismo probiótico al intestino (Tabla 1).

Tabla 1

*Adherencia de microorganismos probióticos en el intestino, posterior a su administración en la dieta.*

Organismo Hospedero	Microorganismo Probiótico	Tiempo de Admin.	Viabilidad en alimento (UFC/g)	Viabilidad en Intestino (UFC/g)	Referencia
Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	70 días	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	Carnevali et al. (2006)
Robalo-peva ( <i>Centropomus parallelus</i> )	<i>Lactococcus</i> sp. <i>L. plantarum</i>	30 días	10 <sup>8</sup>	1.10 x 10 <sup>5</sup> 1.96 x 10 <sup>4</sup>	Souza et al. (2010)
Salmón Atlántico ( <i>Salmo salar</i> L.)	<i>Carnobacterium divergens</i>	15 semanas	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup>	Kristiansen et al. (2011)
Truca arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>Pediococcus acidilactici</i>	10 semanas	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	Mucosa ~ 10 <sup>3</sup> Digesta ~ 10 <sup>5</sup>	Merrifield et al. (2011b)
Tilapia nilótica ( <i>O. niloticus</i> )	<i>Bacillus toyoi</i> <i>Bacillus subtilis</i>	63 días	4 x 10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	Nakandakare (2010)
Tilapia nilótica ( <i>O. niloticus</i> )	<i>Pediococcus acidilactici</i>	6 semanas	2.8 x 10 <sup>6</sup>	1.59 x 10 <sup>5</sup>	Standen et al. (2013)

Fuente: Esta investigación.

#### 5.4 Estudios sobre probióticos incorporados en el agua de cultivo.

Algunos probióticos que se utilizan como aditivos en el agua de cultivo especialmente del género *Bacillus*, no solo generan beneficios en la salud del organismo hospedero, sino que además desempeñan un papel significativo en la descomposición de la materia orgánica, reducción de los niveles de nitrógeno, amonio, nitritos, nitratos, sulfuro de hidrógeno H<sub>2</sub>S, mejorando así la calidad del agua (Mohapatra et al., 2012; Nayak, 2010; Qi et al., 2009). En la Tabla 2 se detallan algunos reportes.

Tabla 2  
Efecto de los probióticos suministrados en el agua de cultivo.

Organismo Hospedero	Microorganismo Probiótico	Tiempo de suministro en agua de cultivo	Viabilidad del probiótico	Efecto positivo	Referencia
Tilapia negra ( <i>O. niloticus</i> )	<i>E. faecium</i>	Cada 4 durante 40 días	1 x 10 <sup>7</sup> UFC/mL	GDP, PF	Wang et al. (2008b)
Tilapia negra ( <i>O. niloticus</i> )	<i>Bacillus</i> sp.	Cada 15 durante 134 días	1 x 10 <sup>3</sup> UFC/mL	GP, TEC	Apún et al. (2009)
Tilapia negra ( <i>O. niloticus</i> )	<i>B. coagulans</i> <i>R. palustris</i>	Cada 2 durante 40 días	1 x 10 <sup>7</sup> UFC/mL	PF, GDP, TEC	Zhou et al. (2010)
Tilapia negra ( <i>O. niloticus</i> )	<i>B. subtilis</i>	2 meses	-----	Disminuyó las lesiones generadas por <i>F. columnare</i>	Mohamed y Refatat (2011)
Lenguado japonés ( <i>P. olivaceus</i> )	<i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	Durante 5 días	10 <sup>4</sup> UFC/mL	Sobrevivencia y menor concentración de amonio	Cha et al. (2013)
Tilapia mozambique ( <i>O. mossambicus</i> )	BZT® Bio-Aqua	Durante 30 días	-----	Biomasa total, GP, TEC y menor concentración de amonio	Mohamed et al. (2013)

Parámetros evaluados: GDP, ganancia diaria de peso; GP, ganancia de peso; PF, peso final; TEC, tasa específica de crecimiento. Fuente: Esta investigación.

### 5.5 Estudios sobre adherencia de microorganismos probióticos a diferentes tiempos de administración.

El tiempo de administración con el probiótico es uno de los factores importantes que puede determinar el establecimiento, la persistencia y posterior inducción de una respuesta favorable en el organismo (Qi et al., 2009; Merrifield et al., 2010a; Nayak, 2010). Algunos estudios evidenciaron que al incrementar el periodo de alimentación con el probiótico, la concentración de la bacteria probiótica en el intestino del individuo también aumenta, no obstante en otros reportes se detectaron

que la bacteria disminuye o se mantiene con una misma viabilidad conforme se extiende el periodo de alimentación con el probiótico. En la Tabla 3 se detallan estos estudios.

Tabla 3  
*Adherencia de microorganismos probióticos a diferentes tiempos de administración.*

Organismo Hospedero	Microorganismo Probiótico	Viabilidad en alimento (UFC/g)	Evaluación de adherencia	Viabilidad en Intestino (UFC/g)	Referencia
Truca arcoíris ( <i>O. mykiss</i> )	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$10^{11}$	A los 10, 20 y 30 días	Fue incrementando de $10^5$ a $10^9$	Panigrahi et al. (2005)
Bacalao atlántico ( <i>Gadus morhua</i> L.)	<i>Arthrobacter</i> sp.	$10^7 - 10^9$	A los 8, 28 y 55 días	NA	Lauzon et al. (2010)
	<i>Enterococcus</i> sp.			Día 8 = NA Día 28 = $\sim 10^5$ Día 55 = NA	
Rohu ( <i>Labeo rohita</i> )	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$10^{11}$	Cada 15 días hasta el día 60	Porcentaje de viabilidad constante desde el día 30 al 60.	Mohapatra et al. (2012)
	<i>B. subtilis</i>				
	<i>Lactococcus lactis</i>				
Pacú ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	<i>B. subtilis</i>	$10^8$	A los 7, 15, 30 y 60 días	Día 7 = $\sim 10^7$ Día 15 = $\sim 10^7$ Día 30 = NA Día 60 = NA	Vaz (2012)
	<i>Bacillus cereus</i>			Día 7 = $6 \times 10^7$ Día 15 = $1 \times 10^7$ Día 30 = $6 \times 10^7$ Día 60 = NA	

NA = No se aisló ~ = Aproximadamente. Fuente: Esta investigación.

5.6 Estudios sobre el tiempo de permanencia de microorganismos probióticos en el intestino luego de suspender su suministro en la dieta.

En la mayoría de los estudios, se observa que los microorganismos probióticos no colonizan el intestino permanentemente, sino que su concentración disminuye o desaparece tan pronto se detiene

su administración, de hecho sus efectos sobre la salud solo permanecen por breves periodos (Lara, 2011; Van y Miller, 2011). Algunos estudios que manifiestan esta situación se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4.

*Tiempo de permanencia de microorganismos probióticos en el intestino luego de suspender su suministro en la dieta.*

Organismo Hospedero	Microorganismo Probiótico	Viabilidad en alimento (UFC/g)	Tiempo de admin.	Tiempo de permanencia en intestino después de suspender el suministro del probiótico	Referencia
<i>Epinephelus coioides</i>	<i>L. plantarum</i>	$10^6 - 10^{10}$	4 semanas	Hasta una semana con una viabilidad de $\approx 10^4$	Son et al. (2009)
Tilapia ( <i>O. niloticus</i> )	<i>Ped. acidilactici</i>	$10^7$	32 días	Hasta siete días con viabilidad de $\approx 5.5 \times 10^6$ UFC/g	Ferguson et al. (2010)
Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Enterococcus pseudoavium</i>	$2 \times 10^7$	12 días	Hasta tres semanas con niveles por encima de $10^6$ UFC/g	Sugimura et al. (2011)
Pez gato ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	<i>Bacillus</i> spp.	$10^9$	7 días	Hasta tres días con viabilidad de $\approx 10^6 - 10^7$ UFC/g	Ran et al. (2012)
Tilapia ( <i>O. niloticus</i> )	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$10^8$	99 días	La permanencia de la bacteria fue de $2.3 \times 10^5$ UFC/g después de 40 días y de $9 \times 10^4$ UFC/g luego de 61 días.	Ridha y Azad (2012)
Truca arcoíris ( <i>O. mykiss</i> )	Kocuria SM1 Rhodococcus SM2	$10^8$ $10^7$	14 días	No se encontraron luego de 14 días de suministro	Sharifuzzaman et al. (2014)

Fuente: Esta investigación.

## 5.7 Estudios sobre el efecto de los probióticos en el crecimiento y sobrevivencia.

El uso de los productos probióticos ha atraído una considerable atención en la industria alimenticia como un medio para mejorar el rendimiento de la acuicultura. En los últimos años varios estudios sugieren que los probióticos proporcionan beneficios nutricionales, mejoran el rendimiento en el crecimiento y la utilización del alimento (Tabla 5).

Tabla 5.

*Efecto de los probióticos en el crecimiento y la sobrevivencia.*

Organismo Hospedero	Microorganismo Probiótico	Viabilidad en alimento UFC/g	Tiempo de admin.	Efecto positivos	Autor
Pez gato africano ( <i>Clarias gariepinus</i> )	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$3.01 \times 10^7$	12 semanas	PF, TEC, TEP sobrevivencia	Al-Dohail et al. (2009)
Tilapia negra ( <i>O. niloticus</i> )	<i>Biogen</i> <sup>®</sup> Mezcla enzimas, <i>B. subtilis</i> y extractos	$6 \times 10^7$	14 semanas	GP, GDP, TEC, TCA	Mehrim (2009)
Beluga ( <i>Huso huso</i> )	<i>Lactobacillus curvatus</i>	$2 \times 10^9$	50 días	TEC	Askarian et al. (2011)
Esturion persa ( <i>Acipenser persicus</i> )	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	$9 \times 10^9$			
Truca arcoíris ( <i>O. mykiss</i> )	<i>L. acidophilus</i>	$10^3 - 10^6$	90 días	GP, TEC, TCA, TEP, sobrevivencia	Faramarzi et al. (2011)
Tilapia negra ( <i>O. niloticus</i> )	<i>L. plantarum</i>	$10^6$	30	GP, TEC, TEP, sobrevivencia	Abumourad et al. (2013)
Rohu ( <i>Labeo rohita</i> )	<i>L. plantarum</i>	$1 \times 10^8$ $1 \times 10^{10}$	60 días	TAC, TEC	Giri et al. (2012)
Platija ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	<i>Lactococcus lactis</i>	$10^8$	5 semanas	GP, TEC, TEP, EA	Heo et al. (2013)

EA= Eficiencia alimenticia GDP= Ganancia diaria de peso GP= Ganancia de peso PF= Peso final TCA= Tasa de conversión alimenticia TEC= Tasa específica de crecimiento TEP = Tasa de eficiencia proteica. Fuente: Esta investigación.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Generalidades sobre tilapia roja (*Oreochromis* sp.).

Las tilapias son miembros de la familia Cichlidae nativa de los ríos y lagos de África y Madagascar que se distribuyeron en forma natural al medio oriente y hacia los años de 1950 a 1970 al resto del mundo tanto en zonas tropicales como subtropicales, conquistando todo tipo de mercados a nivel mundial (Gómez y Balcázar, 2008; Quiñónez, 2008). Este tipo de peces, se adaptan a diversos hábitats, que incluyen aguas cálidas, dulces, salobres o salinas como también a cuerpos de agua de poca corriente (lénticos) donde permanecen en las zonas poco profundas y cercanas a las orillas (IRG y CNP+LH, 2009).

Entre las especies de tilapia más cultivadas se encuentra la tilapia roja *Oreochromis* sp. que es un producto del cruce de cuatro especies *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis hornorum* y *Oreochromis aureus*. Este cruce tetrahíbrido permitió la obtención de un pez cuya coloración puede ir desde rojiza hasta albina e incluso con manchas negras, coloración que ha sido de mayor acogida y demanda por el consumidor en el mercado nacional (Quiñónez, 2008).

Es una especie omnívora que se alimenta de fitoplancton, zooplancton, larvas de peces, pequeños invertebrados y alimentos concentrados. Las adaptaciones estructurales a este tipo de dieta son principalmente un largo intestino muy plegado, dientes bicúspides o tricúspides sobre las mandíbulas y la presencia de dientes faríngeos que se utilizan para poder cortar y rasgar plantas y hojas fibrosas (SINGOAGRO S.C et al., 2009).

#### 6.1.1 Parámetros de calidad de agua óptimos para el cultivo de tilapia.

En las prácticas acuícolas, el agua debe cumplir con ciertas características físico-químicas que permitan el correcto crecimiento y desarrollo del pez (IRG y CNP+LH, 2009), de ahí la importancia de llevar un seguimiento de la calidad del agua. Algunos parámetros que se tienen en cuenta en el cultivo de tilapia son:

pH: valores por encima o debajo del rango óptimo para tilapia (6,5-9), causan cambios de comportamiento en los peces, como letargia, inapetencia, retardos en el crecimiento y en la reproducción.

Temperatura: el rango óptimo de temperatura para el cultivo de tilapias fluctúa entre 24 °C y 32 °C, aunque este rango puede tener una variación de 5 °C por debajo del rango óptimo. Sin embargo cuando la temperatura es menor a 15 °C los peces dejan de comer y tienen tasas de sobrevivencia muy baja.

Amonio: los valores de amonio deben fluctuar entre 0,01 ppm a 0,1 ppm (valores cercanos a 2 ppm son críticos). El amonio es tóxico y se hace más tóxico cuando el pH y la temperatura del agua están elevados, los niveles de tolerancia para la tilapia se encuentra en el rango de 0,6 a 2,0 ppm.

La concentración alta de amonio en el agua causa bloqueo del metabolismo, daño en las branquias, afecta el balance de sales, produce lesiones en órganos internos, inmunosupresión y susceptibilidad a las enfermedades

Oxígeno disuelto: para mantener un cultivo exitoso de tilapia, los valores de oxígeno disuelto deberían estar por encima de los 4 mg/L, valores menores al indicado, reducen el crecimiento e incrementa la mortalidad. En la Tabla 6 se describen los rangos óptimos establecidos para el cultivo de tilapia.

Tabla 6.  
*Parámetros Físico-Químicos óptimos del agua para el cultivo de tilapia*

Parámetro	Rangos Óptimos
pH	6,5-9
Temperatura (°C)	24-32 °C
Amonio (ppm)	0,01-0,1 ppm
Oxígeno Disuelto (mg/L)	> 4,5 mg/L

Fuente: Singoagro et al. (2009)

#### 6.1.2 Generalidades del intestino de tilapia.

El intestino es un órgano complejo y multifuncional, que además de la digestión y la absorción de alimento, es fundamental para el equilibrio hidroelectrolítico y la regulación endocrina (Gómez et al., 2010; Pérez et al., 2010), constituye un importante sitio inmunológico que actúa como barrera de defensa física y química contra microorganismos nocivos y otros componentes dañinos que entran al organismo a través de la ingestión del alimento o por medio de la ingestión del agua circundante (Grosell et al., 2011).

En el intestino se pueden diferenciar tres regiones funcionalmente diferentes, la anterior, media y posterior (Escobar et al., 2006). En la región anterior comienza la digestión química de los alimentos, en la porción media se realiza principalmente la absorción y en la región posterior se reducen gradualmente las funciones digestivas y de absorción, con un aumento simultáneo de los niveles de producción de moco. En algunos casos no hay una clara distinción morfológica entre intestino medio y posterior (Grosell et al., 2011; Abdullah, 2005; Guillaume et al., 2004; Ringø et al., 2003)

Un rasgo común en las tilapias y en numerosas especies de peces es el cambio morfológico intestinal a lo largo de su desarrollo, cambio que va desde un simple tubo recto indiferenciado en la etapa larval a un complejo patrón en espiral en la etapa adulta (Grosell et al., 2011; Tengjaroenkul, 2000). En peces herbívoros y omnívoros como la tilapia, esta variación morfológica también incluye el alargamiento del intestino, el cual alcanza 4 a 6 veces el largo total de su cuerpo (Escobar et al., 2006; Vásquez, 2004).

### 6.1.3 Microbiota intestinal en los peces.

Esta principalmente constituida por bacterias aerobias, anaerobias facultativas y bacterias anaerobias obligadas. Esta microbiota se clasifica como autóctona o nativa (adherente) y microbiota alóctona (transitoria). El primer grupo de microorganismos dada su capacidad de tolerar el bajo pH de los jugos gástricos y de resistir a la acción de los ácidos biliares pueden colonizar firmemente la superficie epitelial del estómago y del intestino para convertirse en la microbiota autóctona del hospedero. Por otra parte la microbiota transitoria o bien carece de la capacidad de colonizar la superficie epitelial o es incapaz de competir con otras bacterias presentes en el epitelio haciendo que su permanencia sea temporal en el organismo. Dicha microbiota proviene del agua, de los alimentos y de otras partes del cuerpo del individuo (Ganguly y Prasad, 2011; Nayak, 2010; Escobar et al., 2006; Rosmini et al., 2004; Ringø et al., 2003).

En los peces marinos los géneros dominantes pertenecen a *Alteromonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Photobacterim*, *Pseudomonas* y *Vibrio*, mientras que en las especies de peces de agua dulce tienden a estar dominados por miembros de los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, representantes de la familia Enterobacteriaceae, y las bacterias anaerobias obligadas o estrictas de los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Eubacterium* (Balcázar et al., 2006; Nayak, 2010; Pérez et al., 2010; Ringø et al., 2010). Otro grupo de bacterias que forman parte de la microbiota asociada a los peces de agua dulce y marina son las bacterias ácido lácticas. Sin embargo, no suelen ser dominantes en el TI de estos organismos, pero bajo ciertas condiciones como un sistema de cultivo en estanques, pueden tener una abundancia de hasta  $1.1 \times 10^6$  células  $g^{-1}$  del peso corporal del pez (Nayak, 2010; Denev et al., 2009; Buntin et al., 2008; Verschuere et al., 2000).

Durante toda la vida del animal esta biota intestinal tiene funciones metabólicas, tróficas y de protección (Denev et al., 2009), e incluso representan un profundo impacto en el desarrollo anatómico, fisiológico e inmunológico del animal (Ringø et al., 2010). Algunos de estos beneficios incluyen el metabolismo de nutrientes, la actividad antagónica contra los patógenos, regulación endocrina de la digestión, producción de materiales fisiológicamente activos como enzimas, aminoácidos y vitaminas entre otros (Ganguly y Prasad, 2011; Merrifield et al., 2011a; Nayak, 2010; Wang et al., 2008a; Balcázar et al., 2006).

### 6.1.4 Factores que alteran la microbiota intestinal en los peces.

Debido a factores medioambientales y a las condiciones de cultivo a las cuales se ven sometidas muchas especies acuáticas, como son altas densidades de siembra, limitada calidad del agua, cambios repentinos en la dieta, suministro de antibióticos, desinfección o limpieza de los estanques antes de la siembra, transporte de los individuos y pescas continuas (Barandica, 2010; Nayak, 2010; Burr y Gatlin, 2005; Lara et al., 2002), es poco probable que se pueda lograr la estabilidad de la microbiota gastrointestinal del organismo hospedero, dado que no son ambientes apropiados para su establecimiento (Denev et al., 2009; Verschuere et al., 2000).

## 6.2 Microorganismos probióticos.

La palabra probiótico fue utilizada por primera vez por Lilly y Stilwell en 1965 para referirse a “cualquier sustancia secretada por un organismo capaz de estimular el crecimiento de otro”. Roy Fuller años más tarde acorta este concepto y los redefine como aquellos microorganismos vivos,

principalmente bacterias y levaduras que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el balance microbiano intestinal” (Merrifield et al., 2010a). La FAO/WHO (2001), definen a los probióticos como microorganismos vivos que confieren beneficios en la salud.

En el caso de acuicultura, el concepto de probiótico no solo involucra el tracto intestinal del organismo, sino también considera el agua circundante o agua de cultivo en el cual se desenvuelven los organismos acuáticos (Denev et al., 2009). Según Gatesoupe (1999), los probióticos en acuicultura se definen como “células microbianas que al ser administradas ingresan al tracto gastrointestinal y se mantienen vivas para mejorar la salud”, Verschuere et al. (2000), los redefine como “microorganismos vivos que tienen un efecto benéfico sobre el huésped mediante la modificación de la comunidad microbiana, garantizando una mejor utilización del alimento o mejora del valor nutricional del mismo, una mejor respuesta del hospedero a la enfermedad y una mejora de la calidad de su entorno ambiental”.

Existen un número considerable de preparaciones a base de probióticos que están comercialmente disponibles y se administran a peces, camarones y moluscos, ya sea en el agua o incorporados en el alimento (Wang et al., 2008a). La mayoría estos probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y a los géneros *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*, *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Flavobacterium* (Ringø et al., 2010; Escobar et al., 2006).

Muchos de estos probióticos forman una parte integral de las prácticas de cultivo al mejorar el crecimiento y resistencia a enfermedades (Nayak, 2010). Esta estrategia ofrece innumerables ventajas para superar las limitaciones y efectos secundarios que los antibióticos y otras drogas generan en el hospedero y en el ambiente (Sahu et al., 2008). Además ciertos probióticos como aditivos para el agua también pueden desempeñar un papel importante en la descomposición de materia orgánica, la reducción del nitrógeno y el nivel de fósforo, así como el control de amoníaco, nitritos y sulfuro de hidrógeno (Nayak, 2010).

#### 6.2.1 Funciones de los probióticos.

Algunos de los efectos potenciales que ejercen las bacterias probióticas en sistemas de cultivo acuícola, se resumen en los informes de Villamil y Martínez (2009); Buntin et al. (2008); Gatesoupe (2008); Tovar et al. (2008).

1. Los probióticos mejoran las tasas de crecimiento y supervivencia de los organismos cultivados.
2. Mantienen un ambiente de cultivo adecuado al mejorar la calidad del agua
3. Tienen impacto en el sistema inmune de los animales acuáticos cultivados, al subir el nivel de anticuerpos y la actividad de los macrófagos.
4. Su establecimiento en el TI del hospedero contribuye al balance de la microbiota intestinal.
5. Previenen la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos. Algunas de estas bacterias benéficas producen sustancias específicas con efecto antibiótico.

6. Aporte de moléculas de importancia fisiológica para el hospedero, lo que conlleva a un mejor crecimiento, maduración de sistema digestivo, supervivencia y calidad larvaria.

#### 6.2.2 Mecanismos de acción de los probióticos.

Algunos de los mecanismos de acción vinculados a la administración de probióticos se describen a continuación:

- Exclusión competitiva. Es un fenómeno por el cual los microorganismos probióticos al adherirse y colonizar el intestino del hospedero, previenen o reducen la colonización de bacterias patógenas (Lara, 2011; Pérez, 2011), mediante la competencia de nutrientes esenciales o energía disponible (Kesarcodi et al., 2008; O'Sullivan, 2001), la producción de compuestos con efecto bactericida o bacteriostático (bacteriocinas, lisozimas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos de cadena corta como ácido láctico y acético) que perturban el desarrollo, crecimiento y el metabolismo de otros microorganismos (Denev et al., 2009; Ng et al., 2009; Gatesoupe, 2008; Vázquez et al., 2005)

- Estimulación de la respuesta inmune. Existen muchos reportes de la actividad inmunoestimulante que ejercen los probióticos en los peces y camarones. En general, la inmunidad puede ser mejorada por el probiótico en tres formas (Fuller, 1992):

- a) El aumento de la actividad de los macrófagos, que se asocia directamente con una mayor capacidad de fagocitar microorganismos o partículas de carbono.
- b) El aumento de la producción de anticuerpos sistémicos y el interferón (un agente antiviral no específico).
- c) El aumento de anticuerpos locales en las superficies mucosas tales como la pared del intestino.

-Contribución a la digestión enzimática. Algunas investigaciones sugieren que los microorganismos tienen un efecto beneficioso en los procesos digestivos de los animales acuáticos, mediante la producción de enzimas extracelulares, como proteasas, lipasas y de elementos necesarios para el crecimiento, además la actividad microbiana en el tracto digestivo puede ser una fuente de vitaminas o aminoácidos esenciales para el hospedero (Merrifield et al., 2010a; Balcázar et al., 2006; Escobar et al., 2006).

#### 6.2.3 Selección de cepas probióticas.

De acuerdo con Nwogu et al. (2011); Merrifield et al. (2010a); Balcázar et al. (2008); Buntin et al. (2008); Gómez y Balcázar (2008) y Duwat et al. (2000) algunas consideraciones importantes para la selección de una cepa probiótica son las siguientes:

- a) El microorganismo probiótico debe ser aislado preferiblemente del hospedero en el cual se va a usar.
- b) Tolerancia a ácidos y bilis. La cepa probiótica debe resistir las enzimas de la cavidad oral (lisozima, amilasa), el pH bajo del estómago, así como a las concentraciones de sales biliares y jugos pancreáticos segregadas en el intestino.
- c) Adherencia a las células intestinales. Para sobrevivir y competir en un ecosistema complejo como es el intestino de los organismos, un microorganismo necesita adherirse al epitelio intestinal. Si el microorganismo no presenta esta habilidad, entonces se convertirá en un organismo transitorio, limitando sus efectos benéficos.

- d) Asentamiento en un nicho. Es la medida de adaptación de un organismo para sobrevivir y competir en un ecosistema que en este caso es el intestino del organismo. Esta medida de adaptación del microorganismo probiótico dependerá principalmente de los mecanismos de acción que ejerzan.
- e) Evaluación de las propiedades antagónicas hacia uno o más patógenos claves que sean mayormente registrados en el huésped a estudiar.
- f) Evaluación de la patogenicidad de los probióticos.
- g) Evaluación de los efectos potenciales de los probióticos en el hospedero.
- h) Evaluación de la susceptibilidad del probiótico a los procesos industriales y de la viabilidad durante el almacenamiento.
- i) Análisis costo económico/beneficio.

#### 6.2.4 Bacterias ácido lácticas: probióticos potenciales en la acuicultura.

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de bacterias Gram positivas, de morfología bacilar o cocoide, no esporuladas, microaerófilas o anaeróbicas facultativas (Quiñónez, 2008). La mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para acuicultura pertenecen a este grupo de bacterias, de los cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* y *Bifidobacterium* (Sihag y Sharma, 2012; Nayak, 2010; Villamil et al., 2009; Sahu et al., 2008; Balcázar et al., 2006).

En peces, las BAL se han descrito como parte de la microbiota normal de los organismos (Villa, 2009; Lara, 2003; Poot, 2001), también están asociadas con la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Escobar et al., 2006; Lara, 2003), como promotoras del crecimiento (Apún, 2007; El-Haroun et al., 2006; Lara et al., 2002) y en algunos casos, favorecen la sobrevivencia de peces infectados experimentalmente (Aly et al., 2008; Pirarat et al., 2006).

*Lactobacillus plantarum* Lab 9 es un tipo de BAL, la cual fue aislada y caracterizada a partir de muestras de intestino de individuos sanos de tilapia roja por Villa (2009). Según lo reportado por el autor esta bacteria se caracteriza por estar dispuesta en parejas, forma pequeñas colonias circulares con borde entero y de color azul claro en medio de cultivo MRS con azul de anilina, son catalasa negativa no productora de gas. Resiste diferentes valores de pH (2.5-6.0), sin embargo su viabilidad aumenta a bajos valores de pH.

Además, esta bacteria produce diferentes ácidos orgánicos tales como: ácido cítrico, succínico, propiónico y láctico, este último en una concentración de 48,29 g/L, compuestos que están asociados con la actividad antagónica frente a microorganismos patógenos. Igualmente, en pruebas de isomería para el ácido láctico, *L. plantarum* Lab 9 presentó isómeros del tipo DL o L<sup>+</sup> los cuales son aptos para el consumo humano o animal.

En pruebas in vitro, *L. plantarum* inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus agalactiae* y *Flexibacter* sp. y tiene una alta resistencia a diferentes antibióticos, principalmente carbenicilina, tetraciclina, cloramfenicol y florfenicol, lo que sugiere que *L. plantarum* Lab 9 puede ser un potencial sustituto de los antimicrobianos utilizados en los cultivos intensivos.

#### 6.2.5 Limitaciones que presenta el estudio en probióticos destinados para acuicultura.

Algunos de los fracasos en la investigación con microorganismos probióticos se atribuyen a factores como: la inadecuada selección de cepas probióticas, a los métodos de producción, a la forma y el vector de administración, a la dosificación y la duración del tratamiento con el probiótico (Denev et al., 2009). Sin embargo, en los organismos acuáticos hay que tener en cuenta que el efecto del probiótico también dependerá de la especie de pez que se esté evaluando, del estatus fisiológico del hospedero, de las condiciones del cultivo, de los factores medioambientales y del objetivo específico de la aplicación del probiótico (nutrición, resistencia a enfermedades, alimentación, entre otros) (Merrifield et al., 2010a).

Uno de los inconvenientes que afronta el trabajo con microorganismos probióticos es la pérdida de la viabilidad del probiótico durante el proceso de elaboración de los piensos, dado que las condiciones de procesamiento de alimentos acuícolas son físicamente más intensivos en comparación con el alimento para animales terrestres. Por lo tanto, la incorporación de probióticos en los alimentos acuícolas sigue siendo limitado a nivel industrial, particularmente debido a la estabilidad térmica (Merrifield et al., 2010a; Burr y Gatlin, 2005).

Otro de los pormenores que se ha evidenciado con los probióticos es que pueden convertirse en patógenos e infectar al organismo hospedero. En el caso de los humanos se debe tener cuidado en administrar los probióticos en individuos muy debilitados, inmunocomprometidos o con sangrado intestinal, debido a que dichos probióticos pueden convertirse en patógenos oportunistas. La FAO y la OMS recomiendan pruebas como patrones de resistencia a los antibióticos, actividad metabólica, producción de toxinas, pruebas de infectividad en modelos animales inmunocomprometidos y evaluación de los efectos adversos en el consumidor (Castro y Rovetto, 2006). En este contexto, con el desarrollo de la acuicultura bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Carnobacterium* se han postulan como probióticos potenciales y como no patógenas, sin embargo han sido las protagonistas de un creciente número de enfermedades (Wang et al., 2008a; Ringø y Gatesoupe, 1998).

Con respecto a lo anterior, antes de abogar por el uso de un candidato probiótico es de gran importancia realizar diferentes pruebas *in vitro* que demuestren los posibles efectos benéficos del probiótico a evaluar, debido a que estas pruebas a menudo han permitido identificar probióticos que han sido eficaces y otros no tan potenciales (Denev et al., 2009). Sin embargo una prueba ya sea positiva o negativa no puede predecir el verdadero efecto en condiciones *in vivo* (Verschuere et al., 2000), incluso los resultados obtenidos de una cepa probiótica a partir de pruebas de laboratorio no pueden ser extrapolados a otra cepa, aunque pertenezcan a la misma especie (Kolndadacha et al., 2011). Por esta razón el efecto de los probióticos candidatos para la acuicultura también deben evaluarse *in vivo*, esto implica la administración del probiótico en el organismo, el monitoreo de su crecimiento, colonización y sobrevivencia.

Finalmente, uno de los principales obstáculos es la producción de productos probióticos a escala industrial, debido a que las especies candidatas deben cumplir con una reglamentación muy estricta y demostrar su eficacia y seguridad en los animales, los consumidores y el medio ambiente (Merrifield et al., 2010a).

#### 6.2.6 Influencia del tiempo de administración sobre el efecto probiótico.

El tiempo de administración con el probiótico se considera un factor importante que puede incidir en el establecimiento, la permanencia y posterior estimulación de la respuesta inmune en el hospedero (Nayak, 2010), sin embargo, aunque este factor representa gran relevancia en la inducción de una respuesta favorable en el organismo, es un tema que ha sido poco investigado (Merrifield et al., 2010a).

Se ha demostrado que la administración de probióticos a corto plazo, puede ser eficaz en la colonización (Kim y Austin 2006; Nikoskelainen et al., 2003), estimulación del sistema inmunológico (Sharifuzzaman y Austin 2009; Balcázar et al., 2007) y protección contra microorganismos patógenos (Pieters et al., 2008; Newaj-Fyzul et al., 2007); no obstante se ha detectado que las cepas probióticas no perduran en el tracto gastrointestinal por periodos que van más allá de una a tres semanas después de haber suspendido el probiótico, lo que significa que sus efectos se pierden luego de que éste se remueve del organismo (Kim y Austin 2006; Panigrahi et al., 2005). Esta declinación puede ser debida a la falta de capacidad de las cepas probióticas de colonizar y multiplicarse en el intestino (Nayak, 2010).

En el caso de la alimentación a largo plazo, también es posible encontrar reportes en los que se evidencie los beneficios de los probióticos en el crecimiento y sobrevivencia de trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Bagheri et al., 2008) y tilapia negra (*O. niloticus*) (Ghazalah et al., 2010), protección contra síndrome de compresión de columna vertebral (VCCS) en trucha arcoíris (Aubin et al., 2005), estimulación de la respuesta inmune en tilapia negra (Ali et al., 2010). No obstante aunque se han detectado beneficios después de un largo periodo de alimentación, existen otros estudios como los de Panigrahi et al. (2005); Sun et al., (2010) y Giri et al. (2012) en los cuales se ha evidenciado cierto tipo de alteración en algún parámetro del sistema inmunológico, luego de haber prolongado el suministro de microorganismos probióticos en trucha arcoíris (*O. mykiss*), (*Epinephelus coioides*) y rohu (*Labeo rohita*), respectivamente.

En este contexto es necesario considerar que la respuesta inmune es con frecuencia disminuida cuando se suministran inmunoestimulantes durante periodos prolongados, debido a que en casos extremos pueden inducir a la inmunosupresión (Bricknell y Dalmo, 2005). Aunque no está claro si este es el caso de la aplicación a largo plazo de los probióticos, se debe considerar la posibilidad de que el uso de probióticos puede ser no pertinente cuando su administración es constante y durante largos periodos (Merrifield et al., 2010a).

## 7. METODOLOGÍA

Para mayor comprensión, la metodología que se desarrolló en este trabajo de investigación se describe por objetivos específicos.

En esta investigación se realizaron dos ensayos experimentales:

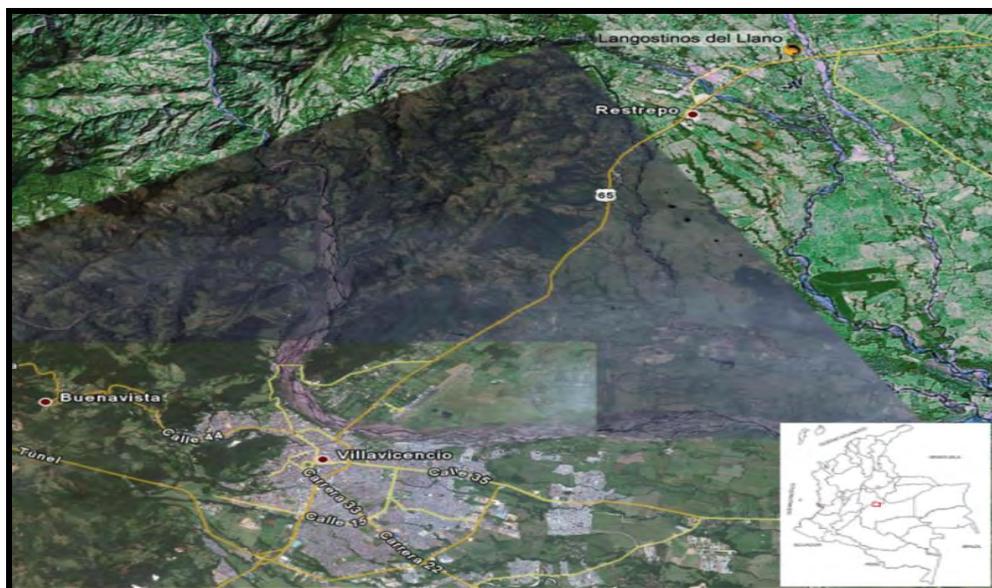
Ensayo experimental I (EE-I). Consistió en un estudio piloto llevado a cabo en el municipio de Restrepo (Meta) durante el mes de Enero hasta Abril del 2011 y tuvo como finalidad el entrenamiento en el manejo y las condiciones de cultivo propias de los alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Este ensayo permitió identificar la respuesta de estos organismos y el tiempo de administración con el concentrado probiótico.

Ensayo experimental (EE-II). Se realizó durante el mes de Febrero hasta Junio del 2012 en la ciudad de Cali (Valle del Cauca) y consistió en la aplicación de un diseño experimental en el estadio juvenil de tilapia roja. En este ensayo se evaluó la adherencia de la bacteria a diferentes tiempos de administración, la permanencia de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino tras suspender la alimentación del animal con el concentrado probiótico, el crecimiento y la sobrevivencia.

### 7.1 Localización de la zona de estudio: EE-I.

Se realizó en las instalaciones de la empresa Langostinos del Llano Ltda (Figura 1), ubicada en la vereda Caney Bajo, municipio de Restrepo (Meta), con coordenadas 4°16'8" N y 73°32'55" O, a una altitud de 450 msnm y una temperatura promedio de 26 °C.

Figura 1. Localización de Langostinos del Llano Ltda; Restrepo, Meta.

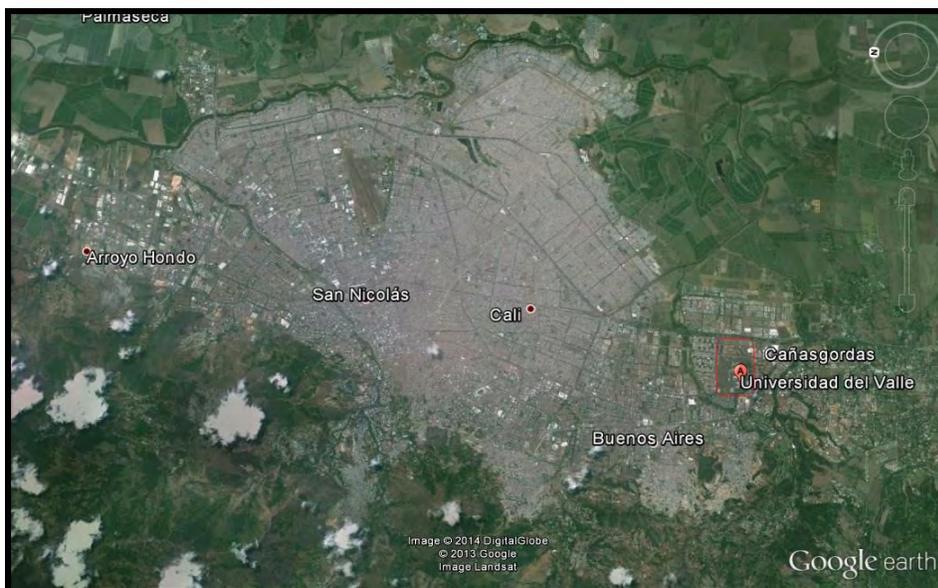


Fuente: Google earth 2013 ©. Imagen Landsat del 23 de Julio de 2013.

## 7.2 Localización de la zona de estudio: EE-II.

Se realizó durante el mes de Febrero hasta Junio del 2012, en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Marina de la Universidad del Valle (Figura 2), localizado en la ciudad de Cali (Valle del Cauca) con coordenadas 3°27'00" N y 76°32'00" O, a una altitud de 995 msnm y una temperatura promedio de 23 °C.

Figura 2. Localización Universidad del Valle; Cali, Valle del cauca.



Fuente: Google earth 2013 ©. Imagen Landsat del 4 de Septiembre de 2013.

## 7.3 Diseño experimental del EE-I.

Se transfirieron 360 alevinos y 300 juveniles machos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) con un peso húmedo promedio de  $2,99 \pm 0,18$  g y  $20,41 \pm 0,57$  g, respectivamente, en contenedores plásticos desde los estanques de tierra, hasta el laboratorio de manejo de las instalaciones de Langostinos del Llano, donde, se distribuyeron aleatoriamente en cada una de las piletas, en grupos de 60 y 50 individuos para un total de seis piletas por estadio.

Posterior a su distribución, los peces iniciaron un periodo de adaptación a las nuevas condiciones de confinamiento durante 15 días, tiempo en el cual se alimentaron a saciedad (*ad libitum*) y de forma manual con una ración de concentrado comercial Mojarra 38®, sin bacteria probiótica. En la Tabla 7 se describen las condiciones experimentales a las cuales fueron sometidos los animales durante la etapa de adaptación.

Tabla 7

Condiciones experimentales durante la etapa de adaptación de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) en el EE-I.

Estadío	N° total de piletas	N° de individuos por pileta	Tipo de alimento suministrado	Ración diaria	Frecuencia de alimentación	Horario de alimentación	Tiempo de administración
Alevinos	6	60	Mojarra 38® comercial	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	Desde las 8:30 cada dos horas	15 días
Juveniles		50			4 veces al día	08:30 a.m 10:30 a.m 02:00 p.m 04:00 p.m	

Concluida la etapa de adaptación, para alevinos y juveniles se seleccionaron aleatoriamente tres piletas donde se alimentaron con concentrado probiótico (Mojarra 38® impregnado con *L. plantarum* Lab 9) y tres para la alimentación con concentrado control (Mojarra 38® impregnado con medio de cultivo estéril).

Se administró una ración diaria *ad-libitum* distribuida en cinco raciones al día, dos raciones se administraron en horas de la mañana (8:00 a.m, 10: 00 a.m) y tres raciones en horas de la tarde (12:00 p.m, 2:00 p.m y 4:00 p.m). El ensayo se realizó con aquellos individuos que sobrevivieron a la etapa de adaptación en cada estadío. La asignación de los tratamientos y las condiciones experimentales se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

Condiciones experimentales que se implementaron durante el periodo de alimentación con el concentrado probiótico en alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) del EE-I.

Estadío	Tratamiento	N° de Réplicas para cada tratamiento	N° inicial de individuos Por pileta	Alimento suministrado	Ración diaria	Frecuencia de alimentación	Tiempo de administración
Alevinos	Probiótico	P19 P21 P23	54 55 55	Concentrado probiótico*	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	30 días
	Control	P20 P22 P24	55 56 55	Concentrado control**			
Juveniles	Probiótico	P15 P18 P24	47 49 45	Concentrado probiótico*	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	30 días
	Control	P14 P21 P22	49 45 47	Concentrado control**			

P Código de cada pileta

\* Concentrado Mojarra 38® impregnado con *L. plantarum* Lab 9.

\*\* Concentrado Mojarra 38® impregnado con medio de cultivo estéril sin *L. plantarum* Lab 9.

Teniendo en cuenta el número de piletas disponibles, la facilidad para la manipulación de los individuos y el registro adecuado de los datos, en esta investigación se trabajó inicialmente con juveniles y una vez obtenidos todos los datos, se llevó a cabo el ensayo con los alevinos.

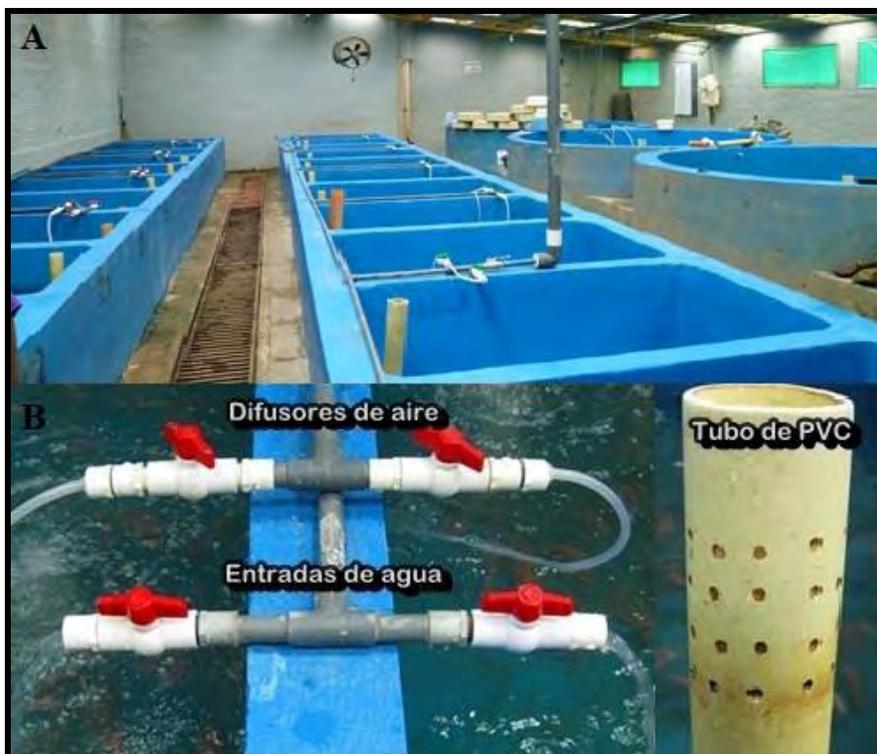
Culminados los 30 días de tratamiento con el concentrado probiótico, se evaluó el crecimiento, sobrevivencia y la adherencia de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja, a partir de parámetros biométricos (peso y longitud), registro diario de la mortalidad de los individuos y análisis microbiológico, respectivamente.

### 7.3.1 Descripción de las principales condiciones de trabajo en EE-I.

-Piletas. El ensayo se desarrolló en piletas de concreto de 145 cm de largo, 88 cm de ancho y 40 cm de alto con una capacidad de 510,4 L de agua. Cada una disponía de una entrada y salida de agua, tubos PVC de 60-65 cm de longitud con pequeñas aberturas en uno de sus extremos que permitían la liberación de agua durante el proceso de recambio y evitaban la salida accidental de cualquiera de los animales por el conducto de desagüe (Figura 3A).

-Aireación. Cada una de las piletas estuvo provista de piedras difusoras de aire conectadas a un blower SweetWater (Aquatic eco-systems, Apopka Blvd, USA), con el fin de garantizar la oxigenación permanente de los individuos (Figura 3B).

Figura 3. Instalaciones utilizadas durante el EE-I. A) Piletas de concreto donde fueron mantenidos los alevinos y juveniles de tilapia roja; B) Implementos de las piletas.



Fuente: Empresa Langostinos del Llano Ltda.

- Desinfección de instalaciones. Para mantener las condiciones de asepsia, las piletas fueron lavadas y desinfectadas con cloro granulado en una concentración de 30 mg/L y se dejaron reposar durante aproximadamente 24 h para evitar toxicidad en los individuos (OIE, 2006).

-Recambios de agua. En cada pileta, diariamente y antes del suministro de la primera ración de alimento se removió el concentrado remanente y las heces mediante sifoneo. Se realizaron recambios del 30% de agua y cada cuatro días o cuando las condiciones fueron requeridas (agua muy turbia) se hicieron recambios del 50%. El agua empleada fue bombeada directamente del “Caño San Ignacio” (Restrepo-Meta), próximo a la zona de estudio.

#### 7.4 Diseño experimental del EE-II.

Se utilizaron 180 juveniles machos de tilapia roja provenientes de “Langostinos del Llano” con un peso húmedo promedio de  $9,81 \pm 0,86$  g. Estos se distribuyeron aleatoriamente en 18 acuarios, cada uno con 10 individuos y se sometieron a una etapa de adaptación durante 15 días, periodo en el cual fueron alimentadas con el concentrado comercial Mojarra 38<sup>®</sup> sin la bacteria probiótica (Tabla 9).

Tabla 9

*Condiciones experimentales durante la etapa de adaptación de juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) en el EE-II.*

Nº total de acuarios	Nº de individuos por acuario	Alimento suministrado	Ración diaria	Frecuencia de alimentación	Horario de alimentación	Tiempo de administración
18	10	Mojarra 38 <sup>®</sup> comercial	<i>Ad libitum</i>	4 veces	8:30 a.m 10:30 a.m 2:00 p.m 4:00 p.m	15 días

A partir de aquí, se inició la evaluación del probiótico sobre juveniles y para ello se aplicaron dos tratamientos con tres réplicas cada uno así: (i) Grupo probiótico, juveniles alimentados con el concentrado probiótico (Mojarra 38<sup>®</sup> impregnado con *L. plantarum* Lab 9). (ii) Grupo control, juveniles alimentados con el concentrado (Mojarra 38<sup>®</sup>) sin impregnación con la bacteria probiótica. Estos tratamientos se aplicaron en tres tiempos de administración, tal como se muestra en la Tabla 10.

Los juveniles de cada tratamiento se alimentaron con una ración *ad libitum*, dividida en cinco raciones al día, dos en horas de la mañana (9:30 a.m y 11:30 a.m) y tres en horas de la tarde (1:00 p.m, 2:30 p.m y 4:00 p.m). La descripción de los tratamientos y de las condiciones experimentales que se manejaron durante el tratamiento probiótico se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10

*Condiciones experimentales que se implementaron durante el periodo de alimentación con el concentrado probiótico en juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) del EE-II.*

Tratamiento	N° de Réplicas para cada tratamiento	N° Inicial de individuos por acuario	Alimento suministrado	Ración diaria	Frecuencia de alimentación	Tiempo de administración
Probiótico	Ac1	10	Concentrado probiótico*	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	10 días
	Ac7	10				
	Ac13	10				
Control	Ac9	10	Concentrado control**	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	10 días
	Ac10	10				
	Ac16	10				
Probiótico	Ac2	10	Concentrado probiótico*	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	20 días
	Ac6	10				
	Ac11	10				
Control	Ac4	10	Concentrado control**	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	20 días
	Ac14	10				
	Ac17	10				
Probiótico	Ac	10	Concentrado probiótico*	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	30 días
	Ac	10				
	Ac	10				
Control	Ac	10	Concentrado control**	<i>Ad-libitum</i>	5 veces al día	30 días
	Ac	10				
	Ac	10				

Ac Código de cada acuario.

\* Concentrado Mojarra 38® impregnado con *L. plantarum* Lab 9.

\*\* Concentrado Mojarra 38® impregnado con medio de cultivo estéril sin *L. plantarum* Lab 9

Después de los 10, 20 y 30 días de tratamiento con el concentrado probiótico, se evaluó el crecimiento de los individuos a partir de parámetros biométricos (peso y longitud), la sobrevivencia mediante el registro diario de la mortalidad y, la adherencia de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino de juveniles de tilapia roja a través de análisis microbiológico, microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

#### 7.4.1 Descripción de las principales condiciones de trabajo en EE-II.

-Acuarios. Los juveniles de tilapia roja se mantuvieron en acuarios de 50 cm de largo, 30 cm de ancho y 24 cm de alto con una capacidad de 36 L de agua (Figura 4). Cada uno de los acuarios estuvo provisto de una bomba aireadora con dos salidas, cada una de ellas conectadas a una piedra difusora y a un filtro.

*Figura 4.* Instalaciones utilizadas durante el EE-II. Acuarios donde fueron mantenidos los juveniles de tilapia roja.



Fuente: Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Marina de la Universidad del Valle.

-Desinfección de instalaciones. Previo a la recepción de los animales, los acuarios fueron lavados y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio, a una concentración de 20 mL/L, por un periodo de dos días. Posterior a este tiempo los acuarios se enjuagaron y secaron a temperatura ambiente. Los filtros de cada acuario se lavaron al inicio del ensayo y cada cuatro días.

-Recambios de agua. En cada uno de los acuarios, diariamente y antes del suministro de la primera ración de alimento se removió el concentrado remanente y las heces mediante sifoneo. Se realizaron recambios parciales del 50% de agua durante la etapa de adaptación y recambios del 70% del agua durante el tratamiento con el probiótico. El agua que se empleó para estos recambios fue recolectada directamente del sistema de acueducto, la cual previamente se dejó reposar durante aproximadamente 24 h en una solución con sal (4 g/L), dolomita (0,08 g/L) y bicarbonato (0,08 g/L) antes de utilizarla para los recambios diarios. El agua recolectada de los acuarios que recibieron el concentrado probiótico, fue tratada con cloro antes de ser descartada.

#### 7.5 Registro de parámetros de calidad de agua.

Se realizó durante el periodo en el cual se suministraron los tratamientos a los individuos de tilapia, tanto en el EE-I como en el EE-II, tal como se describe a continuación:

##### 7.5.1 Registro de los parámetros de calidad de agua durante el EE-I.

Cada cinco días se hizo un seguimiento de las variables fisicoquímicas: temperatura (°C), pH y amonio (mg/L). Los datos de temperatura se tomaron con un medidor profesional de temperatura EC59 de Martini Instruments (Milwaukee Instruments Inc, Rocky Mount, USA), el pH y amonio fueron monitoreados con el Kit de calidad de agua FF-1A (Hach, Loveland, USA), el cual provee de reactivos y equipos para titulación mediante conteo de gotas y medición colorimétrica utilizando discos de color de gradiente continuo.

### 7.5.2 Registro de los parámetros de calidad de agua durante el EE-II.

Cada cinco días se llevó a cabo un registro de las variables fisicoquímicas. La temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/L) fueron monitoreados con una sonda multiparamétrica YSI 85 (YSI incorporated, Ohio, USA). Las medidas del pH fueron tomadas con un pHmetro Bench Top MP511 (San-Xin Instrumentation Factory, Shanghai, China).

Toda la información se organizó en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel®, y se realizó el análisis estadístico que se describe en el acápite 7.10.

### 7.6 Preparación de la dieta experimental.

En este estudio la dieta experimental consistió en la utilización de un alimento comercial denominado concentrado Mojarra 38® (Anexo A), al cual se le incluyeron algunas modificaciones para la impregnación con la bacteria probiótica y se le denominó Concentrado Probiótico (Mojarra 38® impregnado con *L. plantarum* Lab 9).

La bacteria probiótica utilizada para generar el concentrado probiótico fue obtenida y caracterizada previamente en el estudio realizado por Villa (2009) y se encuentra disponible en el cepario del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Marina de la Universidad del Valle.

Activación de la bacteria probiótica y preparación de inóculo para impregnación. A partir de un stock de trabajo, se verificó la pureza mediante tinción Gram. Posterior a ello se tomó una asada y se sembró en 10 mL de caldo MRS (de man rogose Sharp-Oxoid), se llevó a incubación durante 24 h a 35°C, y una vez activada la bacteria se preparó un inóculo en medio de cultivo estadístico (Para 100 mL de medio se utiliza suero de leche 14 g; leche de soya 0,6 g; salvado de trigo 1 g; sacarosa 0,6 g). El inóculo se preparó al 10% v/v para posterior impregnación, todos los procedimientos y condiciones de preparación de inóculo se siguieron de acuerdo con la metodología descrita por Londoño (2011). La composición y preparación del medio estadístico se siguió de acuerdo con la metodología desarrollada por Ramírez (2005).

Impregnación del concentrado comercial con la bacteria probiótica. Para obtener la cantidad de alimento a utilizar en cada EE (ensayo experimental), se pesaron 250 g de concentrado comercial Mojarra 38® y una vez obtenido el inóculo al 10% v/v, se mezclaron estos dos componentes manualmente, se llevó a incubación por 3 h a 35 °C en una incubadora BD 53 (Binder, Tuttlingen, Alemania) y posterior secado a 45 °C de temperatura y 0,8 m/s de flujo de aire, este procesamiento permitió la impregnación del concentrado con la bacteria probiótica y evitó la contaminación microbiológica del alimento. Todo el procedimiento de impregnación se realizó en la planta piloto de Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Valle, siguiendo el protocolo descrito por Londoño (2011).

Preparación del concentrado control (Mojarra 38® impregnado con medio de cultivo estéril). Se preparó al 10% v/v con caldo MRS estéril (de man rogose Sharp-Oxoid) y medio estadístico, posterior impregnación y secado tal como se describió anteriormente, Londoño (2011).

Conservación y transporte del concentrado probiótico y del concentrado control. Una vez obtenidos los dos concentrados a utilizar en la alimentación de alevinos y juveniles, se empacaron en bolsas herméticas Ziploc (SC Johnson, USA) y se llevaron a refrigeración a 4 °C hasta su posterior uso.

Teniendo en cuenta que el EE-I se llevó a cabo en Restrepo-Meta, los concentrados probiótico y control fueron transportados por tierra desde la planta piloto de la Universidad del Valle, hasta las instalaciones de Langostinos del Llano en Restrepo (Meta). Cabe mencionar que este envío se realizó a temperatura ambiente, sin condiciones de refrigeración.

7.6.1 Prueba de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 contenida en el concentrado probiótico.

Se realizó el conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) a lo largo del proceso de conservación del alimento (4 °C por 30 días), para comprobar que la viabilidad de *L. plantarum* Lab 9 se mantuviera mayor o igual a  $10^{7-8}$  UFC/g en el concentrado, durante los dos ensayos experimentales (EE-I y EE-II). Cada seis días se tomó 1 g de concentrado con probiótico, el cual fue macerado en 1 mL de agua peptonada estéril y diluido serialmente (1/10 v/v) 8 veces. Posteriormente, 0,1 mL de las diluciones  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  fueron sembradas en superficie y por duplicado en placas con medio de cultivo MRS (Man Rogosa Sharpe de Merck) suplementado con azul de anilina (3 mL/L), seguidamente las cajas se incubaron a 35 °C por 48 h en una incubadora BD 53 (Binder, Tuttlingen, Alemania). El medio MRS (Man Rogosa Sharpe de Merck) con azul de anilina se utilizó para facilitar el reconocimiento de bacterias ácido lácticas como *L. plantarum* Lab 9 (Ramírez, 2005).

La viabilidad (UFC/g) del concentrado probiótico, se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} \times \text{factor de dilución} \times 10}{\text{g de muestra sembrada}}$$

7.6.2 Prueba de esterilidad del concentrado control.

Al concentrado control, se le comprobó la esterilidad aplicando el mismo procedimiento descrito en el acápite 7.6.1.

7.7 Evaluación de la adherencia de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 al intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) a través de análisis microbiológico, microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

7.7.1 Análisis microbiológico del intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-I.

Previo al análisis microbiológico y de acuerdo con las recomendaciones del ICA –Instituto Colombiano Agropecuario- entidad cooperante del proyecto macro, fue necesario evaluar el “protocolo de análisis microbiológico intestinal” y someterlo a aprobación. En tal análisis se tomaron aleatoriamente dos juveniles y dos alevinos de tilapia, que habían recibido durante 20 días alimentación con el concentrado probiótico, se disectaron, se extrajo su intestino completo y se procesaron para conteo microbiológico de acuerdo con la metodología descrita en el acápite 7.7.3

Posterior a este ensayo, se realizó el análisis microbiológico del intestino de los alevinos y juveniles de tilapia roja que culminaron los 30 días de tratamiento con el concentrado probiótico así como también aquellos alimentados con el concentrado control. Brevemente, fueron capturados aleatoriamente tres individuos por pileta de cada tratamiento (un total de 9 individuos del tratamiento con el concentrado probiótico y 9 individuos del tratamiento con el concentrado

control) mediante el empleo de una malla y una nasa de pesca previamente esterilizadas. Cada uno de los individuos fue introducido en bolsas plásticas dobles rotuladas con el número de pileta y el tratamiento respectivo, cada una con tres individuos/bolsa y 2 a 3 L de agua limpia y oxígeno para evitar la mortalidad de los individuos durante el transporte. Todas las muestras se llevaron a los laboratorios de microbiología del ICA para su posterior análisis.

7.7.2 Análisis microbiológico del intestino de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-II.

Mediante este análisis se evaluó la adherencia y la permanencia de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino de juveniles a 3 diferentes tiempos de administración (10, 20 y 30 días). Este análisis se realizó luego de suspender la alimentación con el concentrado probiótico y continuar la alimentación con el concentrado control hasta un máximo de 12 días. Se tomaron muestras de intestino hasta que el número de *L. plantarum* Lab 9 fue <30 UFC/g. La viabilidad de estas bacterias se estimó de acuerdo a la fórmula descrita en el 7.6.1.

7.7.3 Toma de muestras de intestino y procesamiento para análisis microbiológico.

El protocolo para la extracción de intestino, se aplicó tanto para los alevinos y juveniles que fueron sometidos a las condiciones del EE-I, como para las tilapias juveniles que fueron sometidas a las condiciones del EE-II.

Antes de iniciar la prueba microbiológica, cada uno de los individuos fue sometido a una sedación ligera en una mezcla de agua con hielo durante un corto periodo de tiempo hasta que el animal redujo sus movimientos (Padrós y Zarza, 2005), se le realizó una disección ventral para la extracción de todo el intestino, el material de laboratorio fue previamente esterilizado para garantizar condiciones de asepsia y bioseguridad.

Para estimar las UFC de *L. plantarum* Lab 9, se pesó 1 g de intestino, se maceró en 1 mL de agua peptonada estéril y se realizaron diluciones seriadas (1/10) 8 veces. Se tomaron 0,1 mL de cada dilución ( $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ ), se sembraron en cajas petri con medio de cultivo MRS (Man Rogosa Sharpe de Merck) suplementado con azul de anilina (3 mL/L), se homogenizaron con perlas de vidrio estériles y se incubaron a 35 °C por 48 h en una incubadora BD 53 (Binder, Tuttlingen, Alemania).

Para estimar las UFC/g se contaron cultivos con 30 – 300 colonias. Las UFC de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino fueron calculadas de acuerdo a la fórmula descrita en el acápite 7.6.1. (Jatobá et al., 2008; Vieira et al., 2008; Ramírez, 2005). En aquellos cultivos que presentaron crecimiento superior, se contaron colonias presentes en un cuarto de la caja de la dilución más alta y se aplicó el correspondiente factor de conversión.

Se verificó la pureza de las bacterias que crecieron después de 48 h de incubación mediante coloración de Gram (Marte, 2004) y observación de características macroscópicas de las colonias compatibles con *L. plantarum* Lab 9. Una vez comprobada la pureza y caracterizada la morfología, fueron resembradas en viales con caldo MRS (Man Rogosa Sharpe de Merck) y luego criopreservadas con 25% de glicerol a -20°C (Ramírez, 2005).

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el análisis microbiológico se realizó un análisis por microscopía de luz y por microscopía electrónica de transmisión (TEM) del intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) posterior al tratamiento probiótico a partir de muestras obtenidas de

juveniles (EE-II) con el número de UFC/g de *L. plantarum* Lab 9 más alto. Se utilizó como control el intestino de un juvenil alimentado con el concentrado control.

Los protocolos para el procesamiento de las muestras intestinales se basaron en la metodología propuesta por Burghardt y Droleskey (2006), Aldrich y Mollenhauer (1986), estos procedimientos que se ejecutaron en el laboratorio de Morfología e Histología de la Universidad del Valle y se describen a continuación.

-Toma y preparación de muestras de intestino para análisis con microscopía de luz. Se realizaron cortes del intestino de aproximadamente 3 mm de largo, se fijaron en formol bufferado al 10% por 24 h y se incorporaron en cassettes, los cuales fueron sometidos a un proceso de deshidratación mediante cambios graduales de alcohol de menor a mayor concentración (70%, 80%, 95%, 100%) durante 30 min en cada alcohol. Las muestras se llevaron a un proceso de aclaramiento con dos cambios de 30 min en xilol e inclusión en parafina líquida Histoplast (Richard-Allan Scientific, Thermo scientific, USA) a diferentes puntos de fusión, finalizando con 56 °C a 57 °C. Todo este procedimiento se realizó en un procesador automático de tejidos LEICA TP 1020 (Leica Biosystems, Heidelberg, Alemania).

Transcurridas las 12 horas de procesamiento, las muestras de intestino se llevaron al equipo de inclusión Shandon histocentre 3 (Thermo electron Corporation, Boston, USA), donde se colocaron en un molde de metal y llenaron con parafina líquida. Las muestras se dejaron enfriar a 4 °C para obtener el molde de parafina endurecido con las muestras de intestino. A partir de este molde, se realizaron cortes seriados de 3 a 5 µm de espesor en un micrótopo LEICA RM 2135 (Leica Biosystems, Heidelberg, Alemania), estos se dejaron reposar y estirar en un baño de flotación (agua templada 37 a 40°C) durante unos cuantos segundos, posterior a este tiempo los cortes de tejido se recogieron en portaobjetos y se secaron en una estufa con una temperatura de 38 a 40 °C durante 24 h.

Para la tinción de las placas, se eliminó la parafina con xilol, se hidrataron las muestras con concentraciones decrecientes de alcohol y se tiñeron los fragmentos de tejido con hematoxilina y eosina (H&E). El registro fotográfico se realizó a 40x y 100x con un microscopio Leica DM750 (Leica Biosystems, Heidelberg, Alemania).

-Toma y preparación de muestras de intestino para análisis con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se realizaron cortes del intestino de aproximadamente 3 mm de largo, los cuales se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en buffer fosfato (pH 7,4 y 0,1 M) y se refrigeraron durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron lavadas tres veces con buffer fosfato (0,1 M) durante 15 min. La segunda fijación se realizó con tetraóxido de osmio al 2 % por un periodo de 2 h, después de las cuales se efectuaron dos lavados de 10 min con buffer fosfato y dos lavados de cinco min con agua destilada. Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol (50%, 70%, 80%, 95%) durante 15 min en cada una. La deshidratación de las muestras continuó en alcohol al 100% por 20 min y finalmente en acetona durante 30 min. Las muestras se incluyeron en una mezcla de óxido de propileno y resina EPON® en relación 2:1 por 4 h; 1:1 por 24 h; 1:2 por 24 h. Al culminar este proceso, las muestras de intestino se incorporaron en moldes de inclusión con resina pura, y se dejaron polimerizar en horno a 70 °C por 72 h. Una vez polimerizadas las muestras, se realizaron cortes ultrafinos de 60 a 80 nm de espesor en un ultramicrotomo POWER TOME XL (Boeckeler Instruments, Arizona, USA), los cuales se recogieron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los cortes fueron examinados en la Unidad de Microscopía electrónica de la Universidad Nacional de Palmira, con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL JEM 1011 (JEOL, USA), con resolución de 0,15 nm. Las fotos fueron capturadas con una cámara digital GATAN de 8.5 megapíxeles (Gatan, Inc. Corporate Headquarters, CA, USA).

#### 7.8 Determinación del efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) a través de parámetros biométricos.

En el EE-I, los datos de peso y longitud total de cada uno de los individuos de alevinos y juveniles de tilapia roja fueron registrados al inicio y al finalizar los 30 días de tratamiento, y en el EE-II estos datos fueron tomados al inicio y al culminar los 10, 20 y 30 días de tratamiento.

Para el registro de estos datos, todos los individuos fueron capturados de cada una de las piletas o en su caso de cada uno de los acuarios, por medio de una red y/o una nasa previamente desinfectada, se registraron las medidas de peso y longitud mediante el empleo de una balanza y un calibrador o pie de rey respectivamente.

A partir de estos datos para cada tratamiento (probiótico y control) se midió la ganancia en peso (GP), la tasa específica de crecimiento (TEC), ganancia diaria de peso (GDP) e incremento de longitud (IL), de acuerdo a las fórmulas propuestas por Essa et al. (2010); Apún (2009) y El-Rhman et al. (2009).

Ganancia en peso o Crecimiento absoluto (GP): Se refiere a la ganancia de peso obtenido por un individuo en un determinado periodo de tiempo.

$$GP = W_f - W_i$$

Tasa específica de crecimiento (TEC): Es el incremento de peso expresado en porcentaje, ganado por un individuo durante un periodo de observación.

$$TEC (\%) = [(\ln W_f - \ln W_i)/t] \times 100$$

Ganancia diaria de peso (GDP): Estima cuantos gramos diarios aumentan los individuos.

$$GDP: \frac{W_f - W_i}{t}$$

Incremento de Longitud (IL): Es el aumento de longitud durante el periodo experimental.

$$IL = L_f - L_i$$

Donde,  $W_i$  es el peso inicial promedio en gramos,  $W_f$  es el peso final promedio en gramos,  $t$  son los días del periodo experimental,  $\ln$  es el logaritmo natural,  $L_i$  es la longitud Inicial promedio en centímetros y  $L_f$  la longitud final promedio en centímetros.

7.9 Estimación del porcentaje de sobrevivencia de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) luego de la alimentación con *Lactobacillus plantarum* Lab 9.

En el EE-I y EE-II se estimó el porcentaje de sobrevivencia, durante la etapa de adaptación y en el periodo de tratamiento con el probiótico. Para ello diariamente se realizó el registro de la mortalidad recolectando y contando los peces muertos encontrados sobre la superficie del agua en cada una de las piletas y acuarios, mediante el empleo de una nasa previamente esterilizada. Con estos datos se calculó el porcentaje de sobrevivencia, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Sobrevivencia} = \frac{\text{Número final de organismos}}{\text{Número inicial de organismos}} \times 100$$

#### 7.10 Análisis estadístico

Para determinar si existieron diferencias significativas entre los parámetros biométricos del grupo probiótico con respecto al grupo control en ambos ensayos experimentales (I y II), se utilizó una prueba de comparación de medias o prueba *t-student*. Para ello se determinó la homoscedasticidad y la normalidad de los datos. Cuando no se cumplió este último supuesto, se utilizó una prueba no paramétrica Mann-Whitney, la cual también se usó para establecer si existían diferencias significativas entre los parámetros de calidad de agua de ambos tratamientos. Las hipótesis a considerar fueron:

Hipótesis para la prueba *t-student*

$$H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1 = \mu_1 - \mu_2 > 0$$

Hipótesis para la prueba Mann-Whitney W

$$H_0 = \text{mediana}_1 - \text{mediana}_2 = 0$$

$$H_1 = \text{mediana}_1 - \text{mediana}_2 > 0$$

Para el parámetro de sobrevivencia se realizó un contraste de proporciones, en donde se comparó la proporción de sobrevivencia obtenida en el tratamiento probiótico con la proporción de sobrevivencia obtenida en el tratamiento control. En esta prueba se tuvieron en cuenta las siguientes hipótesis.

$$H_0 = p_1 - p_2 = 0$$

$$H_1 = p_1 - p_2 \neq 0$$

Donde:  $\mu_1$  representa la media poblacional para el tratamiento probiótico,  $\mu_2$  representa la media poblacional para el tratamiento control,  $\text{mediana}_1$  representa la mediana poblacional para el tratamiento probiótico,  $\text{mediana}_2$  representa la mediana poblacional para el tratamiento control,  $p_1$  representa la proporción de sobrevivientes en el tratamiento probiótico y  $p_2$  representa la proporción de sobrevivientes en el tratamiento control.

Se tomó como diferencias significativas aquellos resultados que presentaron un valor de probabilidad  $P < 0,01$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con Statgraphics Plus 5.1.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Seguimiento de la viabilidad de *L. plantarum* Lab 9 en el concentrado probiótico suministrado durante el EE-I.

Los valores de la viabilidad promedio de las UFC/g de la bacteria probiótica impregnada en el alimento, se describen en las Tablas 11 y 12.

En la Tabla 11, se evidencia que el conteo de UFC/g de *L. plantarum* Lab 9 en el alimento suministrado a los alevinos, mantuvo una viabilidad promedio de  $1,4 \times 10^8$  durante los 30 días de almacenamiento. Los primeros 18 días se encontraron conteos equivalentes a  $10^8$  UFC/g, viabilidad que disminuyó después de 24 días de mantenerse a una temperatura de 4 °C.

Tabla 11  
*Seguimiento de la viabilidad de L. plantarum Lab 9 en el alimento almacenado a 4 °C, suministrado durante el EE- I en alevinos de tilapia roja.*

Días de almacenamiento	Número de UFC/g
0	$2,5 \times 10^8$
6	$2,0 \times 10^8$
12	$1,6 \times 10^8$
18	$1,0 \times 10^8$
24	$6,5 \times 10^7$
30	$4,0 \times 10^7$
Viabilidad promedio	$1,4 \times 10^8$

\*El número de UFC/g corresponde al promedio de dos réplicas

\*Factor de dilución  $10^5$

Estos resultados de viabilidad fueron similares a los encontrados en el concentrado probiótico que se administró en los juveniles, donde la bacteria probiótica permaneció con una viabilidad de  $10^8$  UFC/g hasta el día 18 de almacenamiento, conteos que en el día 30 disminuyeron a  $4,1 \times 10^7$  UFC/g (Tabla 12).

Tabla 12  
*Seguimiento de la viabilidad de L. plantarum Lab 9 en el alimento almacenado a 4 °C, suministrado durante el EE- I en juveniles de tilapia roja.*

Días de almacenamiento	Número de UFC/g
0	$2,6 \times 10^8$
6	$2,2 \times 10^8$
12	$1,7 \times 10^8$
18	$1,1 \times 10^8$
24	$6,4 \times 10^7$
30	$4,1 \times 10^7$
Viabilidad promedio	$1,4 \times 10^8$

\*El número de UFC/g corresponde al promedio de dos réplicas

\*Factor de dilución  $10^5$

8.2 Seguimiento de la viabilidad de *L. plantarum* Lab 9 en el concentrado probiótico suministrado en el EE-II.

El número de UFC de la bacteria probiótica en el alimento, mantuvo una viabilidad en torno a  $10^{11}$  UFC/g, valor que disminuyó a partir de los 24 días de almacenamiento, donde *L. plantarum* Lab 9 alcanzó un recuento de  $6,0 \times 10^{10}$  UFC/g (Tabla 13).

Tabla 13

*Seguimiento de la viabilidad de L. plantarum Lab 9 en el alimento almacenado a 4 °C, suministrado durante el EE-II en juveniles de tilapia roja.*

Días de almacenamiento	Número de UFC/g
0	$2,5 \times 10^{11}$
6	$2,1 \times 10^{11}$
12	$1,6 \times 10^{11}$
18	$1,1 \times 10^{11}$
24	$6,0 \times 10^{10}$
30	$2,9 \times 10^{10}$
Viabilidad promedio	$1,4 \times 10^{11}$

\*El número de UFC/g corresponde al promedio de dos réplicas

\*Factor de dilución  $10^8$

La diferencia registrada en las viabilidades del concentrado probiótico del EE-I ( $10^8$ - $10^7$  UFC/g), y EE-II ( $10^{11}$ - $10^{10}$  UFC/g), se puede atribuir a diferentes factores, entre ellos, la falta de refrigeración, los cambios de temperatura y manipulación a los cuales se expuso el concentrado probiótico del EE-I durante su transporte desde la ciudad de Cali-Valle hasta el municipio de Restrepo-Meta, condiciones a las cuales no fue sometido el concentrado probiótico del EE-II, dado que procesamiento se realizó en la ciudad de Cali, lugar donde se llevó a cabo este ensayo.

En las Tablas 11, 12 y 13 se observa que la viabilidad de la bacteria probiótica en el concentrado después de los 30 días de almacenamiento a 4°C disminuye con el tiempo, sin embargo, dicha disminución conserva niveles de viabilidad superiores a  $10^7$  UFC/g, concentración que está dentro de la dosis recomendada por Nayak (2010), quien sostiene que la viabilidad de un producto probiótico para uso en acuicultura está entre  $10^{6-10}$  UFC/g de alimento. Al respecto, varios estudios en tilapia negra (*O. niloticus*) en los cuales se utilizó probióticos con estas concentraciones bacterianas ( $10^{6-10}$  UFC/g), manifestaron un efecto positivo sobre el crecimiento (Jatobá et al., 2011; Ali et al., 2010; Essa et al., 2010; El-Haroun et al., 2006; Lara et al., 2002), el sistema inmunológico (El-Ezabi et al., 2011; Nakandakare, 2010; Aly et al., 2008; Wang et al., 2008b) y la sobrevivencia (Ferguson et al., 2010; Lara et al., 2010; El-Rhman et al., 2009).

No obstante, se reporta que productos probióticos con viabilidades de  $10^4$  UFC/g también influyen favorablemente en el organismo, por ejemplo, en la maduración temprana del sistema digestivo en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Tovar, 2002), en el crecimiento óptimo de tilapia (Essa et al., 2010; Apún, 2007), en la sobrevivencia y actividad enzimática del pez cabeza de serpiente (*Channa striatus*) (Manju et al., 2011), en la mejora de los parámetros inmunológicos (Nikoskelainen et al., 2003) y en la protección frente a patógenos en trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Faramarzi et al., 2011). Así, es posible deducir que productos probióticos con viabilidades  $\geq 10^4$  UFC/g pueden ejercer efectos saludables en los organismos acuáticos, por lo tanto los recuentos de

*L. plantarum* Lab 9 encontrados en el alimento Mojarra 38®, constituyeron valores de viabilidad adecuados para ser considerados como probióticos.

En acuicultura, los probióticos con las viabilidades más altas no siempre pueden resultar en una mejor eficacia (Faramarzi et al., 2011; Son et al., 2009; Newaj-fyzul et al., 2007; Nikoskelainen et al., 2001), tampoco probióticos con bajas viabilidades serán siempre efectivos (Vine et al., 2006). La concentración óptima del probiótico en el alimento o en el agua de cultivo que se requiere para producir el efecto deseado, va a variar con respecto al tipo de microorganismo, estatus fisiológico del animal hospedero, condiciones de cultivo y tipo de parámetro que se pretenda evaluar (Merrifield et al., 2010a; Nayak, 2010; Fuller, 2006).

En esta investigación, los altos valores de viabilidad obtenidos en el concentrado, se pueden asociar a múltiples factores, entre ellos al medio de crecimiento que se utilizó para la impregnación de la bacteria en el concentrado Mojarra 38®, medio que se reportó en otros trabajos como un sustrato idóneo para el crecimiento de bacterias ácido lácticas como *L. plantarum* (Montalvo, 2010; Jurado, 2010; Bolivar, 2008; Ramírez, 2005) debido a que sus componentes (suero de leche bovino, leche de soya, salvado de trigo y sacarosa) aportan fuentes de carbono, nitrógeno, azúcares simples y fibra prebiótica que estimulan el crecimiento de los *Lactobacillus* (Ramirez, 2005).

Otro factor asociado a la alta viabilidad del *L. plantarum* Lab 9 es el vehículo portador de la bacteria probiótica, en este caso el concentrado Mojarra 38®. Al respecto, se ha documentado que un alimento además de aportar a la nutrición del organismo, es un vehículo ideal para introducir bacterias probióticas hacia el interior del hospedero, pues permite mantener a estos microorganismos en cantidades altas desde el momento de su incorporación en la ración, durante su almacenamiento e incluso hasta su paso por las barreras biológicas del intestino, todo esto gracias a la presencia de propiedades fisicoquímicas que permiten mantener viable al microorganismo probiótico (Sanders y Marco, 2010; Soccol et al., 2010; Vinderola et al., 2010). Además, el hecho de utilizar alimentos para la inclusión de microorganismos, también proporciona ciertas ventajas operacionales y de manipulación, mientras que las mezclas probióticas que se adicionan directamente en el agua de cultivo, requieren de un manejo continuo y dispendioso para prepararlas en campo, manejo que en muchos casos es inapropiado y expone al producto a riesgos por contaminación y a una vida útil más limitada (Londoño, 2011; Wang et al., 2008a; Wang et al., 2004).

Londoño (2011), reporta que las condiciones de cultivo y manejo bacteriano (tiempos y temperaturas de incubación del inóculo, condiciones de agitación, de secado, empaque, almacenamiento, entre otros) adoptados para el proceso de inclusión de *L. plantarum* Lab 9 en el concentrado, también son considerados factores claves que determinan la obtención de un producto probiótico consumible para tilapia, con una viabilidad bacteriana en concentración adecuada.

Como resultado de la elección de un buen medio de crecimiento, de un adecuado vehículo o alimento portador del microorganismo y de unas óptimas condiciones de crecimiento y procesamiento tecnológico, se obtuvo un concentrado probiótico con una viabilidad  $> 10^7$  UFC/g, viabilidad que incrementó la posibilidad de que la bacteria se adhiriera al intestino de tilapia roja.

### 8.3 Parámetros de calidad de agua registrados durante el EE-I.

En la Tabla 14 se muestran los valores promedio de pH, temperatura y amonio de cada uno de los tratamientos durante el periodo de estudio con alevinos y juveniles. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas para cada uno de los parámetros evaluados tanto del grupo probiótico como del grupo control ( $P>0.01$ ).

Tabla 14.

*Parámetros de calidad de agua registrados en las piletas que recibieron el tratamiento probiótico y control durante el EE-I.*

Estadío	Parámetro	Probiótico	Control	Rangos Óptimos*
Alevinos	pH	7,1 ± 0,21	7,1 ± 0,18	6,5-9
	Temperatura (°C)	24,9 ± 0,29	25 ± 0,23	24-32 °C
	Amonio (ppm)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,004	0,01-0,1 ppm
Juveniles	pH	7,0 ± 0,16	7,0 ± 0,20	6,5-9
	Temperatura (°C)	24,6 ± 0,23	24,8 ± 0,27	24-32 °C
	Amonio (ppm)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,006	0,01-0,1 ppm

Valores (media ± desviación estándar), \* Fuente: Singoagro et al. (2009)

### 8.4 Parámetros de calidad de agua registrados durante el EE-II.

En la Tabla 15 se muestran los valores promedio de temperatura, oxígeno y pH de cada uno de los tratamientos evaluados durante el periodo de estudio con juveniles. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.01$ ) para cada uno de los parámetros evaluados tanto del grupo probiótico como del grupo control.

Tabla 15.

*Parámetros de calidad de agua registrados en los acuarios que recibieron el tratamiento probiótico y control durante el EE-II.*

Tratamiento	Parámetro	Probiótico	Control	Rangos óptimos*
10	Temperatura (°C)	24,9 ± 0,32	24,8 ± 0,44	24-32 °C
	Oxígeno Disuelto (mg/L)	5,64 ± 0,07	5,64 ± 0,07	> 4,5 mg/L
	pH (Unidades)	6,9 ± 0,16	7,0 ± 0,3	6,5-9
20	Temperatura (°C)	24,9 ± 0,41	24,9 ± 0,39	24-32 °C
	Oxígeno Disuelto (mg/L)	5,62 ± 0,05	5,62 ± 0,04	> 4,5 mg/L
	pH (Unidades)	7,0 ± 0,21	7,0 ± 0,22	6,5-9
30	Temperatura (°C)	25,0 ± 0,37	25,0 ± 0,37	24-32 °C
	Oxígeno Disuelto (mg/L)	5,62 ± 0,07	5,62 ± 0,06	> 4,5 mg/L
	pH (Unidades)	6,9 ± 0,20	6,9 ± 0,20	6,5-9

Valores (media ± desviación estándar). \* Fuente: Singoagro et al. (2009)

### 8.5 Adherencia de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 al intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp.).

Este factor se evaluó a través del análisis microbiológico, tiempo de permanencia de la bacteria en el intestino, microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión de muestras del intestino. Es de aclarar que en el ensayo piloto EE-I, se hizo únicamente el análisis microbiológico.

#### 8.5.1 Análisis microbiológico del intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) sometidos a las condiciones del EE-I.

Resultados del ensayo preliminar recomendado por ICA. Los análisis microbiológicos del intestino llevados a cabo al día 20 de tratamiento con el concentrado probiótico, mostraron recuentos de *L. plantarum* Lab 9, equivalentes a  $1,4 \times 10^6$  UFC/g y  $3,4 \times 10^4$  UFC/g en la muestra intestinal de juveniles, mientras que en alevinos, no se detectó la presencia de la bacteria probiótica ni tampoco otro tipo bacteriano.

Resultados del análisis microbiológico pos-tratamiento (30 días). La ausencia de crecimiento fue evidente en las muestras intestinales procedentes de alevinos y juveniles que recibieron el tratamiento con el concentrado probiótico durante 30 días. Los resultados de los dos análisis microbiológicos se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16.

*Resultados del análisis microbiológico del intestino de alevinos y juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) posterior al tratamiento con el probiótico.*

Estadío	Tiempo de alimentación con el concentrado probiótico (días)	Recuento de <i>L. plantarum</i> Lab 9 UFC/g de intestino
Alevinos	20	No se detectó
	30	No se detectó
Juveniles	20	$1,4 \times 10^6$ $3,4 \times 10^4$
	30	No se detectó

Estos resultados demostraron la presencia de la bacteria probiótica en el intestino de los juveniles después de 20 días de tratamiento con el probiótico, pero no a los 30 días de alimentación. Los resultados de este ensayo permitieron identificar la importancia de los tiempos de administración del probiótico en el análisis de adherencia, dado que no se encontró una relación directa entre el tiempo prolongado de alimentación (20 o 30 días) y el número de bacterias probióticas en el intestino, este resultado se corroboró más adelante en el EE-II.

En contraste, en el análisis microbiológico del intestino de alevinos, a los 20 y 30 días de alimentación hubo ausencia total de la bacteria probiótica. Este resultado se puede explicar en el estadío del animal, debido a que en los peces el intestino al igual que el resto de su cuerpo sufre continuos cambios fisiológicos y estructurales que van desde el nacimiento hasta la etapa juvenil,

cambios que pueden incidir en la colonización y establecimiento de las bacterias (Welker y Lim, 2011; Chaiyapechara, 2008; Fuiman, 2002).

Además, como resultado del desarrollo histológico y la maduración del tracto digestivo en los peces, los sitios de unión disponibles para bacterias se van incrementando, incluso se van mejorando las condiciones internas que inducen el crecimiento bacteriano en el epitelio intestinal (Ringø et al., 1995 citado por Vine et al., 2006), por tanto, es posible que en los alevinos de tilapia roja exista una menor proporción de sitios de unión específicos para *L. plantarum* Lab 9. Otra razón podría estar relacionada con el microambiente intestinal que en alevinos aún no es favorable para la proliferación de la bacteria. En el caso de tilapia roja la aplicación de *L. plantarum* Lab 9 podría ser más eficiente en estadíos con un desarrollo intestinal avanzado. Sin embargo, para tener mayor claridad sobre éste aspecto serían necesarios estudios destinados a evaluar la relación entre los distintos estadíos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) con la adherencia de una bacteria probiótica.

Sin duda, se debe considerar que cada bacteria probiótica tiene propiedades y características únicas y que sus efectos pueden variar incluso dentro de la misma especie (Quiñónez, 2008).

#### 8.5.2 Análisis microbiológico del intestino de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) sometidos a las condiciones del EE-II.

A partir de los resultados obtenidos en el EE-I, se evaluó la influencia de diferentes tiempos de administración (10, 20 y 30 días) del concentrado probiótico sobre la capacidad de adherencia de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino de juveniles de tilapia roja.

Este análisis reveló una disminución en el número de *L. plantarum* Lab 9 conforme se incrementó el periodo de alimentación con el probiótico, Tabla 17.

Tabla 17

*Resultados del análisis microbiológico del intestino de juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) posterior a los 10, 20 y 30 días de tratamiento con el probiótico.*

Estadío	Tiempo de alimentación con el concentrado probiótico (días)	Recuento de <i>L. plantarum</i> Lab 9 UFC/g de intestino
Juveniles	0	No se detectó
	10	$> 3,4 \times 10^{11}$
	20	$1,4 \times 10^4$
	30	$< 30$

Estos resultados muestran que *L. plantarum* Lab 9 se adhiere al intestino de juveniles de tilapia roja de forma transitoria tal como ocurre con la microbiota asociada a los peces, cuya permanencia en el intestino puede variar de acuerdo con los cambios en la alimentación, del microambiente intestinal, factores medioambientales, condiciones de cultivo, microorganismos del agua o del ambiente

circundante (Welker y Lim, 2011; Nayak, 2010; Denev et al., 2009; Marzouk et al., 2008; Escobar et al., 2006; Gatesoupe, 2000; Verschuere et al., 2000).

Además, la disminución de la bacteria probiótica en el intestino puede ser consecuencia de la respuesta inmune del hospedero y/o la resistencia ejercida por la microbiota del pez, la cual puede inhibir por exclusión competitiva y producción de compuestos antimicrobianos el crecimiento de microorganismos exógenos a los que considera potenciales invasores (Van y Miller, 2011; Bucio et al., 2009; Ringø et al., 2007; Balcázar et al., 2006; Timmerman et al., 2004; Ouwehand y Salminen, 2003; Ringø et al., 2003).

Hasta la fecha, no hay estudios que correlacionen la adherencia de BAL en el intestino de tilapias con los tiempos de administración del probiótico. Sin embargo, existen reportes en otros peces en los que al evaluar ésta condición, han encontrado resultados similares a los obtenidos en esta investigación. Aubin et al. (2005), recuperaron del intestino de trucha arco iris (*O. mykiss* Walbaum) una concentración promedio de  $10^5$ - $10^6$  UFC/g de *P. acidilactici* y *S. cerevisiae* después de 20 días de tratamiento, y únicamente 10 UFC de la bacteria posterior a 150 días de tratamiento; Waché et al. (2006), encontraron que los recuentos de *S. cerevisiae* en el intestino de trucha arco iris (*O. mykiss*) alcanzaron un nivel máximo de  $10^4$ - $10^5$  UFC/g luego de 10 días de suministro, niveles descendieron gradualmente a los 20 y 31 días de régimen alimenticio; Vaz (2012), halló un mayor número de colonias de *B. subtilis* y *Bacillus cereus* en el intestino de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) a los siete días de tratamiento ( $10^7$  UFC/g), con respecto a los 15, 30 y 60 días de alimentación, donde la cantidad de bacterias probióticas recuperadas fue inferior.

La tendencia de *L. plantarum* Lab 9 a disminuir a medida que se incrementa el tiempo de administración, también implica una disminución gradual del efecto ejercido por ella sobre tilapias. Por ésta razón, es necesario establecer los tiempos de administración del probiótico óptimos en los cuales se garantice la presencia de la bacteria en el hospedero, y por lo tanto se favorezca su efecto benéfico en el crecimiento y sobrevivencia de los organismos en estudio.

8.5.3 Tiempo de permanencia de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 en el intestino de los juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) tras suspender el suministro del concentrado probiótico.

Se determinó el periodo durante el cual *L. plantarum* Lab 9 continua siendo viable en el intestino, después de cesar la alimentación con el concentrado probiótico y de remplazar su dieta con el concentrado control.

Los resultados de estos análisis mostraron que después de 10 días de tratamiento, *L. plantarum* Lab 9 permanece en el tracto intestinal de tilapia durante 10 días más en una concentración de  $4,6 \times 10^4$  UFC/g, la cual declinó a niveles relativamente bajos al doceavo día, con un recuento  $< 30$  UFC/g. En los individuos donde se suministró el probiótico durante 20 días, la bacteria permaneció viable hasta dos días después de haber suspendido la dieta con el probiótico, con recuentos de  $9,1 \times 10^3$  UFC/g, y en el grupo de tilapias que fueron alimentadas durante 30 días con el probiótico, los niveles de *L. plantarum* Lab 9 se detectaron en una concentración mínima  $< 30$  UFC/g (Tabla 18).

Tabla 18.

*Tiempo de permanencia de Lactobacillus plantarum Lab 9 en el intestino de juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) luego de suspender la alimentación con el concentrado probiótico.*

Tiempo de administración del concentrado probiótico (días)	Días de muestreo posterior a la suspensión del probiótico	Recuento de <i>L. plantarum</i> Lab 9 (UFC/g) en el intestino
10	1	$>3,4 \times 10^{11}$
	2	$3,1 \times 10^{11}$
	4	$2,1 \times 10^{11}$
	6	$1,1 \times 10^9$
	8	$1,1 \times 10^7$
	10	$4,6 \times 10^4$
	12	$< 30$
20	1	$1,4 \times 10^4$
	2	$9,1 \times 10^3$
	3	$< 30$
30	1	$< 30$
	2	$< 30$

A partir de estos resultados se demostró que al suspender el suministro del concentrado probiótico en la dieta, la concentración de la bacteria probiótica en el intestino de los juveniles va declinando. Al respecto, existen algunos estudios en los cuales se evidencia este comportamiento. Nikoskelainen et al. (2003), reportan que de las cinco concentraciones de *L. rhamnosus* que se incorporaron en la dieta de trucha arcoiris (*O. mykiss*), solamente tres de ellas ( $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^4$  UFC/g) fueron capaces de permanecer en el intestino hasta una semana después de haber sustituido el alimento probiótico por el control, en concentraciones de  $10^6$ ,  $10^2$  y  $10^3$  UFC/g, respectivamente; Son et al. (2009), observaron una disminución de 4 unidades logarítmicas ( $10^8$  a  $10^4$  UFC/g) de *L. plantarum* 7-40 luego de una semana de haber alimentado a *Epinephelus coioides* con la ración sin probiótico; Sugimura et al. (2011), notaron que las BAL que alcanzaron un alto nivel de adhesión al mucus intestinal de la carpa (*Cyprinus carpio*) mediante pruebas *in vitro*, declinaron hasta  $10^6$  UFC/g en el intestino luego de tres semanas de haber concluido la alimentación con las cepas probióticas, no obstante, BAL con bajo nivel de adhesión al mucus (*in vitro*), desaparecieron inmediatamente se detuvo su administración.

En estos estudios, la concentración de células probióticas en el tracto intestinal de los animales hospederos, se determinó por cultivo en placa de homogenizado intestinal. No obstante, existen algunas investigaciones en las cuales el número de células estimadas por conteos en placa son menores en comparación a los estimados por alguna técnica molecular; este es el caso de Macey y Coyne (2006), quienes comprobaron que las viabilidades de *Vibrio midae* SY9 en el intestino de *Halotia midae*, variaron con respecto a la técnica utilizada. Según la técnica de recuento en placa *V. midae* SY9 alcanzó una concentración de  $3,10 \times 10^2$  UFC/g, por el contrario con la técnica de hibridación *in situ* cuantificaron una viabilidad de  $2,45 \times 10^5$ , tres unidades logarítmicas más; de

igual modo Ferguson et al. (2010), revelaron mediante recuento en placa que *P. acidilactici* permanece en el intestino de tilapia (*O. niloticus*) con viabilidad de  $5,5 \times 10^6$  UFC/g hasta siete días después de cambiar la alimentación por la dieta control, sin embargo según la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), la bacteria se mantuvo viable hasta 17 días después de haber detenido su ingesta. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que la viabilidad registrada de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino de tilapia roja sea más alta que lo reportado en esta investigación, incluso la permanencia de esta cepa en el intestino posterior a 10 y 20 días de suministro continuo, tal vez sea más prolongada que 10 y 2 días, respectivamente (Tabla 18).

Otro punto relevante que hay que considerar en este estudio, es si la concentración de *L. plantarum* Lab 9 que permaneció viable en el intestino de tilapia roja luego de haber suspendido la administración con raciones probióticas, es suficiente para seguir proporcionando efectos benéficos en dicho organismo. En este contexto, no hay un dato concreto del número mínimo de células probióticas que se requieren en el intestino una vez se detiene la administración del probiótico, sin embargo en el trabajo de Balcázar et al. (2007), se evidenció que un número aproximado de  $10^5$  UFC/g de *L. lactis* y *L. mesenteroides* en el intestino de trucha marrón (*S. trutta*), conlleva a un incremento en los niveles de inmunoglobulinas, la actividad del sistema de complemento y de la lisozima en suero, aun después de una semana de haber interrumpido el suministro del probiótico, igualmente Ridha y Azad (2012), observan que viabilidades de  $2,3 \times 10^5$  y  $9 \times 10^4$  UFC/g de *Bacillus amyloliquefaciens* siguieron manteniendo un efecto prolongado sobre el crecimiento, conversión alimenticia y parámetros inmunológicos del pez gato (*Ictalurus punctatus*), luego de 40 y 61 días de haber reemplazado la dieta probiótica con la dieta control.

A partir de estos reportes, se puede deducir que bacterias probióticas con viabilidades hasta de  $10^4$  y  $10^5$  UFC/g en el intestino, pueden contribuir de manera significativa en múltiples funciones incluso luego de concluir la alimentación con el probiótico. Por lo tanto, es posible que el tratamiento de 10 días con *L. plantarum* Lab 9 genere las mejores respuestas en la salud del organismo después del primer y décimo día de haber sustituido la dieta probiótica por la de control.

Después de haber establecido el tiempo de administración y el tiempo de permanencia donde *L. plantarum* Lab 9 alcanza los niveles de concentración bacteriana más altos en el intestino de tilapia roja, se podría establecer un régimen de alimentación en el que se incluya 10 días de tratamiento con el concentrado probiótico en una dosis  $> 10^7$  UFC/g y 10 días de suspensión, por ciclos alternados.

8.5.4 Microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (TEM) del intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) posterior al tratamiento probiótico.

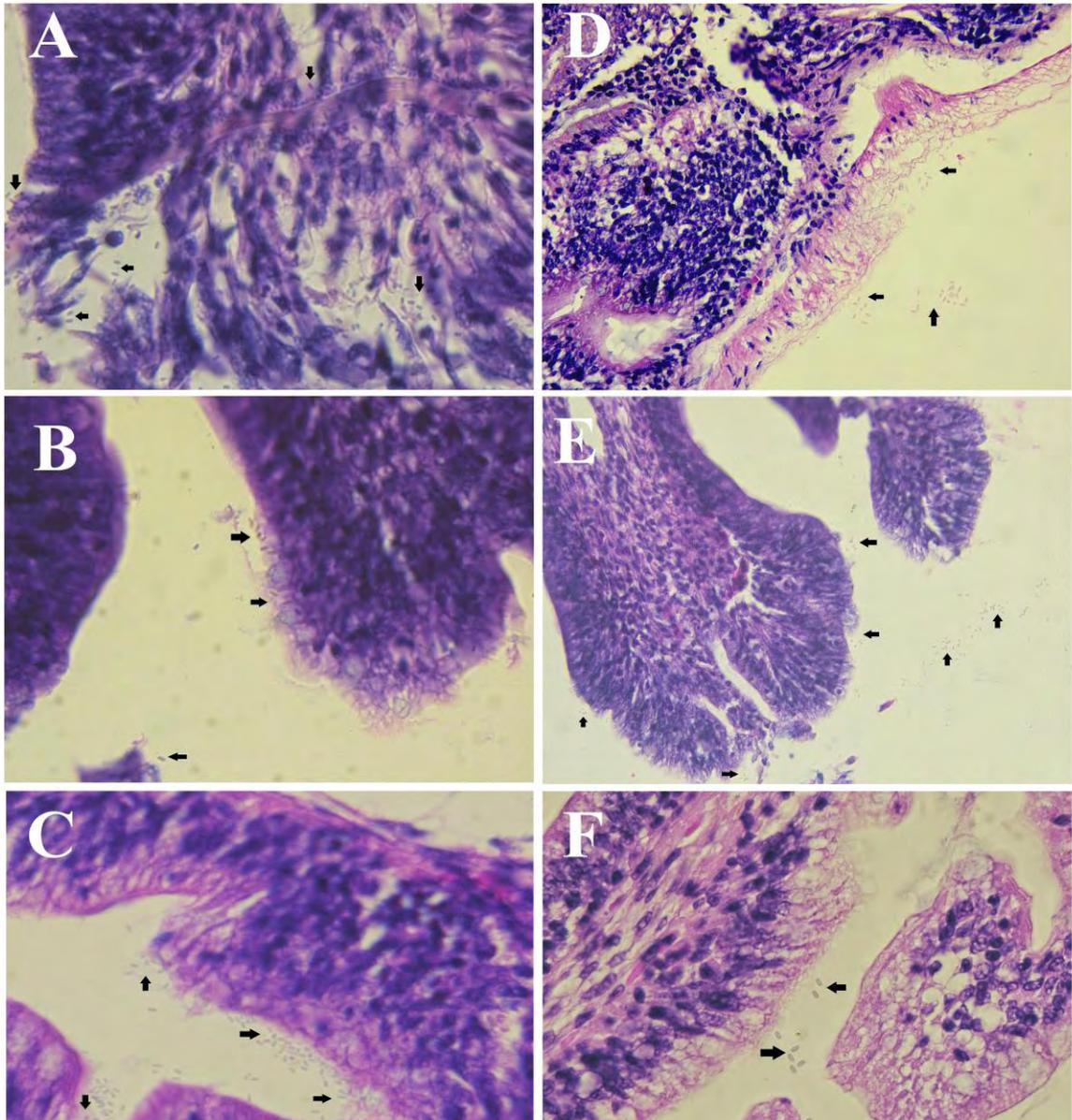
Las muestras analizadas se seleccionaron de juveniles que recibieron el tratamiento probiótico y control durante 10 días y que mostraron el mayor número de UFC/g y permanencia de *L. plantarum* Lab 9 en el intestino, con el fin de confirmar los resultados hasta ahora obtenidos (Tabla 18).

8.5.4.1 Microscopía de luz del intestino de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.).

En las muestras de intestino tomadas a los 10 días después de suprimir el tratamiento probiótico, se observó la adherencia de *L. plantarum* Lab 9 en la sección anterior del intestino (Figura 5A-5B-5C), la presencia de bacterias en las bases de las microvellosidades y en la luz intestinal (Figura 5D-5E)

así como entre los pliegues del epitelio (Figura 5F). Estas células se identificaron presuntivamente como *L. plantarum* Lab 9 tomando en cuenta la morfología.

**Figura 5.** Micrografía en microscopía de luz del intestino de un juvenil de tilapia roja (*Oreochromis* sp.), alimentado durante 10 días con el concentrado probiótico. A, B y C: bacterias adheridas al epitelio (100x), D y E: bacterias presentes en la base de las microvellosidades y en la luz intestinal (40x), F: bacterias entre los pliegues del epitelio (100x). Las flechas indican agregados bacterianos. Cortes teñidos con hematoxilina y eosina (H&E).



Fuente: Esta investigación.

Las micrografías de luz demuestran que *L. plantarum* Lab 9 se adhiere al intestino de tilapia roja (Figura 5A-5B-5C). Esta adherencia, podría ser explicada por la interacción físico-química

(específica y no específica) que ocurre entre las moléculas de la cubierta celular microbiana con los componentes de la matriz extracelular en el epitelio intestinal del juvenil (Collado et al., 2008; Adlerberth et al., 2000); como también por la interacción de moléculas diana tipo adhesinas – proteínas que reconocen cadenas específicas de carbohidratos de las glicoproteínas o glicolípidos con las células hospederas (Adlerberth et al., 2000).

Cada microorganismo puede expresar formas alternativas de adhesión, dependiendo de las características de la superficie celular del tejido hospedero (Mohapatra et al., 2012; Lara, 2011; Sorongon et al., 1991). Se desconocen los mecanismos exactos que están involucrados en la interacción de *L. plantarum* Lab 9 con las células del epitelio, por lo cual, éste sería un campo de investigación importante para profundizar en éste proceso.

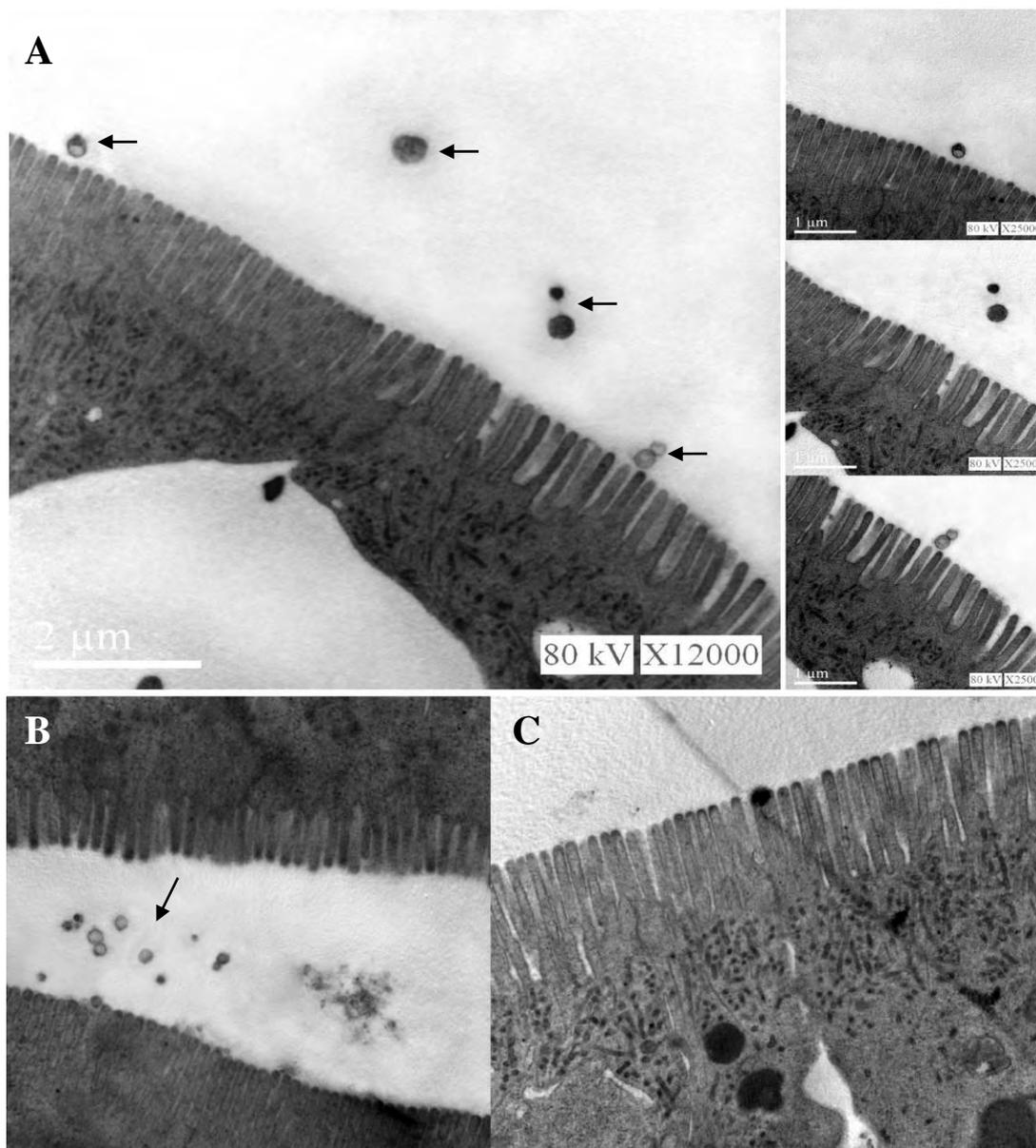
En las micrografías de luz se pueden observar algunas bacterias próximas al epitelio pero no adheridas, esto las haría susceptibles a ser arrastradas con el contenido luminal y desplazadas con la mucina degradada; la cual se renueva constantemente por la secreción de glicoproteínas de alto peso molecular por parte de las células productoras de mucus, también conocidas como caliciformes (Ringø et al., 2003; Kirjavainen et al., 1998).

Se observó mayor concentración de *L. plantarum* Lab 9 en la porción anterior del intestino (Figura 5A-5B-5C), por lo cual es de considerar ésta, la porción intestinal donde la bacteria podría colonizar y ejercer su mayor efecto probiótico. Esta afirmación se puede soportar en los estudios que han relacionado el alto número de bacterias lácticas en una determinada porción intestinal con el efecto probiótico, tal como el estudio de Son et al. (2009), quienes encontraron una mayor predominancia de *L. plantarum* en la región posterior del intestino de *E. coioides*; Lazado et al. (2011), reportaron cierto grado de variación en la adherencia de dos cepas probióticas a los segmentos intestinales del bacalao atlántico, la cepa GP12 se adhirió fuertemente a las células del intestino anterior y medio, a diferencia de la cepa GP21 la cual presentó una mayor adherencia hacia el intestino posterior; Saldaña (2011), identificó la colonización de *Lactobacillus* sp. en todo el intestino de tilapia negra (*O. niloticus*), y un mayor número de células probióticas en el intestino anterior; Ridha y Azad (2012), detectaron mayores recuentos de *B. amyloliquefaciens* en la porción anterior y media del intestino de tilapia nilótica (*O. niloticus*), mientras que encontraron *Lactobacillus* sp. a lo largo de todo el intestino.

#### 8.5.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del intestino de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) posterior al tratamiento probiótico y control.

En las micrografías obtenidas a partir de cortes histológicos luego de 10 días de tratamiento, no se observó con claridad la morfología característica de *L. plantarum* Lab 9, así como tampoco se logró confirmar la adherencia de la bacteria a un sitio específico del intestino. Solo se observaron cuerpos esféricos en las proximidades del epitelio intestinal, lo cual podría corresponder a restos o detritus celulares o tal vez agregados bacterianos, sin embargo, para mejores conclusiones sería necesario procesar un mayor número de muestras intestinales (Figura 6A-6B). La microfotografía del control obtenido de tejido de un juvenil alimentado con el concentrado sin bacteria probiótica no mostró bacterias adheridas a las microvellosidades como tampoco los cuerpos esféricos mencionados anteriormente (Figura 6C).

Figura 6. Micrografía TEM del intestino de un juvenil de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). A-B: muestra de intestino procedente de un individuo alimentado con el concentrado probiótico y la presencia de cuerpos esféricos en las proximidades del epitelio intestinal y C: muestra de intestino procedente de un individuo alimentado con el concentrado control. Las flechas en la figura indican lo que podrían ser restos o detritus celulares y/o agregados bacterianos. Escala bars 1µm (excepto A: 2 µm).



Fuente: Esta investigación.

Existen estudios en otros peces, en los cuales mediante TEM se ha observado la interacción del microorganismo probiótico al intestino. Vg. Salinas et al. (2008), comprobaron la asociación de *L. delbrueckii* spp. *lactis* a las microvellosidades del intestino proximal en el salmón atlántico (*Salmo salar* L.); Merrifield et al. (2010b), utilizaron la combinación TEM y SEM (Microscopía electrónica

de barrido) para comprobar la colonización de *P. acidilactici* en la mucosa intestinal de la región distal y proximal de la trucha arcoíris (*O. mykiss*); Harper et al. (2011), demostraron mediante TEM la presencia de poblaciones bacterianas de *P. acidilactici* localizadas en el lumen intestinal y en estrecha asociación con las microvellosidades del intestino anterior de trucha arcoíris (*O. mykiss*).

A diferencia de los estudios previamente descritos, en esta investigación se dificultó identificar a la bacteria probiótica en el tejido intestinal mediante éstas técnicas de microscopía, lo cual podría explicarse en el bajo número de muestras observadas, errores en los procedimientos de preparación de muestras para TEM u otros relacionados. Por tanto, para poder visualizar mejor a la bacteria objeto de estudio y diferenciarla del resto de bacterias presentes en el intestino, se recomienda contar con número representativo de muestras intestinales y continuar profundizando en estos mecanismos de adherencia mediante el uso conjunto de técnicas de marcaje con proteína verde fluorescente o GFP (Green Fluorescent Protein), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Salinas et al., 2008; Merrifield et al., 2010b).

#### 8.6 Determinación del efecto de *Lactobacillus plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) a través de parámetros biométricos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los parámetros de crecimiento en alevinos y juveniles de tilapia roja sometidos a las condiciones del ensayo piloto EE-I, donde se determinó en que estadio la bacteria probiótica tuvo un efecto significativo en el crecimiento, información que sirvió para ser aplicada en el diseño experimental EE-II.

##### 8.6.1 Determinación del efecto de *L. plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento de los alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-I.

Los alevinos de tilapia roja del grupo probiótico y grupo control, presentaron inicialmente pesos y longitudes sin diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,01$ ). Los valores promedio de peso estuvieron entre  $3,00 \pm 0,11$  g (grupo probiótico) y  $2,99 \pm 0,08$  g (grupo control), y los valores de longitud,  $4,7 \pm 0,09$  cm (grupo probiótico) y  $4,8 \pm 0,10$  cm (grupo control).

En los juveniles los pesos y longitudes iniciales no presentaron diferencias significativas al inicio del experimento ( $P>0,01$ ). Los valores promedio de peso estuvieron entre  $20,36 \pm 0,40$  g (grupo probiótico) y  $20,40 \pm 0,45$  g (control), y los valores de longitud entre  $10 \pm 0,56$  cm (grupo probiótico) y  $9,8 \pm 0,60$  cm (grupo control).

En la Tabla 19, se resumen los valores promedio del peso inicial, longitud inicial, peso final (PF), ganancia de peso (GP), tasa específica de crecimiento (TEC), ganancia diaria de peso (GDP) e incremento de longitud (IL) de los alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE -I.

Tabla 19

*Parámetros de crecimiento de alevinos y juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) posterior a 30 días de alimentación con el concentrado probiótico y concentrado control.*

Parámetro de crecimiento	Alevinos		Juveniles	
	Grupo probiótico	Grupo control	Grupo probiótico	Grupo control
Peso Inicial (g) (PI)	3,00 ± 0,11	2,99 ± 0,08	20,36 ± 0,40	20,40 ± 0,45
Longitud Inicial (cm) (LI)	4,7 ± 0,09	4,8 ± 0,10	10 ± 0,56	9,8 ± 0,60
Peso Final (g) (PF)	11,94 ± 1,26	11,87 ± 1,13	52,82 ± 1,21	46,83 ± 1,28
Ganancia de Peso (g) (GP)	8,94 ± 1,27	8,87 ± 1,09	32,45 ± 1,28	26,43 ± 1,45
Tasa específica de Crecimiento (%) (TEC)	4,58 ± 0,38	4,57 ± 0,30	3,18 ± 0,10	2,76 ± 0,13
Ganancia Diaria de Peso (g) (GDP)	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,04	1,08 ± 0,04	0,88 ± 0,05
Incremento de Longitud (cm) (IL)	4,08 ± 0,27	3,98 ± 0,23	2,32 ± 0,76	1,31 ± 0,78

Valores (media ± desviación estándar)

Los resultados de la Tabla 18 demuestran que *L. plantarum* Lab 9 no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros de crecimiento en los alevinos tratados con el concentrado probiótico, los cuales fueron estadísticamente iguales a los parámetros del grupo de alevinos que se alimentaron con el concentrado control. Resultados similares se hallaron en el estudio de Nikoskelaine et al. (2001), quienes no encontraron un efecto significativo de la inclusión de *L. rhamnosus* sobre la tasa específica de crecimiento de los grupos de trucha arcoiris (*O. mykiss*) alimentados durante 51 días con el probiótico; Ferguson et al. (2010), quienes notaron que la administración de *P. acidilactici* durante 32 días no influyó en la ganancia de peso, tasa específica de crecimiento, tasa de eficiencia proteica y tasa de conversión alimenticia en tilapia negra (*O. niloticus*); Merrifield et al. (2010c), quienes reportaron que no hubo mejoras significativas en la ganancia de peso y tasa específica de crecimiento en trucha arcoiris (*O. mykiss*), luego de un tratamiento por 10 semanas con *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *E. faecium*; Barbosa et al. (2011), concluyeron que el suministro de *L. plantarum* por 10 semanas, no altera el crecimiento y conversión alimenticia de *Centropomus parallelus*;

Carvalho et al. (2011), obtuvieron que 70 días de tratamiento con *B. subtilis* no mejoran los parámetros de crecimiento de alevinos de tilapia negra (*O. niloticus*); Vaz (2012), informaron que 60 días de alimentación con *B. subtilis* y *B. cereus*, no ejercen ningún efecto significativo sobre el desempeño zootécnico de pacus (*P. mesopotamicus*).

Una posible explicación, a este resultado es que el tiempo o periodo de experimentación durante el cual se administró el probiótico en la dieta de los alevinos fue corto como para detectar diferencias significativas en las tasas de crecimiento de estos organismos. En este contexto, existen reportes en los cuales durante los primeros 30 días de tratamiento con el probiótico, no se evidencia un efecto positivo de dicho tratamiento sobre el crecimiento de los peces en estudio. Apún (2007), observó que cepas de *Lactococcus* y *Bacillus* favorecieron el crecimiento de tilapia negra (*O. niloticus*) a partir del día 75 de tratamiento y no durante los primeros 45 días; Quiñónez (2008), detectó que una mezcla probiótica (BAL y levadura) no alteró el crecimiento de tilapias rojas y negras después de 29 y 64 días de alimentación, sin embargo los cambios en el crecimiento se hicieron notorios luego de 92 días de tratamiento; Nakandakare (2010), encontró que el suministro de *Bacillus toyoi* y *B. subtilis* en la dieta de tilapias negras (*O. niloticus*), no mejoran el peso y longitud final de estos organismos al cabo de 21 días, pero si después de haber transcurrido 42 días de tratamiento; Lopez y Cruz (2011), reportan que las tilapias rojas (*Oreochromis* sp.) alimentadas con *B. subtilis* y *S. cerevisiae*, alcanzan óptimos rendimientos en el crecimiento a partir del cuarentavo día de tratamiento. A partir de estos estudios, se puede inferir que se requiere un tiempo de experimentación más prolongado para determinar si *L. plantarum* Lab 9 influye significativamente sobre el crecimiento de alevinos de tilapia roja.

Teniendo en cuenta que el objeto de este estudio no fue abordar aspectos diferentes al crecimiento, es importante aclarar que un probiótico no solo está destinado a favorecer este parámetro, sino que además brinda múltiples beneficios en la salud del organismo, esto significa que en los estudios previamente descritos donde el probiótico no fue efectivo como promotor de crecimiento, éste fue capaz de favorecer otros aspectos en la salud del animal, por ejemplo, *L. rhamnosus* brinda mayor protección a trucha arcoiris (*O. mykiss*) contra *Aeromonas salmonicida* (Nikoskelainen et al., 2001), *P. acidilactici* moduló las comunidades bacterianas intestinales y estimuló algunos aspectos de la respuesta inmune no específica de tilapias (*O. niloticus*) (Ferguson et al., 2010), *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *E. faecium* incrementaron la actividad de lisozima en suero, aumentaron los niveles de leucocitos y modularon la microbiota intestinal de trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Merrifield et al., 2010c), *L. plantarum* mejoró la microbiota bacteriana en el tracto intestinal y aumentó el número de leucocitos, trombocitos y linfocitos que circulan en *Centropomus parallelus* (Barbosa et al., 2011), *B. subtilis* provocó una mayor altura de las vellosidades y espesor del epitelio en los intestinos de tilapias negras (*O. niloticus*) (Carvalho et al., 2011), *B. subtilis* y *B. cereus* proporcionaron mayores tasas de supervivencia en pacus (*Piaractus mesopotamicus*), después del desafío con *A. hydrophila* (Vaz, 2012).

En contraste a los resultados encontrados en los alevinos, *L. plantarum* Lab 9 mejoró significativamente ( $P < 0.01$ ) los parámetros de crecimiento de los juveniles que recibieron el tratamiento con el concentrado probiótico durante 30 días, hecho que también se encuentra documentado en los estudios de Abumourad et al. (2013) con *L. plantarum*; Mehrim (2009) con *B. subtilis* y Wang et al. (2008b) con *E. faecium*, en los cuales el microorganismo probiótico ejerció un efecto benéfico y significativo sobre el crecimiento en tilapia negra (*O. niloticus*)

A partir de los anteriores resultados, en el EE-II sólo se trabajó con juveniles de tilapia roja, debido a que en este estadio se hizo más evidente el efecto de la bacteria probiótica sobre los parámetros de crecimiento.

8.6.2 Determinación del efecto de *L. plantarum* Lab 9 sobre el crecimiento de los juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-II.

Al inicio del experimento, las medidas de peso y longitud de todos los juveniles de tilapia roja mostraron ser uniformes, con valores promedio de 9,7 - 9,9 g y 8,2 - 8,4 cm, sin diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.01$ ).

En la tabla 20 se resumen los valores promedio del peso final (PF), la ganancia de peso (GP), la tasa de crecimiento específica (TCE), la ganancia diaria de peso (GDP) e incremento de longitud (IL), de los juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE-II.

Tabla 20

*Parámetros de crecimiento de juveniles de tilapia roja (Oreochromis sp.) posterior a 10, 20 y 30 días de alimentación con el concentrado probiótico y concentrado control.*

Parámetro de crecimiento	10 Días		20 Días		30 Días	
	Grupo Probiótico	Grupo Control	Grupo probiótico	Grupo Control	Grupo probiótico	Grupo control
Peso Inicial (g)	9,95 ± 0,98	9,72 ± 1,03	9,79 ± 0,78	9,80 ± 0,76	9,77 ± 0,80	9,87 ± 0,86
Longitud Inicial (cm)	8,26 ± 0,34	8,33 ± 0,37	8,26 ± 0,34	8,30 ± 0,31	8,34 ± 0,19	8,41 ± 0,18
Peso Final (g)	14,54 ± 1,66	12,97 ± 1,81	21,25 ± 1,54	19,81 ± 1,47	28,72 ± 1,88	24,53 ± 1,41
Ganancia de Peso (g)	4,58 ± 1,82	3,24 ± 1,66	11,46 ± 1,87	10,01 ± 1,68	18,96 ± 1,92	14,65 ± 1,76
Tasa específica de crecimiento (%)	3,77 ± 1,39	2,84 ± 1,36	3,87 ± 0,59	3,52 ± 0,55	3,60 ± 0,32	3,04 ± 0,37
Ganancia Diaria de Peso (g)	0,46 ± 0,18	0,32 ± 0,16	0,57 ± 0,09	0,50 ± 0,08	0,63 ± 0,06	0,49 ± 0,06
Incremento de Longitud (cm)	1,31 ± 0,40	0,82 ± 0,44	2,09 ± 0,52	1,61 ± 0,45	2,88 ± 0,36	2,13 ± 0,26

Valores (media ± desviación estándar)

A partir de los datos registrados en la Tabla 20, se puede decir que todos los parámetros de crecimiento evaluados en los juveniles del EE-II fueron significativamente mayores ( $P<0.01$ ) en los individuos que se alimentaron con el concentrado probiótico durante los 10, 20 y 30 días, con respecto a los que recibieron el concentrado control. Estos resultados demuestran que las dietas

suplementadas con *L. plantarum* Lab 9 durante 10, 20 y 30 días, promueven un mayor crecimiento en los juveniles de tilapia roja, que las dietas no suplementadas.

Estos resultados van en paralelo con lo obtenido por Apún et al. (2009), quienes detectaron que cepas de Bacillus y bacterias ácido lácticas (BAL) promueven eficientemente el crecimiento de tilapias negras (*O. niloticus*) aun en condiciones sub-óptimas de temperatura y densidad; Son et al. (2009) y Essa et al. (2010), concluyeron que *E. coioides* y tilapias negras (*O. niloticus*) alimentadas con *L. plantarum* por cuatro semanas y 60 días, respectivamente, presentan incrementos significativos en la ganancia en peso y eficiencia alimenticia; Faramarzi et al. (2011), manifestaron que *L. acidophilus* suplementado en el alimento mejora el desempeño en el crecimiento de trucha arcoiris (*O. mykiss*); Mohapatra et al. (2012), evidenciaron que después de 60 días de cultivo, los alevinos de rohu (*L. rohita*) que recibieron una dieta suplementada con tres probióticos (*B. subtilis*, *L. lactis*, *S. cerevisiae*), demuestran mayor crecimiento, tasa de eficiencia proteica y retención de nutrientes. En todos estos reportes al igual que en esta investigación, todas las dietas suplementadas con probióticos dieron lugar a mayores crecimientos en los organismos que recibieron el tratamiento, esto significa que la adición de este tipo de microorganismos en el alimento puede inducir mejoras en el crecimiento y en la eficiencia alimenticia en el hospedero.

El incremento en los parámetros de crecimiento en los juveniles de tilapia roja que fueron alimentados con el concentrado probiótico pueden atribuirse a la permanencia de *L. plantarum* Lab 9 al intestino de estos organismos. Según Merrifield et al. (2010a) y Denev et al. (2009), la permanencia de los probióticos en el intestino evita que otros microorganismos nocivos puedan aprovechar la energía y los nutrientes disponibles en este lugar, aumentando de esta manera el área de absorción intestinal y con ello la disponibilidad de nutrientes que son indispensables para el buen crecimiento del organismo hospedero.

El efecto benéfico que aporta la administración de probióticos sobre el crecimiento de los peces, también se debe a que estos microorganismos favorecen la síntesis de vitaminas (como la biotina y vitamina B12), ácidos grasos de cadena corta y ácidos orgánicos que contribuyen a la acidificación del alimento y por ende mejoran la solubilidad y absorción de nutrientes (Ali et al., 2010; Denev et al., 2009; El-Rhman et al., 2009; Villamil y Martínez, 2009)

Además el alto rendimiento en el crecimiento puede ser producto de la actividad enzimática digestiva inducida por los probióticos. Muchas bacterias probióticas contienen enzimas extracelulares tales como amilasa, lipasa, proteasa que hidrolizan carbohidratos, lípidos y proteínas en partículas estructuralmente más pequeñas (azúcares, ácidos grasos, péptidos y aminoácidos), haciendo más fácil la asimilación y digestibilidad de los alimentos ingeridos, lo que se traduce en una mejor absorción de nutrientes y con ello un mayor crecimiento y estado nutricional del animal (Mohapatra et al., 2012; Welker y Lim, 2011; Wang et al., 2008a).

Algunos reportes en donde los suplementos probióticos han tenido un marcado efecto sobre la actividad enzimática de la proteasa, amilasa y lipasa ha sido en carpa común (*Cyprinus carpio*) alimentada con *Bacillus* sp. (Yanbo y Zirong, 2006), en la dorada (*Sparus aurata*) alimentada con *Lactobacillus* spp. (Suzer et al., 2008), en tilapia nilótica (*O. niloticus*) alimentada con *L. plantarum* NIOFSD018 (Essa et al., 2010), en rohu (*L. rohita*) alimentada con *B. subtilis*, *L. lactis* y *S. cerevisiae* (Mohapatra et al., 2012).

Es necesario tener en cuenta que el rendimientos en el crecimiento de los juveniles de tilapia roja posterior al tratamiento con *L. plantarum* Lab 9, probablemente sean aún mayores en condiciones

reales de cultivo (estanques de tierra, jaulas flotantes), debido a que en los acuarios, estanques de plástico o de concreto que son las unidades experimentales comúnmente utilizadas para realizar este tipo de ensayos, la producción de microalgas y zooplancton es insignificante y con bajos niveles de nutrientes suspendidos en el medio, condiciones que también son indispensables y que aportan al crecimiento del animal. Esta situación se pone de manifiesto en el estudio de Balan y Martínez (2007), quienes reportaron un efecto significativo de microorganismos eficientes (EM) sobre el incremento de peso y longitud en tilapias (*O. niloticus*) que fueron criadas en estanques de tierra, sin embargo el crecimiento de tilapias que fueron mantenidas bajo condiciones de laboratorio (acuarios), los rendimientos en el crecimiento no fueron tan favorables. Estos autores atribuyen la diferencia en los resultados, a la manipulación constante de los peces y al mantenimiento diario de las peceras.

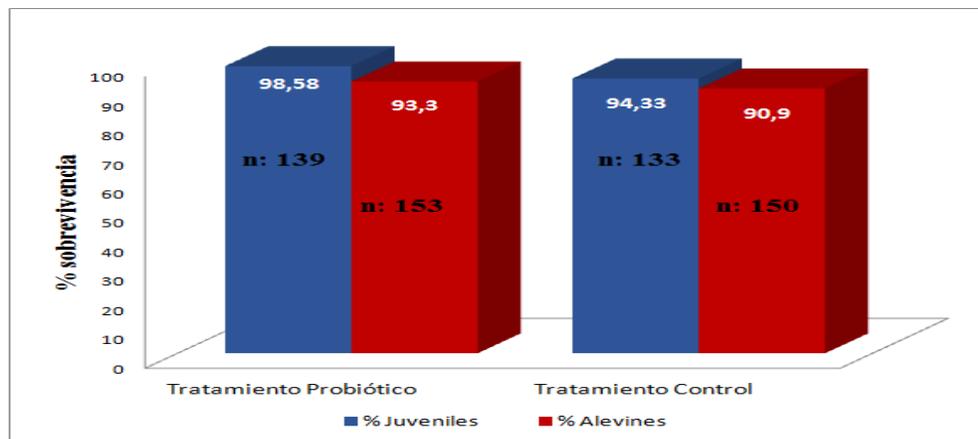
### 8.7 Estimación de la sobrevivencia de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) luego de la alimentación con *Lactobacillus plantarum* Lab 9.

#### 8.7.1 Estimación de la sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE I.

Durante el periodo de adaptación de los alevinos y juveniles de tilapia roja a las condiciones de cautividad (15 días), se registró un porcentaje de sobrevivencia del 91,4% en los alevinos y del 94% en los juveniles, quedando vivos un total de 329 alevinos y 282 juveniles, con los cuales se inició el ensayo experimental con el probiótico.

Después de 30 días de alimentación con el concentrado probiótico, los juveniles presentaron un porcentaje de sobrevivencia del 98,58%, muy similar al obtenido en el grupo de tilapias que recibieron el concentrado control, las cuales también mantuvieron una alta sobrevivencia equivalente al 94,33%. Aunque estas diferencias no son significativas ( $P > 0.01$ ) (Figura 7). En alevinos que recibieron el tratamiento probiótico y control por 30 días, no se observó diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia ( $P > 0.01$ ), los cuales fueron equivalentes al 93.3% y 90.9%, respectivamente (Figura 7).

Figura 7. Porcentajes de sobrevivencia de los alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) a los 30 días de tratamiento con el concentrado probiótico y control.

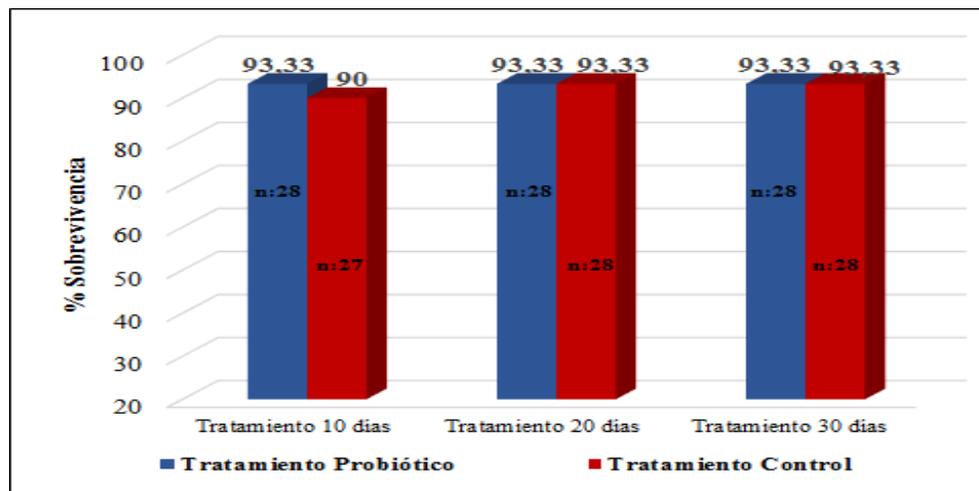


Fuente: Esta investigación

### 8.7.2 Estimación de la sobrevivencia de los juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que fueron sometidos a las condiciones del EE II.

En el periodo de adaptación (n: 180 individuos) no se registró la mortalidad de ningún individuo, por lo tanto durante este periodo la sobrevivencia fue del 100%. En todos los acuarios que recibieron el concentrado probiótico y control durante 10, 20 y 30 días, se registró una sobrevivencia del 93.33%, a excepción del grupo de juveniles que recibieron el tratamiento control por 10 días (Figura 8). No hubo diferencias significativas en las tasas de sobrevivencia en ninguno de los tratamientos ( $P > 0.01$ ).

Figura 8. Porcentajes de sobrevivencia de los juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) a los 10, 20 y 30 días de tratamiento.



Fuente: Esta investigación.

Los resultados obtenidos en el EE II, reflejan que los porcentajes de sobrevivencia no fueron estadísticamente diferentes ( $P > 0.01$ ) entre los tratamientos probiótico y control, situación contraria a la que se describe en otros reportes, en los cuales el suministro de probióticos favoreció la sobrevivencia de los individuos. Por ejemplo, Aly et al. (2008), reportan porcentajes de sobrevivencia equivalentes al 96% y 86% en crías de tilapia negra (*O. niloticus*) alimentadas con *L. acidophilus* y alimento control durante 30 días, respectivamente; Ferguson et al. (2010), encontraron una sobrevivencia del 100% en las tilapias que fueron alimentadas con *P. acidilactici* durante 32 días, contrario a las tilapias del tratamiento control que alcanzaron sobrevivencias del 88,3%; Lara et al. (2010), registran sobrevivencias mayores al 91% en tilapia negra alimentada con una mezcla probiótica a base de *S. faecium*, *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* durante 9 meses y porcentajes de sobrevivencia del 75% en las tilapia alimentadas con el alimento control; Abumourad et al. (2013); comprobaron que la adición de *L. plantarum* en la dieta de tilapia negra durante 30 días, mejora significativamente la sobrevivencia con porcentajes del 91%, frente al 81% registrado en los juveniles que recibieron el tratamiento control; de Mello et al. (2013), encontraron que el porcentaje de sobrevivencia fue mayor en las tilapias alimentados con *B. cereus* y *B.subtilis* (89,47%) en relación a los peces del grupo control (76,61%).

Aunque en estos estudios ha quedado en evidencia el efecto benéfico del probiótico en la sobrevivencia del hospedero, existen otras investigaciones en los cuales el probiótico no genera

dicho efecto, tal como sucedió en esta investigación. Por ejemplo, Meurer et al. (2006), manifestaron que la utilización de *S. cerevisiae* como probiótico no mejora las tasas de sobrevivencia en tilapias negras (*O. niloticus*); Apún (2007), encontró que la sobrevivencia de tilapias (*O. niloticus*) que fueron tratadas durante 132 días con Lactococcus en el alimento y Bacilos en el agua, presentaron igual tasa de sobrevivencia que aquellas que no recibieron el tratamiento; Nakandakare (2010), observó que no hubo influencia del probiótico PAS TR® (*B. toyoi* y *B. subtilis*) en la sobrevivencia de tilapia negra (*O. niloticus*); Barbosa et al. (2011), hallaron igual sobrevivencia tanto en los juveniles de robalo (*C. parallelus*) que se alimentaron con *L. plantarum* como en los que no les fue suministrada la bacteria en el alimento; Carvalho et al. (2011) y Tachibana et al. (2011), evidenciaron que el tratamiento con *B. subtilis* no altero la sobrevivencia de alevinos y larvas de tilapia negra, respectivamente; Vaz (2012), concluyó que *B. subtilis* y *B. cereus* no incide en la sobrevivencia de juveniles de pacu (*P. mesopotamicus*).

A diferencia de estos estudios, otra situación fue notable en la investigación de Sridhar et al. (2006), en donde las bacterias probióticas no mejoraron la sobrevivencia de truchas arcoíris (*O. mykiss*) durante el periodo de tratamiento, sin embargo, incrementaron las tasas de sobrevivencia cuando los peces fueron sometidos a un desafío con *Aeromonas salmonicida*. En este contexto, algunos autores declaran que para poder observar el efecto real del probiótico, se requiere algún estímulo estresante que permita expresar los efectos benéficos del probiótico en el hospedero, así lo considera Bucio (2004), quien sostiene que los probióticos son principalmente eficaces cuando prevalecen condiciones estresantes, consideración que también es relevante para Merrifield et al. (2010c), quienes manifiestan que el alcance total de los beneficios que pueden aportar los probióticos, son mejor expresados cuando existen pobres condiciones de crianza, condiciones de estrés o pruebas de desafío. Así lo demuestran algunos estudios en donde los animales han sido sometidos alguna condición de estrés como, altas densidades (Gonçalves et al., 2011), alimentos con niveles de proteína inapropiados (Lara et al., 2010), desafíos con patógenos como *A. salmonicida* (Sridhar et al., 2006; Irianto y Austin, 2002), *Aeromonas hydrophila* (Kumar et al., 2006), *Edwardsiella tarda* (Pirarat et al., 2006; Taoka et al., 2006), *Streptococcus* sp. (Son et al., 2009), *V. anguillarum* (Sharifuzzaman y Austin, 2010), en todos estos reportes el probiótico ha demostrado efectos significativos.

Con base a lo anterior y teniendo en cuenta que las condiciones que se manejaron en esta investigación fueron aparentemente óptimas (no hubo desafíos, los parámetros del agua estuvieron dentro del rango establecido, condiciones medio ambientales estables, alimento apropiado), es factible que esta haya sido la razón por la que fue menos evidente el efecto de *L. plantarum* Lab 9 sobre la sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja.

## CONCLUSIONES

- La adherencia de la *L. plantarum* Lab 9 en el intestino de juveniles de tilapia roja y la ausencia de esta bacteria en el intestino de los alevinos, demostró que el estadio del animal puede influir en la adherencia la bacteria probiótica.
- La disminución en el número de UFC/g de *L. plantarum* Lab 9 tras incrementar el periodo de alimentación con el concentrado probiótico (10, 20 y 30 días) en los juveniles de tilapia roja, demostró que no existe un relación directa entre los tiempos de administración prolongados y la permanencia o la adherencia de bacterias probióticas en el intestino.
- A partir del análisis de permanencia de *L. plantarum* Lab9 en el intestino de los juveniles de tilapia roja, se estableció un régimen de alimentación que incluye 10 días de tratamiento con el concentrado probiótico y 10 días de suspensión, por ciclos alternados.
- Se logró confirmar la adherencia de *L. plantarum* Lab 9 al intestino mediante análisis microbiológico y microscopía de luz en el intestino de juveniles de tilapia que recibieron el tratamiento probiótico durante 10 días, sin embargo la confirmación por TEM requiere mejorar las condiciones para su análisis.
- La adherencia de *L. plantarum* Lab 9 influyó para que los juveniles de tilapia roja presentaran mejores parámetros de crecimiento, contrario a los alevinos donde no fue posible encontrar a la bacteria probiótica en el intestino.
- La ausencia de un factor de estrés en los dos ensayos experimentales, puede incidir para que no fuese evidente el efecto de *L. plantarum* Lab9 en la sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja.
- *L. plantarum* Lab 9 mejora los parámetros de crecimiento de los juveniles de tilapia roja, pero no genera un efecto significativo en el crecimiento de los alevinos, de hecho tampoco influye en la sobrevivencia de ambos estadios.

## RECOMENDACIONES

- Los probióticos que se pretendan incorporar en la dieta de algún pez en particular, deben venir incluidos en la ración de alimento y en una dosis determinada, con la finalidad de evitar que el personal de campo encargado haga una mala dosificación del probiótico, prepare mal la mezcla o que utilice implementos e instalaciones inadecuadas que pueden alterar la calidad y viabilidad final del producto.
- Aunque los microorganismos probióticos han demostrado efectos favorables en el hospedero luego de un suministro a corto o a largo plazo, surge la necesidad de establecer los tiempos de administración óptimos para este tipo de productos, con el fin de maximizar los efectos del probiótico.
- Se debe evaluar mediante técnicas moleculares el tiempo de permanencia de *L. plantarum* Lab9 en el intestino de juveniles de tilapia roja, con el fin de determinar si los tiempos permanencia de esta bacteria son más prolongados que los establecidos en esta investigación.
- En un futuro estudio sería importante determinar si la alimentación por ciclos alternados con *L. plantarum* Lab9 resulta ser efectiva sobre parámetros de crecimiento, en condiciones reales de cultivo.
- Se debe contemplar la posibilidad de evaluar el efecto de *L. plantarum* Lab9 sobre la sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja, pero incluyendo alguna variable o condición de estrés, que permita esclarecer si esta bacteria es capaz de mantener altas tasas de sobrevivencia en los organismos, frente algún tipo de desafío.
- Teniendo en cuenta que en Colombia la disponibilidad de probióticos para uso en acuicultura es limitada, se espera que nuevos estudios se centren en la búsqueda rigurosa de microorganismos probióticos nativos potenciales, que puedan mejorar la sobrevivencia, fortalecer el sistema el sistema inmunológico e incrementar las tasas de crecimiento de los peces de importancia acuícola comercial de nuestro país.

## BIBLIOGRAFIA

(IRG) INTERNATIONAL RESOURCES GROUP y (CNP+LH) CENTRO NACIONAL DE PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA DE HONDURAS. (2009). Guía de buenas prácticas ambientales para el cultivo de tilapia. Tegucigalpa, Honduras. 122p.

(OIE) Organización Mundial de Sanidad Animal. (2006). Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos

(SINGOAGRO S.C) SERVICIOS INTEGRALES PARA LA COMPETIVIDAD AGROPECUARIA, FUNDACIÓN PRODUCE VERACRUZ (FUNPROVER), COMISION VERACRUZANA DE COMERCIALIZACIÓN AGROPECUARIA (COVECA) (2009). Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad.

Abdullah, H. (2005). Some comparative histological studies on alimentary tract of tilapia fish (*Tilapia spilurus*) and sea bream (*Mylio cuvieri*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31(1), 387-397.

Abumourad, I., Abbas, W., Awaad, E., Authman, M., El-Shafei, K., Sharaf, O., ... El-Sayed, H. (2013). Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: emphasis on growth performance and innate immunity. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(1), 572-582.

Adlerberth, I., Cerquetti, M., Poilane, I., wold, A., y Collignon, A. (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(2), 223-239.

Aguilar, F., Afanador, G., y Muñoz, A. (2010). Efecto del procesamiento de la dieta sobre el desempeño productivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus* Var. Chitralada) en un ciclo comercial de producción. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57, 104-118.

Al-Dohail, M., Hashim, R., y Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40, 1642-1652.

Aldrich, H., y Mollenhauer, H. (1986). Secrets of successful embedding, sectioning, and imaging. *Ultrastructure Techniques for Microorganisms* (H.C. Aldrich and W.J. Todd, eds.) 101-132.

Ali, H., Ghazalah, A., Gehad, E., Hammouda, Y., y Abo-State, H. (2010). Practical Aspects and immune response of probiotics preparations supplemented to Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Diets. *Nature and Science*, 8(5), 39-45.

Aly, S., Abdel-Galil, Y., Abdel-Aziz, A., y Mohamed, M. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia

nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2), 128-136.

Apún, A. (2007). Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linneaus 1758), cultivada en el laboratorio. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Departamento de Acuicultura. Guasave, México. 58p.

Apún, J., Santamaría, A., Luna, A., Martínez, S., y Rojas, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8), 887-894.

Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., y Ringø, E. (2011). The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 17, 488-497.

Aubin, J., Gatesoupe, F., Labbé, L., y Lebrun, L. (2005). Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 36(8), 758-767.

Autoridad Nacional de Pesca y Acuicultura – AUNAP. 2013. Diagnostico del estado actual de la acuicultura en Colombia. Bogotá.

Bagheri, T., Hedayati, S., Yavari, V., Alizade, M., y Farzanfar, A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 43-48.

Balan, T., y Martínez, D. (2007). Uso de Microorganismos Eficientes (EM) en la Alimentación de la tilapia (*Oreochromis niloticus*). (Tesis de pregrado). Universidad EARTH. Guácimo-Limón, Costa Rica. 54p.

Balcázar, J., De Blas, I., Ruíz, I., Cunningham, D., Vendrell, D., y Múzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture (Review). *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 173–186.

Balcázar, J., De Blas, I., Ruiz, I., Vendrell, D., Calvo, A., Márquez, I., Gironés, O., y Muzquiz, J. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97(3), 522–527.

Balcázar, J., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz, I., Muzquiz, J., y Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4), 188-191.

Barandica, L. (2010). Influencia del inmuno-estimulador G1M1 en la dieta de Doradas juveniles *Sparus aurata*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Bellaterra, Barcelona. 32p.

Barbosa, M., Jatobá, A., Vieira, F., Correa, B., Pedreira, J., Andreatta, E., Quadros, W., y Ronzani, V. (2011). Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus*) Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 795-801.

Barrera, R., y Paz, C. (2006). Control de alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Perciforme: Cichlidae) usando guapote lagunero (*Parachromis dovii*) (Perciforme: Cichlidae) en los estanques de la universidad Earth. (Tesis de pregrado). Universidad Earth, Guácimo, Costa Rica. 65p.

Bolivar, N. (2008). Evaluación de sobrevivencia y respuesta inmunitaria de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* alimentados con bacterias lácticas probióticas y desafiados con *Pseudomona aeruginosa*. (Tesis de pregrado). Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa de Biología, Cali, Colombia.

Bricknell, I., y Dalmo, R. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*, 19(5), 457–472.

Brunt, J., y Austin, B. (2008). Probiotics: a viable method of disease control in aquaculture. *Biologist*, 5(2), 88-93.

Bucio, A. (2004). *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish. (Ph.D Thesis). Wageningen University, Laboratory of Food Microbiology, Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen, The Netherlands. 131p.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J., Verreth, J., Bucio, L., y Zwietering, M. (2009). Kinetics of *Lactobacillus plantarum* 44a in the faeces of tilapia (*Oreochromis niloticus*) after its intake in feed. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1967-1975.

Buglione, C., Pedrotti, F., Vieira, F., Seifert, W., Mouriño, J., y Martins, M. (2008). Avaliação de bacterina e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção experimental por *Vibrio harveyi* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science*, 45, 40-45.

Buntin, N., Chanthachum, S., y Hongpattarakere, T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 141-148.

Burghardt, R., y Droleskey, R. (2006). Current Protocols in Microbiology. Transmission Electron Microscopy. DOI: 10.1002/9780471729259.mc02b01s03.

Burr, G., y Gatlin, D. (2005). Microbial ecology of gastrointestinal tract of fish and the potencial application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4), 425-436.

Carnevali, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., y Cresci, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1-4), 430-438.

Carvalho, J., Lira, A., Costa, D., Moreira, E., Pinto, L., Abreu, R., y Albinati, R. (2011). Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção animal*, 12(1), 176-187.

- Castro, L., y Rovetto, C. (2006). Probióticos: Utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4), 308-314.
- Cha, J-H., Rahimnejad, S., Yang, S-Y., Kim, K-W., y Lee, K-J. (2013). Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture*, 402-403, 50-57.
- Chaiyapechara, S. (2008). Bacteria associated with the gastrointestinal tract of rockfish (*Sebastes* sp.) larvae reared in aquaculture settings. (Ph.D Thesis). University of Washington, School of Aquatic and Fishery Sciences, Washington, USA. 191p.
- Collado, M., Meriluoto, J., y Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 22(5), 1065-1073.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., y Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-258.
- Delgado, F., Gallardo, A., Cuevas, L., y García, M. (2009). Crecimiento compensatorio en tilapia *Oreochromis niloticus* posterior a su alimentación con harina de plátano. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 13(2), 55-70.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., y Beev, G. (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research*, 1(1):29.
- Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios (ICA). 2013. Productos Alimentos para Animales y Sales con Registro Vigente a 16 de Septiembre de 2013. URL Disponible en: <http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Alimentos-para-Animales/Listados/2013/SEP-16-Productos-Alimentos-para-Animales-y-Sales-2.aspx>
- Dotta, G. (2008). Resposta inflamatória aguada em tilapia do nilo alimentada com probiótico, *Lactobacillus plantarum* na dieta. (Tese de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Pos-graduação Em Aqüicultura, Florianópolis-SC, Brasil. 35p.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S., y Gruss, A. (2000). Mini-review: *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 83-86.
- El-Ezabi, M., El-Serafy, S., Essa, M., Lall, S., Daboor, S., y Esmael, N. (2011). The viability of probiotics as a factor influencing the immune response in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 15(1), 105-124.
- El-Haroun, E., Goda, A., y Chowdhury, M. (2006). Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473-1480.

El-Rhman, A., Khattab, Y., y Shalaby, A. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 175–180.

Escobar, L., Olvera, M., y Puerto, C. (2006). Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones en: VIII SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 15-17 noviembre. Monterrey, Nuevo León, México, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Essa, M., El-Serafy, S., El-Ezabi, M., Daboor, S., Esmael, N., y Lall, S. (2010). Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 5(2), 143-161.

Estrada, A., Gutiérrez, L., y Montoya, O. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 58(1), 2601-2609.

FAO/WHO. 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria Córdoba, Argentina.

FAO. (2009). El estado actual de la pesca y la acuicultura (2008). ISBN 978-92-5-306029-0- Roma.

FAO-INCODER. (2011). Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia. Diagnóstico del Estado de la Acuicultura en Colombia. URL Disponible en: [http://www.ceniagua.org/archivos/Diagnostico\\_para\\_revision\\_Dic\\_5\\_\(2011\)\\_v1.pdf](http://www.ceniagua.org/archivos/Diagnostico_para_revision_Dic_5_(2011)_v1.pdf)

Faramarzi, M., Kiaalvandi, S., Lashkarbolooki, M., y Iranshahi, F. (2011). The investigation of *Lactobacillus acidophilus* as probiotics on growth performance and disease resistance of Rain Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 6(1), 32-38.

Ferguson, R., Merrifield, D., Harper, G., Rawling, M., Mustafa, S., Picchiatti, S., Balcázar, J., y Davies, S. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 851–862.

Fuiman, L. (2002). Special considerations of fish eggs and larvae, p. 1-32. In L. A. Fuiman and R. G. Werner (ed.), *Fishery Science, the Unique Contributions of Early Life Stages*. Oxford, UK.

Fuller, R. (1992). History and Development of Probiotics. In “Probiotics”, ed. R. Fuller, pp. 1-8. Chapman & Hall, N.Y.

Fuller, R. (2006). Reasons for the apparent variation in the probiotic response. *Biología*, 61(6), 751-754.

Ganguly, S., y Prasad, A. (2011). Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22, 11-16.

- Gatesoupe, F. (1999). The use of probiotics in aquaculture (Review). *Aquaculture*, 180(1-2), 147-165.
- Gatesoupe, F. (2000). Uso de probióticos en acuicultura. pp 463-472 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, (1998). La Paz, B.C.S., México.
- Gatesoupe, F. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3), 107-114.
- Ghazalah, A., Ali, H., Gehad, E., Hammouda, Y., y Abo-State, H. (2010). Effect of probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed low protein diets. *Nature and Science*, 8(5), 46-53.
- Giri, S., Sen, S., y Sukumaran, V. (2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6), 1135-1140.
- Gómez, E., Tovar, M., Obando, M., y Hurtado, H. (2010). Estudio histológico del tracto digestivo del pez *Ariopsis seemanni* (Ariidae). *Revista Facultad de Ciencias Básicas Universidad Militar Nueva Granada*, 6(2), 216-225.
- Gómez, G., y Balcázar, J. (2008). Mini-review: A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145-154.
- Gonçalves, A., Maita, M., Futami, K., Endo, M., y Katagiri, T. (2011). Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 77(4), 633-642.
- Grosell, M., Farrell, A., y Brauner, C. (2011). The multifunctional gut of fish. 1ª ed. United States of America, Elsevier Inc. Vol 30.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., y Métailler, R. (2004). Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. España, MundiPrensa. 474p.
- Harper, G., Monfort, M., Saoud, I., Emery, M., Mustafa, S., Rawling, M., ... Merrifield, D. (2011). An *ex vivo* approach to studying the interactions of *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio (Listonella) anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research & Development*, 3(Special section), 1.
- Heo, W-S., Kim, Y-R., Kim, E-Y., Bai, S., y Kong, I-S. (2013). Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 376-379, 20-24.
- Hernández, P. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 469. Rome, FAO. (2005). 97p.

- Irianto, A., y Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6), 333-342.
- Jatobá, A., Vieira, F., Buglione, C., Corrêa, B., Pedreira, J., Tomas, G., Dotta, G., y Laterça, M. (2008). Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilapia-do-nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(9), 1201-1207.
- Jatobá, A., Vieira, F., Buglione-NETO, C., Mouriño, J., Silva, B., Quadros, W., y Andreatta, E. (2011). Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(4), 725–732.
- Jöborn, A., Olsson, J., Westerdahl, A., Conway, P., y Kjelleberg, S. (1997). Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20(5), 383-392.
- Jurado, H. (2010). Evaluación de microorganismos lácticos con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de destete como alternativa al uso de antibióticos para la prevención de infecciones entéricas. (Tesis doctoral) Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Cali-Colombia. 144p.
- Kesarcodi, A., Kaspar, H., Lategan, M., y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and Mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- Khalafalla, M. (2010). Growth response of *Oreochromis niloticus* fingerlings to diets containing different levels of Biogen. *Journal of Agricultural Research Kafer El-Shiekh Univ*, 36(2), 97-110.
- Kim, D-H., y Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 21(5), 513-524.
- Kirjavainen, P., Ouwehand, A., Isolauri, E., y Salminen, S. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), 185-189.
- Kolndadacha, O., Adikwu, I., Okaeme, A., Atiribom, R., Mohammed, A., y Musa, Y. (2011). The role of probiotics in aquaculture in Nigeria—a review. *Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 5(1), 8-15.
- Kristiansen, M., Merrifield, D., Gonzale, J., Myklebust, R., y Ringø, E. (2011). Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research & Development*, S1:009. doi:10.4172/2155-9546.S1-009.
- Kubitza, F. (2009). Producción de tilapias en estanques excavados en tierra: estrategias avanzadas en manejo. *Panorama da Aqüicultura*.
- Kumar, R., Mukherjee, S., Pani Prasad, K., y Pai, A. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research*, 37(12), 1215-1221.

Lara, M., Briones, L., y Olvera, M. (2002). Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en: MEMORIAS DEL VI SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 3 al 6 de septiembre de (2002). Cancún, Quintana Roo, México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida.

Lara, M. (2003). Aislamiento e identificación de microorganismos nativos del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con potencial probiótico. (Tesis doctoral). Centro de investigación y estudios avanzados del IPN Unidad Mérida, Mérida, México. 135p.

Lara, M., Olivera, L., y Olvera, M. (2010). Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 2(4), 93-101.

Lara, M. (2011). The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology*, 2(12), 471-478.

Lauzon, H., Gudmundsdottir, M., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Martinsdottir, E., y Gudmundsdottir, B., (2010). Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. *Aquaculture*, 310, 139–144.

Lazado, C., Caipang, C., Brinchmann, M., y Kiron, V. (2011). *In vitro* adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 48(2-4), 252-259.

Londoño, L. (2011). Evaluación de las condiciones de secado de un alimento concentrado impregnado con la bacteria ácido láctica probiótica *Lactobacillus plantarum* Lab9 (CPQBA 144-09 DRM 03). (Tesis de pregrado). Universidad Del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos, Cali, Colombia. 62p.

Lopez, B., y Cruz, L. (2011). Elaboración de un probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la tilapia roja (*Oreochromis* spp.) en etapa de engorde en la zona de santo domingo. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, Santo Domingo, Ecuador. 95p.

Macey, B., y Coyne, V. (2006). Colonization of the Gastrointestinal Tract of the Farmed South African Abalone *Haliotis midae* by the Probiotics *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Marine Biotechnology*, 8(3), 246-59.

Manju, R., Haniffa, M., Arun, S., Muthu, C., Dhanarai, M., Xavier, B., Seetharaman, S., y Jesu, A. (2011). Effect of dietary administration of Efinol® FG on growth and enzymatic activities of *Channa striatus* (Bloch, 1793). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(6), 796-801.

Marte, J. (2004). Tinción Gram. Guía de estudio para laboratorio. Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Departamento de Medicina. Santiago, República Dominicana.

Marzouk, M., Moustafa, M., Nermeen M., y Mohamed M. (2008). The influence of some probiotics on the growth performance and intestinal microbial flora of *O. niloticus* en: 8TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE. October 12-14 (2008). Cairo, Egypt, Cairo University, Faculty of Veterinary Medicine.

Mehrim, A. (2009). Effect of Dietary Supplementation of Biogen® (Commercial Probiotic) on Mono-Sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Different Stocking Densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4(6), 261-273.

Mello, H., Moraes, J., Garcia, I., Ruas, F., Ozório, R., Tie, M., Engracia, J., ... Claudiano, G. (2013). Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(6), 724-730.

Merrifield, D., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Baker, R., Børgwald, J., Castex, M., y Ringø, E. (2010a). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2), 1-18.

Merrifield, D., Harper, G., Dimitroglou, A., Ringø, E., y Davies, S. (2010b). Short communication: Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, 41(8), 1268-1272.

Merrifield, D., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R., y Davies, S. (2010c). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16(5), 504-510.

Merrifield, D., Harper, G., Mustafa, S., Camevali, O., Picchiatti, S., y Davies, S. (2011a). Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research*, 344(1), 135-146.

Merrifield, D., Bradley, G., Harper, G., Baker, R., Munn, C., y Davies, S. (2011b). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 17(1), 73-79.

Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M., Mauerwerk, V., y Freccia, A. (2006). Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual submetidas a umdesafiosanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(5), 1881-1886.

Mohamed, T., y Refatat, I. (2011). Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. *Aquaculture Research*, 43, 843-852.

Mohamed, A., Traifalgar, R., y Serrano, A. (2013). Assessment of Probiotic Application on Natural Food, Water Quality and Growth Performance of Saline Tilapia *Oreochromis mossambicus* L. Cultured in Concrete Tanks. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2013(75), 1-7.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A., Das, P., Paniprasad, K., y Mohanta, K. (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth,

nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18(1), 1-11.

Montalvo, C. (2010). Bioconservación de cárnicos de cerdo con bacterias ácido lácticas. (Tesis de maestría). Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos, Cali, Colombia.

Nakandakare, I. (2010). Inclusão de probióticos no processamento de ração para tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* variedade gift. (Tese de mestrado). Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, São Paulo, Brasil. 63p.

Nayak, S. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish (Review). *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.

Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A., Mutani, A., Ramsuhag, A., Brunt, J., y Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1699-1706.

Ng, S., Hart, A., Kamm, M., Stagg, A., y Knight, S. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent Advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(2), 300-310.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., y Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198(3-4), 229-236.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S., y Lilius, E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15(5), 443-452.

Nwogu, N., Olaji, E., y Eghomwanre, A. (2011). Application of probiotics in Nigeria aquaculture: current status, challenges and prospects. *International Research Journal of Microbiology*, 2(7), 215-219.

O'Sullivan, D. (2001). Screening of intestinal microbiota for effective probiotic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49(4):1751-1760.

Ouwehand, A., y Salminen, S. (2003). *In vitro* Adhesion Assays for Probiotics and their in vivo Relevance: A Review. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15(4), 175-184.

Padrós y Zarza. (2005). Manual de técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces. V Curso de Ictiopatología Práctica para Piscicultores. Situación Sanitaria Actual del Cultivo de la Dorada y Lubina

Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., y Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243(1-4), 241-254.

- Pedrosa, V. (2009). Lesões anatomopatológicas associadas à ocorrência bacterioses em tilápias (*Oreochromis niloticus*) de diferentes sistemas de cultivo em Pernambuco/Brasil. (Tese de mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca, Recife, Brasil. 60p.
- Pereira, S. (2013). Parâmetros imunológicos de surubins vacinados e suplementados com probiótico. (Tese de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Aquicultura, Florianópolis-SC, Brasil.
- Pérez, T., Balcázar, J., Ruiz, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., y Múzquiz, J. (2010). Host – microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*, 3(4), 355-360.
- Pérez, T. (2011). Selección y evaluación de cepas probióticas para la prevención de la Lactococosis en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal, Zaragoza, España. 124p.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., y Lyndon, A. (2008). Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), 723-732.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., y Endo, M. (2006). Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(3-4), 339-347.
- Poot, W. (2001). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) bajo condiciones de cultivo. (Tesis de pregrado). Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida, México. 46p.
- Qi, Z., Zhang, X., Boon, N., y Bossier, P. (2009). Probiotics in aquaculture of China - Current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 209(1-2), 15-21.
- Quiñónez, D. (2008). Efecto de bacterias ácido lácticas y levaduras con potencial probiótico en el cultivo de las tilapias *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Acuicultura, Guasave, Sinaloa, México. 57p.
- Ramírez, C. (2005). Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões (*Litopenaeus vannamei*) como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. (Tesis Doctoral). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 153p.
- Ran, C., Carrias, A., Williams, A., Capps, N., Dan, B., Newton, J., Kloepper, J., ... Lile, M. (2012). Identification of Bacillus Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. *PLoS ONE* 7(9): e45793. doi:10.1371/journal.pone.0045793
- Ridha, M., y Azad, I. (2012). Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. *Aquaculture Research*, 43(6), 843-852.

- Ringø, E., Strøm, E., y Tabachek, J. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26(10), 773-789.
- Ringø, E., y Gatesoupe, F. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3-4), 177-203.
- Ringø, E., Lødemel, J., Myklebust, R., Kaino, T., Mayhew, T., y Olsen, R. (2001). Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), 294-300.
- Ringø, E., Olsen, R., Mayhew, T., y Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 227(1-4), 395-415.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T., y Olsen, R. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1-4), 251-264.
- Ringø, E., Iovmø, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R., y Mayhew, T. (2010). Review: Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41(4), 451-467.
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., y Ouweland, A. (2003). Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology*, 97(1-2), 55-61.
- Romero, J., Feijoo, C., y Navarrete, P. (2012). Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech.
- Rosmini, M., Sequeira, G., Guerrero, I., Martí, L., Dalla, R., Frizzo, L., y Bonazza, J. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3, 181-191.
- Rubio, M., Cabrera, A., Silveira, R., AGUILERA, Y. (2010). Variabilidad bacteriana en *Oreochromis* sp. durante las estaciones de lluvia y seca, cultivadas en ambiente dulceacuícola en diferentes regiones de Cuba. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11(7), 1-11.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., y Mattila, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological Properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Sahu, M., Swarnakumar, N., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., y Kannan, L. (2008). Review: Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 299-308.
- Saldaña, G. (2011). Efecto de dietas con diferentes concentraciones de *Lactobacillus* sp. enriquecido con proteína hidrolizada, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de *Oreochromis niloticus* en condiciones de laboratorio en: TERCER CONGRESO NACIONAL DE ACUICULTURA (2011). 23-25 de marzo del (2011). Lima- Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M., Olsen, R., Meseguer, J., y Ringø, E. (2008). *In vitro* studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Veterinary Microbiology*, 128(1-2), 167-177.
- Sanders, M., y Marco, M. (2010). Food formats for effective delivery of probiotics. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 65-85.
- Sharifuzzaman, S., y Austin, B. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3), 440-445.
- Sharifuzzaman, S., y Austin, B. (2010). Kocuria SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2162-2170.
- Sharifuzzaman, S., Al-Harbi, A., y Austin, B. (2014). Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout fed probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2. *Aquaculture*, 418-419(1), 55-61.
- Sihag, R., y Sharma, P. (2012). Probiotics: The new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, DOI: 10.3923/jfas.2012.
- Soccol, C., de Souza, L., Spier, M., Medeiros, A., Yamaguishi, C., Lindner, J., Pandey, A., y Thomaz, V. (2010). The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Son, V-M., Chang, C-C., Wu, M-C., Guu, Y-K., Chiu, C-H., y Cheng, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5), 691-698.
- Sorongon, M., Bloodgood, R., y Burchard, R. (1991). Hydrophobicity, Adhesion, and Surface-Exposed Proteins of Gliding Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3193-3199.
- Souza, R., Mouriño, J., Vieira, F., Buglione, C., Andreatta, E., Seiffert, W., y Cerqueira, V. (2010). Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 36(1), 17-24.
- Sridhar, M., Sridhar, N., Robertson, P., y Austin, B. (2006). Role of gut probiotics in enhancing growth and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fingerlings. *Asian Fisheries Science*, 19(1), 1-13.
- Standen, B., Rawling, M., Davies, S., Castex, M., Foey, A., y Gioacchini, G., Carnevali, O., y Merrifield, D. (2013). Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localized intestinal and peripheral immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(4), 1097-104.

- Sugimura, Y., Hagi, T., y Hoshino, T. (2011). Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: Screening of new candidate carp probiotics. *Bioscience - Biotechnology and Biochemistry*, 75(3), 511-515.
- Sun, Y-Z., Yang, H-L., Ma, R-L., y Lin, W-Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 803-809.
- Suzer, C., Çoban, D., Okan, H., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., y Küçüksari, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280(1-4), 140-145.
- Tachibana, L., Dias, D., Massatoshi, C., Fernandes, C., Gervásio, A., y Tavares, M. (2011). Probiótico na alimentação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), durante a inversão sexual: desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. *Bioikos Campinas*, 25(1), 25-31.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J-Y., Kim, S-M., Park, S-LL., Yoshikawa, T., y Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 72(4), 755-766.
- Tengjaroenkul, B. (2000). Ontogenic morphology and enzyme activities of the intestinal tract of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 182,317-327.
- Timmerman, H., Koning, C., Mulder, L., Rombouts, F., y Beynen, A. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), 219-233.
- Tovar, D. (2002). Potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. (Tesis Doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz Baja California, México. 427p.
- Tovar, D., Reyes, M., Guzmán, L., Gleaves, V., Civera., Ascencio, F., Garcia, V., ... Linares, M. (2008). Prebióticos en Acuicultura: Avances Recientes del Uso de Levaduras en Peces Marinos en: IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 24-27 Noviembre. Monterrey, Nuevo León, México, Universidad Autónoma de Nuevo León. 237-257p.
- Usgame, D., Usgame, G., y Valverde, C. (2008). Agenda productiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la tilapia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Proyecto estudio de prospectiva tecnológica de la cadena colombiana de la tilapia. Bogotá-Colombia.
- Van, M., y Miller, M. (2011). *Lactobacillus* Adhesion to Mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.
- Vásquez, W. (2004). Principios de nutrición aplicada al cultivo de peces. Universidad de los Llanos-Colombia. ISBN: 9589728936.
- Vaz, T. (2012). Probiótico na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e desempenho produtivo. (Tese de mestrado). Universidade

Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-São Paulo, Brasil. 81p.

Vázquez, J., Gonzáles, M., y Murado, M. (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245(1-4), 149-161.

Vega, F., Rojas, C., Espinosa, C., Zuñiga, L., Nolasco, H. (2011). Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el crecimiento y supervivencia de *Oreochromis aureus* en cultivos experimentales. *REDVET Revista electrónica de veterinária*, 12(6), 1-13.

Vendrell, D., Balcázar, J., de Blas, I., Ruiz, I., Gironés, O., y Múzquiz, J. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 31(4), 337-345.

Verschuere, L., Roubaut, G., Sorgeloos, P., y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.

Vieira, F., Buglione, C., Pedreira, J., Jatobá, A., Ramirez, C., Laterça, M., Barracco, M., y vinatea, L. (2008). Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(6), 763-769.

Villa, A. (2009). Aislamiento y selección de microorganismos lácticos probióticos de cultivos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) para elaboración de inóculos protectores de patógenos en acuicultura. (Tesis de pregrado). Universidad del Valle, Programa de Biología, Cali, Colombia. 72p.

Villamil, L., y Martínez, M. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 38(2), 165-187.

Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., y Reinheimer, J. (2010). Cambios en la funcionalidad de bacterias probióticas desde la producción al consumo. Cap. 3, p. 43. en: Abraham, A., Rivera, J., Araujo, C., Araya, R., Binetti, A., Bolla, P., Burns, P. et al. Aspectos Probióticos y Tecnológicos de las bacterias lácticas. Edición (2010). Universidad Nacional de la Plata, La Plata.

Vine, N., Leukes, W., y Horst, K. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30(3), 404-427.

Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., y Quentel, C. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258(1-4), 470-478.

Wang, Y-C., Yu, R-C., y Chou, C-C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 209-217.

Wang, Y-B., Rong, J y Junda, L. (2008a). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1-4), 1-4.

Wang, Y-B., Tian, Z-Q., Yao, J-T., y Li, W-F. (2008b). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277(3-4), 203-207.

Welker, L., y Lim, C. (2011). Use of Probiotics in Diets of Tilapia. *Aquaculture Research & Development*, 1, 14.

Yanbo, W., y Zirong, X. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127 (3-4), 283-292.

Yousefian, M., y Amiri, M. (2009). Review: A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology*, 8(25), 7313-7318.

Zhou, X., Ziqiang, T., Wang, Y., y Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiol Biochem*, 36, 501–509.

## ANEXOS

### ANEXO A. Composición proximal e ingredientes del concentrado Mojarra 38

Lista de ingredientes y composición proximal del concentrado extrudizado Mojarra 38.

Ingredientes	
Harina de Pescado	Biotina
Torta de soya y algodón	Pantotenato de Calcio
Salvado de trigo	Ácido fólico
Yuca harina	Sulfatos de hierro y cobre
Arroz Integral	Óxidos de zinc y manganeso
Carbonato de Calcio	Antioxidantes B.H.T
Harina de hueso	Yoduro de Potasio
Cloruro de colina	Vitaminas
Niacina	

Composición Proximal	
Proteína mínima	38%
Grasa mínima	4%
Ceniza máxima	12%
Humedad máxima	13%
Fibra máxima	4%

Fuente: <http://www.solla.com>