

**EVALUACION DEL EFECTO DE AISLADOS BACTERIANOS SOBRE EL PESO,
TALLA Y SUPERVIVENCIA A INFECCIONES EXPERIMENTALES EN
JUVENILES DE TILAPIA NILÓTICA *Oreochromis niloticus*.**

DIEGO FERNANDO ARDILA JAIME

**UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
SANTA MARTA
2010**

**EVALUACION DEL EFECTO DE AISLADOS BACTERIANOS SOBRE EL PESO,
TALLA Y SUPERVIVENCIA A INFECCIONES EXPERIMENTALES EN
JUVENILES DE TILAPIA NILÓTICA *Oreochromis niloticus*.**

DIEGO FERNANDO ARDILA JAIME

Documento final del trabajo de grado para
optar al título de Biólogo Marino

Director

LUISA MARCELA VILLAMIL DÍAZ, Ph. D

Biólogo Marino

Profesora titular Programa de Biología Marina
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CULTIVO
Y MANEJO DE ORGANISMOS ACUATICOS

Codirector

ADOLFO MARIOSANJUAN MUÑOZ, M.Sc.

Biólogo Marino

Profesor titular Programa de Biología Marina

Asesor

María Angélica Martínez Silva

Biólogo Marino

UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA

SANTA MARTA

2010

Firma del director

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Santa Marta ___ de _____. _____

DEDICATORIA

Este trabajo deseo dedicarlo a mi padre Gerardo Ardila y a mi madre Sonia Rocio Jaime quienes con su inmenso cariño hicieron posible este sueño acompañándome incondicionalmente en mi aprendizaje. A la luz de mis ojos, Laura Marcela a quien espero brindarle siempre lo mejor, a Jorge, Andreita, sebas y la pequeña Sofía que han sido para mí una gran inspiración. A las personas que han ayudado en mi formación profesional y a la Universidad Jorge Tadeo Lozano

AGRADECIMIENTOS

A Dios, A mi padre Gerardo a quién admiro profundamente, a Sonia Rocio por su amor y confianza en mí y por ser la mejor mamá y mujer del mundo. A mis abuelos, a Jorge mi hermano mayor, a mis hermanitos, a ellos mil gracias por su cariño y desear siempre lo mejor para mi vida. A mi directora Luisa Marcela Villamil, gracias por brindarme y compartir conmigo su conocimiento, Adolfo Sanjuan Muñoz por acompañarme en mi formación profesional, María angélica Martínez por su gran apoyo científico y amistad, Carolina Noguera por su valiosa colaboración. A Lina Mejía por el inmenso amor que compartimos y su apoyo incondicional. A los amigos que más he querido en toda mi vida: Nico, Cristina y Mauro quienes han sido unos hermanos para mí y siempre voy a extrañar. A Juli y la churra por existir y ser tan especiales. A la universidad Jorge Tadeo Lozano, al laboratorio de biología molecular de la UJTL, al grupo de investigación GICMOA, al INVEMAR, al personal de laboratorio y a todos aquellos que de alguna manera estuvieron involucrados en mi desarrollo profesional.

TABLA DE CONTENIDO

LISTADO DE TABLAS.....	I
LISTADO DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUCCION JUSTIFICADA.....	1
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	2
2.1 Acuicultura en el mundo.....	3
2.2 Acuicultura en Colombia.....	4
2.3 Generalidades de la especie.....	5
2.4 Enfermedades en los cultivos de tilapia.....	7
2.4 Uso de los probióticos en acuicultura	9

3. PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	14
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
5. HIPOTESIS.....	16
6. METODOLOGIA.....	17
6.1 Fase de laboratorio.....	17
6.1.1 Cepas Bacterianas.....	17
6.1.2 Animales de experimentación.....	17
6.1.3 Crecimiento bacteriano.....	18
6.1.4 recuento de bacterias.....	19
6.1.5 Ensayos <i>In vivo</i>	20
6.1.5.1 Preparación del alimento.....	20
6.1.5.2 Supervivencia de las cepas probióticas en agua.....	21
6.1.5.3 Evaluación de las cepas probióticas sobre peso y talla de la tilapia nilótica.....	21
6.1.5.4 Efecto de los probióticos en la supervivencia de tilapia nilótica infectada experimentalmente.....	23
6.1.6 Ensayos <i>In vitro</i>	24
6.2 Fase de Gabinete.....	25
6.2.1 Evaluación de los efectos de las bacterias probióticas sobre peso, talla y supervivencia de la tilapia nilótica.....	25
6.2.2 Análisis estadístico.....	26

7. RESULTADOS.....	27
7.1 Supervivencia en agua de las bacterias empleadas como probióticos.....	27
7.2 Experimentos con bacterias nativas de tilapia nilótica.....	28
7.2.1 Evaluación del efecto de bacterias nativas sobre el peso y talla de la tilapia nilótica.....	28
7.2.2 Supervivencia natural de los peces durante el período de alimentación.....	31
7.2.3 Efecto de la alimentación con suplemento de bacterias nativas de tilapia nilótica en la resistencia a infecciones experimentales.....	32
7.3 Experimentos con mezclas de bacterias probióticas.....	34
7.3.1 Evaluación del efecto de mezclas probióticas sobre el peso y talla de la tilapia nilótica.....	34
7.3.2 Supervivencia natural de los peces durante el período de alimentación.....	37
7.3.3 Efecto de la alimentación con suplemento de bacterias nativas de tilapia nilótica en la resistencia a infecciones experimentales.....	38
7.3.4 Evaluación de productos extracelulares de las bacterias empleadas en las mezclas probióticas.....	41
8. DISCUSION DE RESULTADOS.....	44
9 CONCLUSIONES.....	55
10 RECOMENDACIONES.....	57
11 BIBLIOGRAFIA.....	58
12 COMPLEMENTARIOS.....	77

LISTADO DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Patrón de pigmentación corporal de <i>O. niloticus</i> (Modificado de Castillo, 2008).....	6
Tabla 2. Tratamientos para evaluar la incidencia de las bacterias probióticas nativas de <i>O. niloticus</i> en el peso y talla de la tilapia nilótica.....	22
Tabla 3. Tratamientos para evaluar la posible sinergia entre bacterias probióticas en el peso y talla de la tilapia nilótica.....	23
Tabla 4. Diseño experimental de la evaluación de ECPs de bacterias probióticas al ser mezcladas con otras.....	25

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Tilapia nilótica, <i>Oreochromis niloticus</i>	5
Figura 2. Crecimiento en césped de bacterias nativas de tilapia nilótica: a) B16, b) B17, c) IL1.....	19
Figura 3. Secado a 45 °C y Almacenamiento del alimento suplementado con probióticos.....	21
Figura 4. Curvas de supervivencia de las bacterias probióticas en agua a través del tiempo. a) Aislados nativos de tilapia, b) bacterias empleadas en las mezclas probióticas.....	28
Figura 5. a) Incremento en peso, b) incremento en talla de juveniles de <i>O. niloticus</i> . Los datos se presentan en gr y cm ± error estándar.....	29
Figura 6. Tasa de crecimiento específica en juveniles de <i>O. niloticus</i> alimentados con aislados bacterianos nativos. Los datos se presentan en porcentaje / día ± error estándar.....	30

Figura 7. a) Incremento diario de peso individual en *O. niloticus* presentados en gr/día \pm error estándar. **b)** Tasa de conversión alimenticia en tilapia nilótica alimentada con bacterias nativas. Los datos se presentan en gr \pm error estándar.....30,31

Figura 8. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el periodo de alimentación con bacterias nativas. Los datos se presentan en porcentaje.....32

Figura 9. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *S. agalactiae*. Los datos se presentan en porcentaje.....33

Figura 10. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *V. alginolyticus*. Los datos se presentan en porcentaje.....34

Figura 11. a) Incremento en peso, **b)** incremento en talla de juveniles de *O. niloticus* alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en gr y cm \pm error estándar.....35

Figura 12. Tasa de crecimiento específica en juveniles de *O. niloticus* alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje / día \pm error estándar.....36

Figura 13. a) Incremento diario de peso individual en *O. niloticus* presentados en gr/día \pm error estándar. **b)** Tasa de conversión alimenticia en tilapia nilótica alimentada con mezclas probióticas. Los datos se presentan en gr \pm error estándar.....37

Figura 14. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el periodo de alimentación con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje.....38

Figura 15. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *A. hydrophila*. Los datos se presentan en porcentaje.....39

Figura 16. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *S. agalactiae* luego de ser alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje.....40

Figura 17. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *V. alginolyticus* luego de ser alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje.....40

Figura 18. Supervivencia a las 48 h de *B. pumilus* y *Bacillus* sp. frente a sus productos extracelulares. Los datos se presentan en porcentaje.....41

Figura 19. Supervivencia a las 48 h de *L. acidophilus* y *L. casei* frente a sus productos extracelulares. Los datos se presentan en porcentaje.....42

Figura 20. Supervivencia a las 48 h de *L. acidophilus* y *Bacillus* sp. frente a sus productos extracelulares. Los datos se presentan en porcentaje.....43

RESUMEN

En la acuicultura se ha implementado el uso de probióticos como una medida preventiva a las mortalidades causadas por enfermedades de tipo bacteriano gracias a la protección que pueden conferir contra patógenos mediante la estimulación del sistema inmunológico y a propiedades como promotores de crecimiento de los animales cultivados. Este trabajo es un aporte al conocimiento de los probióticos y su implementación en el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) mediante la utilización de tres bacterias nativas aisladas de juveniles de esta especie suministradas individualmente, y de tres mezclas de bacterias probióticas realizadas con *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. Se evaluó su efecto en el crecimiento y supervivencia durante desafíos experimentales con *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* y *Vibrio alginolyticus*. *In vivo* los resultados indican que las tres cepas nativas pueden incrementar el peso de la tilapia y que las mezclas probióticas (*Bacillus pumilus*+*Bacillus* sp), (*Lactobacillus acidophilus*+*L.casei*) y (*L. acidophilus*+*Bacillus* sp) no lo hacen de manera significativa sin causar algún efecto sinérgico. Se evaluó *in vitro* la actividad antibacteriana de los productos extracelulares (ECPs) entre las bacterias probióticas y se encontró que *L. acidophilus* y *L.casei* se inhiben entre sí, y a *Bacillus* sp. cuando son utilizados como mezclas. Ninguna de las bacterias empleadas en el presente estudio aumenta de manera significativa los porcentajes de supervivencia de tilapia nilótica durante los desafíos experimentales.

Palabras clave: Probióticos, *O. niloticus*, bacterias nativas, incremento, supervivencia, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Vibrio*.

ABSTRACT

In aquaculture activity, there has been implemented the probiotics as a preventive measure to mortalities caused by bacterial diseases, due to their capacity of protection against pathogens by the stimulation of the immune system and because of their properties as growth promoters in cultivated animals. This work is a contribution to knowledge of probiotics and their implementation in the cultivation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using three native bacteria isolated from juveniles of this same species that were given individually; and the use of three bacterial mixtures made with *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Growth effect and survival were evaluated during experimental challenges with *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio alginolyticus*. *In vivo* results, show that the three isolated bacteria can increase the weight in Nile tilapia, but the probiotic mixtures (*Bacillus pumilus*+*Bacillus* sp), (*Lactobacillus acidophilus*+*L.casei*) y (*L. acidophilus*+*Bacillus* sp) don't do this in a significant way without causing any synergistic effect. Antibacterial activity of the Extracellular Products (ECPs) was evaluated *In vitro* between probiotic bacteria; this showed that *L. acidophilus* and *L. casei* inhibit each other, and at the same time inhibits *Bacillus* sp. when used as mixtures. None of the bacteria used in this study increases in a significant way the survival percentages of Nile tilapia during the experimental challenge.

Key words: Probiotic, *O. niloticus*, native bacteria, survival increase, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Vibrio*.

1. INTRODUCCION JUSTIFICADA

La acuicultura se ha convertido en la alternativa principal generadora de alimento para consumo humano ante la dramática sobreexplotación de recursos naturales por parte de las pesquerías (FAO, 2006). Desde finales de los 90's este sector alcanzó sus máximos y desde este momento fluctúa alrededor del mismo nivel indicando que cada vez más se acerca a la producción máxima sostenible (APROMAR, 2007), por lo cual nace la esperanza de ubicar a la acuicultura como la principal fuente de alimento además de ser un recurso decisivo para la seguridad alimentaria y la disminución de la pobreza (Kent, 1995; FAO, 2002) que busca día a día expandirse más con el cultivo de gran cantidad de especies ícticas incluso en aguas marinas abiertas (Mann *et al.*, 2007).

Actualmente existen muchos factores limitantes en la acuicultura para una producción totalmente óptima entre los que se incluyen el escaso número de juveniles viables en condiciones de cautiverio, un inadecuado suministro de alimento artificial para cubrir todos los requerimientos nutricionales de los organismos y la reducción de la salud de los mismos asociada a enfermedades (APROMAR, 2007). Es por esto último que desde hace algunos años se ha recurrido a los antibióticos como una alternativa para mitigar las enfermedades infecciosas, pero el uso indiscriminado ha generado en las bacterias resistencia a estas sustancias (Martín y Carmona, 2003; Álvarez *et al.*, 2006) y en los principales países consumidores su aplicación en cultivos ha sido restringida al ser ingeridos exclusivamente por los humanos. Es por esto que se debe recurrir a nuevas estrategias que permitan mitigar al máximo las enfermedades en los cultivos acuícolas, favoreciendo el crecimiento de los organismos y una gran producción.

Los probióticos hoy en día se postulan como la alternativa con mayor éxito para competir con los patógenos bacterianos (Ochoa y Olmos, 2005; Villamil y Novoa, 2009) aunque aún existan muchas dudas sobre su eficacia y seguridad de producción, causadas por la falta de evidencia científica para todas las especies y por la ausencia de un producto comercial realmente efectivo para varias especies de cultivo.

El presente trabajo, busca dar un aporte al conocimiento científico con la aplicación de probióticos para el crecimiento y supervivencia de una especie de gran importancia económica como la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Basados en la existencia de bacterias en los peces las cuales desempeñan roles favorables *per se*, se desea generar nuevas herramientas que permitan combatir las enfermedades bacterianas mediante la aplicación como suplemento alimenticio de probióticos previamente aislados de esta especie, evaluando el efecto en la supervivencia, peso, y talla de los juveniles de tilapia.

Este trabajo se encuentra enmarcado dentro del proyecto búsqueda de nuevos aislados microbianos con actividad antibacteriana, inmunopotenciadora y estimulante de crecimiento para su aplicación en el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) que realiza el grupo de investigaciones en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos, actualmente avalado por la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano y pendiente de ser categorizado por COLCIENCIAS.

2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 ACUICULTURA EN EL MUNDO

La acuicultura tiene 4000 años de historia, pero sólo durante los últimos 50 años se ha convertido en una actividad socioeconómica de importancia, con previsión de alcanzar un 50 % en el aporte de productos pesqueros en el 2025. (FAO, 2004). Estos tipos de cultivos han tenido una gran aceptación y crecimiento a nivel mundial durante los últimos 50 años y su producción sigue incrementando con mayor rapidez que cualquier otro sector productor de alimentos de origen animal puesto que su tasa de aumento en el mundo es del 8,8% anual desde 1970 (FAO, 2006). El éxito se basa principalmente en el control moderno sobre la reproducción de las especies, el control de los factores ambientales del área, el mejor conocimiento de su biología, a las innovaciones tecnológicas y al desarrollo de alimentos específicos (Ramorino, 1974; APROMAR, 2008); al igual que, se ve estimulada por la gran demanda existente de especies ícticas para el consumo humano debido al gran contenido proteínico, y que ha fomentado la producción en países en desarrollo gracias a la gran accesibilidad por parte de los sectores más pobres de la comunidad, que ven en la acuicultura una opción económicamente rentable sobre todo por el bajo costo en la alimentación de las especies ícticas en agua dulce, que consumen poco en la red alimenticia acuática (FAO, 2003).

Según Castillo (2008), en la actualidad la tilapia es el segundo grupo más grande de peces cultivados, lo cual tiene importancia si se considera que contribuye con el 20% del nivel total a nivel mundial, del cual un 80% equivale a *Oreochromis niloticus* (incluido híbridos entre *O. niloticus* y *O. aureus*) seguido por *O. mossambicus* con un aporte del 5%.

2.2 ACUICULTURA EN COLOMBIA

Nuestro país se orienta bajo el mismo sentido de la producción mundial en donde el cultivo de camarón, tilapia, trucha y cachama son los más importantes (FAO, 2006) de los cuales los últimos tres según Covalada *et al.* (2005) han crecido a ritmos de 12%, 6% y 29%, respectivamente.

En la actualidad Colombia ocupa el décimo lugar a nivel mundial con una producción de tilapia de 27.953 Ton (MINCOMEX, 2000) y día a día presenta avances en materia de competitividad en cuanto al mejoramiento de los sistemas de cultivo y los volúmenes de producción al igual que un incremento en la oferta de semilla (Covalada *et al.*, 2005). Para nuestro país es una excelente opción debido a que se obtienen las mayores tasas de crecimiento de esa especie en Sur America (Sierra de La Rosa *et al.*, 2009)

Según la Corporación Colombiana Internacional (2006) en nuestro país el 48% de la producción acuícola continental la representa la tilapia, seguida por el 36% de cachama, el 5% de trucha y el 11% restante corresponde a otras especies. A nivel departamental, el Huila es el mayor productor de tilapia bajo la modalidad de cultivo sobre jaulas flotantes, después se ubican el Meta y Valle del Cauca seguidos por el núcleo del Eje Cafetero, Tolima y Cundinamarca. El gran éxito que presenta la tilapia se debe al incremento en la demanda a nivel-nacional e internacional especialmente de los EEUU en donde este producto es el de mayor consumo y reconocimiento del mercado en los últimos años (Cely y Nina, 2004)

Los sistemas industriales e intensivos aportan un 66% de la producción neta del país mientras que el porcentaje restante lo representan los sistemas de mediana y pequeña escala (Castillo, 2004) desarrollándose cada vez más el cultivo en jaulas

ante la facilidad de cultivar en altas densidades y aprovechar grandes cuerpos de agua como lagunas, represas, ciénagas y reservorios entre otros.

2.3 GENERALIDADES DE LA ESPECIE

La tilapia nilótica (*O. niloticus*) (Figura 1) es un pez teleósteo de agua dulce cálida que es muy interesante para el cultivo en piscifactorías por sus pocas exigencias respiratorias, crecimiento rápido bajo una gran cantidad de esquemas de manejo y fácil alimentación (Cerdá *et al.*, 1998; Ponce, 2005; Oso *et al.*, 2006). Es originario de Africa y del Medio Oriente y se cultiva en diferentes países de América del norte, Centro y Sudamérica, al igual que en el Sudeste Asiático, Australia y algunos países de Europa (Espejo y Torres, 2001). Es un pez de buen sabor que se puede cultivar en sistemas intensivos y semi-intensivos en estanques y jaulas, que soporta altas densidades y resiste condiciones ambientales adversas como bajas concentraciones de oxígeno (Cerdá *et al.*, 1998; Mahecha, 2006).



Figura 1. Tilapia nilótica, *Oreochromis niloticus* (Ardila-Jaime©, 2009).

Esta especie muestra un claro dimorfismo sexual puesto que la hembra presenta tres orificios en el abdomen (el anal, el genital y el urinario) mientras que el macho solo tiene el anal y el genital (Cantor, 2007). Alcanzan su madurez sexual

aproximadamente a los 30-50 gr. Las hembras desovan en repetidas ocasiones (Cuatro a cinco en un año) en condiciones favorables de temperatura y cada puesta puede contener entre 200 y 2000 huevos. Posterior a la fertilización uno o ambos padres vigilan con cuidado los embriones hasta que las larvas alcanzan el estadio de natación (Baltazar, 2007).

Morfológicamente tiene un cuerpo comprimido, con orificios nasales simples. La aleta anal tiene III espinas y de 9 a 10 radios, la aleta pectoral de 14 a 15 radios y su línea lateral de 29 a 32 escamas en una serie longitudinal. Tiene un color Gris atenuado (Tabla 1), a lo largo de la parte dorsal de su cuerpo presenta una serie de rayas negras verticales que en ocasiones se extienden hasta el abdomen de forma difusa y presentan dos bandas horizontales muy tenues superficiales formadas por la expansión de melanóforos que aparecen y desaparecen rápidamente a lo largo del cuerpo (Cantor, 2007).

Tabla 1. Patrón de pigmentación corporal de *O. niloticus* (Modificado de Castillo, 2008)

AREA DE PIGMENTACION	<i>O. niloticus</i>
Cuerpo	Verde metálico Macho maduro: ligeramente gris.
Cabeza	Verde metálico
Color ojos	Cafés
Región Ventral	Gris plateado
Papila Genital	Blanca
Borde Aleta Dorsal	Negra a oscura
Porción Terminal Aleta Caudal	Roja, bandas negras bien definidas y uniformes en forma circular.
Perfil Dorsal	Convexo
Labios	Negros

2.4 ENFERMEDADES EN LOS CULTIVOS DE TILAPIA

Actualmente existen varias enfermedades importantes en la tilapia, algunas descubiertas mucho tiempo atrás y otras registradas recientemente. En general los principales patógenos en Latinoamérica de esta especie son: los hongos como *Saprolegnia* sp., los parásitos entre los que se encuentran *Ichthyophthirius multifiliis* y los géneros *Chilodonella* sp., *Trichodina* sp., *Trichodinella* sp. y *Tripartiella* sp., igualmente de crustáceos e hirudíneos. Además bacterias de los géneros *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., *Flavobacterium* sp. y *Vibrio* sp., y pocos virus como el agente causante de la limfocistosis. Todos están relacionados con la intensificación de los métodos de cultivo y en sistemas de recirculación de agua (Alvarez-Pellitero *et al.*, 1988; Conroy, 2004) y generalmente ocurren por factores estrésantes tales como una mala calidad del agua y cambios bruscos en los parámetros fisicoquímicos de la misma, manejo indebido de los animales y bajas temperaturas entre otros, lo cual genera un déficit en el sistema inmune y pérdida de apetito ocasionando grandes mortalidades a corto tiempo (Espejo y Torres, 2001).

Dentro de las bacterias patógenas Gram positivas son de gran importancia *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus iniae*. Este último es el agente causal de la estreptococosis (Brunt y Austin, 2005), que se caracteriza por la presencia de granulomas que afectan al bazo, el hígado y el riñón con un exudado purulento en el tejido muscular al mismo tiempo que provoca movimientos natatorios desorientados y errados (Conroy, 2004). Morfológicamente son cocos y hacen parte de las bacterias productoras del ácido láctico y aunque la primera cepa se aisló desde los años 70's solo hasta los 80's se identificó la especie considerándola como el agente biológico de la meningoencefalitis aguda que afectaba a tilapias en cultivos de Israel, Taiwán y los Estados Unidos (Eldar y Ghittino, 1999). Esto hace que sea una enfermedad

emergente que pudo haber surgido repentinamente debido a los cambios genéticos de los microorganismos y que desde entonces ha llegado a causar también endoftalmia, exoftalmia y encefalitis en los peces conduciendo a grandes mortalidades alrededor de un 30 y 50% de la población por lo cual es considerada como un serio problema en el aspecto económico y de salud pública puesto que también se ha reportado que infecta al hombre (Ferguson *et al.*, 1994; Romano y Mejia, 2003).

Las principales bacterias Gram negativas con mayor ocurrencia en la tilapia son: *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnaris*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.* y *Vibrio sp.* las cuales hacen parte de la microbiota intestinal de *O. niloticus* y que causan problemas sanitarios en el hombre y en este tipo de cultivo (Alvarez *et al.*, 2006). Por lo tanto son consideradas patógenos oportunistas que en condiciones desfavorables para el pez pueden causar epizootias (Vasquez *et al.*, 2001).

Pieters *et al.* (2008) menciona que *Aeromonas bestiarium* genera necrosis en las aletas de los peces, hemorragias y úlceras cutáneas y su frecuencia en los cultivos es cada vez mayor sin poderse determinar a tiempo, aunque aún no se sabe con certeza las pérdidas económicas que esta enfermedad produce.

Por otro lado, *A. hydrophila*, es un cocobacilo motil anaerobio facultativo que ha sido muy estudiado ya que se reporta como un patógeno importante para el hombre y vertebrados inferiores como los peces, reptiles y anfibios (Janda y Abbott, 1998) siendo el responsable de la septicemia hemorrágica. Se presenta frecuentemente en cultivos intensivos, en aguas con sobrecarga de materia orgánica y en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno disuelto, infectando a los peces por ingestión ocasionando gran mortalidad y produciendo pérdidas hasta de un 100% (Fuentes-Rodríguez y Pérez-Hernandez, 1998;

Rodríguez *et al.*, 2005). Esta septicemia no es notoria en su fase temprana, sin embargo se caracteriza por una ulceración dérmica y necrosis en los tejidos del pez, acompañada de hemorragias en las branquias y alrededor del ano a raíz de la acción de toxinas extracelulares como hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas y proteasas (Rodríguez *et al.*, 2008; Vasquez *et al.*, 2001).

2.5 USO DE LOS PROBIOTICOS EN ACUICULTURA

El incremento de la productividad en la acuicultura ha traído consigo impactos ecológicos importantes, entre ellos la resistencia de bacterias patógenas por el uso descontrolado de antibióticos ante la infección en los cultivos acuícolas. Esto ha causado una diseminación de genes resistentes en dichas bacterias en un gran número de casos (Alvarez *et al.*, 2006). Desde los años 50's, se reportaron los primeros casos de cepas multiresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., y *Shigella* sp. (Martín y Carmona, 2003). Esta es una de las razones por las cuales la utilización de probióticos ha surgido como una alternativa válida para competir con los patógenos bacterianos por nutrientes o inhibir su crecimiento y de este modo disminuir las enfermedades infecciosas en los diferentes cultivos, aunque el modo de acción no esté completamente claro se sabe que existe una fuerte sinergia entre las bacteriocinas de algunas bacterias como las del ácido láctico (LAB) y péptidos eucarióticos antimicrobiales (AMP) de origen piscícola, las cuales actúan a nivel membranaral inhibiendo a bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas para los organismos (Lüders *et al.*, 2002).

El término probiótico se ha utilizado a manera general para definir a aquellos microorganismos que promueven la salud de los organismos. Los primeros que dieron una definición aproximada fueron Lilley y Stillwell (1965 En: Balcázar *et al.*,

2006a) describiéndolos como sustancias secretadas por los microorganismos las cuales estimulaban el crecimiento de otros organismos. Hoy en día pueden ser definidos como preparaciones de células microbianas vivas las cuales confieren un efecto benéfico en la salud y crecimiento del hospedero (Panigrahi *et al.*, 2005; Gatesoupe, 2008).

Los probióticos se han utilizado ampliamente en la medicina humana como gran ayuda para tratamientos principalmente *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. en enfermedades inflamatorias intestinales, en casos de trasplantes hepáticos, pancreatitis, para la prevención de diarreas ocasionadas por rotavirus en los niños y el uso de antibióticos entre otros, además de ser potenciales muy grandes para la elaboración de futuras vacunas que induzcan una respuesta humoral protectora contra enfermedades (Castro y de Rovetto, 2006; Olveria y González-Molero, 2007).

Aunque aún no se conocen todos los efectos de los probióticos como complemento en la dieta de los peces, ni siquiera de las más usadas que son las LAB (Gatesoupe, 2008), en la acuicultura parecen tener un potencial enorme pero su desarrollo como suplemento alimenticio es una tarea aún inconclusa ya que requiere de una amplia investigación y el desarrollo de herramientas apropiadas para un buen control en su producción teniendo en cuenta diferentes factores como los señala Mercenier *et al.* (2008) entre los que se encuentran la acción y mediación de los posibles efectos, los beneficios en cuanto a salud, las diferentes especies hospederas y su posible impacto en ellas.

Se hace necesario entonces establecer un protocolo adecuado para la realización de las diferentes técnicas que se deben utilizar en el proceso de selección de un probiótico (Vine, 2004a), el cual se pueda comercializar para beneficio de la acuicultura. Varios autores como Balcázar (2002) y Mercenier *et al.* (2008)

recomiendan que una investigación *in vitro* es muy pertinente para evaluar su posible uso en los sistemas acuícolas de acuerdo a las características de antagonismo que presenten contra diferentes patógenos (Brizuela *et al.*, 2001; Sotomayor y Balcázar, 2003; Villamil *et al.*, 2003b Vine *et al.*, 2004b) como lo son *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. entre muchos otros, y en lo posible evaluar la capacidad de adhesión al mucus intestinal como lo han realizado en varios estudios Villamil *et al.* (2002; 2003a;) para implementarlo posteriormente *in vivo* a pequeña escala con especies patógenas y que a partir de buenos resultados se pueda experimentar en escala piloto, al esperarse efectos favorables para poder implementar el desarrollo de los probióticos como control biológico en la acuicultura.

Hay una gran cantidad de bacterias documentadas como probióticas. Una cepa del género *Carnobacterium* sp. se aisló del intestino del salmón atlántico *Salmo salar* y la trucha arcoíris *Onchorhynchus mykiss* (Robertson *et al.*, 2000) lo cual generó buenos resultados contra *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp. en los experimentos, pero no ha generado ninguna ventaja en la carpa común *Cyprinus carpio* (Mazurkiewicz *et al.*, 2007). En la trucha arcoíris *Lactococcus* sp y *Streptococcus* sp son agentes patógenos frecuentes en esta especie (Eldar y Ghittino, 1999); se han realizado varios estudios relacionados con probióticos como *Aeromonas sobria* y *Bacillus* sp. obteniéndose resultados favorables en el crecimiento y la respuesta inmune de estos peces e incluso buenos efectos cuando son sometidos a patógenos como *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* y *Yersinia ruckeri* (Brunt y Austin, 2005; Brunt *et al.*, 2007).

Las bacterias del ácido láctico han sido muy estudiadas para la mayoría de cultivos, específicamente *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp. (Brizuela *et al.*, 2001; Villamil *et al.*, 2002; Buntin *et al.*, 2008; Frouël *et al.*, 2008) gracias a que son

microorganismos fáciles de cultivar con altas tasas de crecimiento, además que son una importante fuente de carbono y nitrógeno de muy bajo costo ideales para el mejoramiento de la calidad del agua a través de una rápida degradación de la materia orgánica en descomposición, y generan una elevada cantidad de metabolitos secundarios tales como antibióticos, proteasas, lipasas y carbohidrasas (Moriarty, 1999).

Los efectos de los probióticos se atribuyen a varios mecanismos los cuales están bien documentados (Irianto y Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006a; Vine *et al.*, 2006; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008) y principalmente se basan en la mejora de la calidad del agua eliminando directamente la materia orgánica disuelta, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias, mejorando la salud, el sistema inmune del hospedero y aumentando la digestión del alimento relacionada con la disponibilidad adecuada de nutrientes especiales y enzimas esenciales lo cual se ve reflejado en un aumento en la producción del cultivo.

Se han llevado a cabo estudios los cuales evalúan la capacidad de fijación en la mucosa intestinal del hospedero lo cual es muy importante ya que de esto depende el asentamiento de las bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal y su efectividad de exclusión de agentes patógenos en el hospedero (Vine *et al.*, 2004c), pero la mayoría de estudios se han enfocado en la competencia de los probióticos contra bacterias patógenas con el fin de considerarse como un camino viable contra las enfermedades bacterianas en los cultivos (Moriarty, 1999), a través de la evaluación del efecto antibacterial de los productos extracelulares de los probióticos frente a patógenos específicos, y en la actuación de dichas bacterias sobre la respuesta inmune innata, específica y no específica de muchas especies cultivadas (Villamil *et al.*, 2002, Brunt y Austin, 2005; Arijo *et al.*, 2008; Balcázar *et al.*, 2007a, 2007b; Rodríguez *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008a).

En la tilapia nilótica (*O. niloticus*) los estudios se han enfocado principalmente en el análisis de la microbiota intestinal (Escobar-Briones *et al.*, 2006; Mesalhy *et al.*, 2008a) y el efecto de los distintos probióticos con sus productos extracelulares en el crecimiento de la especie (Lara-flores *et al.*, 2002; Günter y Jiménez-Montealegre, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005; Khattab, 2006) además de la evaluación de la respuesta inmune ante diferentes infecciones experimentales (Pirarat *et al.*, 2006; Mesalhy *et al.*, 2008b, 2008c; Wang *et al.*, 2008a).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACION

Establecer el efecto que tienen aislados bacterianos nativos de tilapia nilótica (*O. niloticus*) utilizados como suplemento probiótico en la dieta de este pez y su influencia en el peso, la talla y la protección contra bacterias patógenas, al igual que evaluar *in vivo* la posible sinergia de acción entre mezclas probióticas de distintas especies de *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp. añadidas al alimento.

Este trabajo se realizará en el laboratorio de Acuicultura de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, sede Santa Marta.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer si los aislados bacterianos nativos de tilapia nilótica (*O. niloticus*), previamente seleccionados favorecen el incremento en talla y peso del pez, cuando son suplementados en el alimento con respecto a individuos alimentados con concentrado comercial.
- Determinar si los diferentes aislados de tilapia nilótica (*O. niloticus*) previamente seleccionados como probióticos incrementan el porcentaje de supervivencia, cuando son suministrados como suplemento en el alimento durante infecciones experimentales con bacterias patógenas.
- Evaluar si existe un efecto sinérgico entre *Bacillus* sp. y *Lactobacillus acidophilus* suplementados en la dieta de *O. niloticus* en pro del crecimiento y supervivencia de tilapia nilótica con respecto a individuos alimentados solamente con pienso comercial.
- Calcular la tasa del incremento diario de peso individual (IPDE), la tasa de crecimiento específica (TCE) y el factor de conversión alimenticia (FCA) de la tilapia nilótica (*O. niloticus*) alimentada con dieta comercial suplementada con bacterias probióticas nativas de tilapia y con mezclas probióticas.

5. HIPOTESIS

Existe un aumento significativo de peso y talla en el grupo de peces de *O. niloticus* a los que se les suministra alimento suplementado con bacterias probióticas previamente aisladas de esta especie con respecto al grupo control, alimentado con concentrado comercial.

Los tratamientos con bacterias probióticas aisladas de *O. niloticus* y suplementadas en el alimento incrementan el porcentaje de supervivencia durante una infección experimental con bacterias patógenas con respecto al grupo control alimentado con concentrado comercial.

Se evidencia *in vivo* una acción sinérgica en cuanto aumento de peso, talla, o incremento de supervivencia entre una mezcla de *Bacillus* sp. y *Lactobacillus acidophilus* o entre mezclas de dos especies del género *Bacillus* sp. o *Lactobacillus* sp. adicionadas en el alimento para *O. niloticus* con respecto al grupo control alimentado con pienso comercial.

6. METODOLOGÍA

6.1 Fase de Laboratorio

6.1.1 Cepas bacterianas

Paralelamente como parte de otro trabajo de grado investigativo dentro del mismo proyecto, se llevó a cabo un aislamiento de bacterias en individuos de tilapia nilótica (*O. niloticus*), especialmente de las branquias y del tracto gastrointestinal y fueron evaluadas sus propiedades antimicrobianas *in vitro* para su utilización como probióticos. Las tres cepas con mejores resultados fueron seleccionadas (B16, B17 e IL1). Su nomenclatura procede de los órganos de los cuales fueron extraídas y a un número consecutivo.

Las cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* fueron donadas por el laboratorio de Biología Molecular Universidad Jorge Tadeo Lozano y las cepas de *Bacillus pumilus* (CCBM13) y *Bacillus* sp. (CCBM67) donadas por el museo de historia natural marina del INVEMAR

Las cepas de las bacterias patógenas *Aeromonas hydrophilia* y *Streptococcus agalactiae* fueron donadas amablemente por el laboratorio de patología veterinaria de la Universidad Nacional de Bogotá y la cepa de *Vibrio alginolyticus* fue aislada de episodios de enfermedad y mortalidades de peces de cultivo.

6.1.2 Animales de experimentación

Se utilizaron individuos juveniles de tilapia nilótica (*O. niloticus*) sanos sin haber sido expuestos a patógenos ni una vacunación previa, los cuales fueron adquiridos

en el SENA Agropecuario de Gaira (Santa Marta). Los animales se aclimataron en acuarios circulares con oxígeno constante, a una temperatura aproximada de 28°C y alimentados con pienso comercial. Posteriormente los individuos se distribuyeron al azar en acuarios plásticos de 20 litros con una densidad aproximada de 30 individuos por tratamiento. Los peces tuvieron un flujo de agua estático con recambio diario de agua del 25% previamente declorinada, una temperatura de 28°C con aireación continua, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. El acuario se limpió constantemente para evitar la acumulación de desechos orgánicos originarios de las heces de los peces y residuos de alimento (Saavedra, 2006; Cantor, 2007).

Los peces se alimentaron tres veces al día (mañana, tarde y noche) durante dos semanas con concentrado comercial con 24% de proteína para el tratamiento control y con el mismo concentrado suplementado con bacterias probióticas seleccionadas (1×10^6 UFC/g) en raciones que sumaban el 10% de su peso corporal (Balcázar *et al.*, 2007a). Se tomaron medidas de peso y talla en los días 1 y 15 del experimento.

6.1.3 Crecimiento bacteriano

Las cepas B16, B17, *B. pumillus* y *Bacillus* sp. fueron cultivadas en medio Triptosa Soya Agar (TSA) de 24 a 48 horas a 22 °C (Figura 2). El medio se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando una plancha magnética con agitación marca Velp Científica modelo APE a 300 °C

Las cepas IL1, *L. acidophilus* y *L. casei* se cultivaron en medio de cultivo DeMan, Rogosa, y Sharpe (MRS). Se incubaron de 24 a 48 horas a 36 °C en el incubador con agitación (Thermostatic Shaker CNW, PSI-320). El medio se preparó siguiendo las indicaciones del proveedor.

En el caso de las bacterias patógenas empleadas en el presente estudio se utilizó el medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) para el crecimiento de *A. hydrophila* y *S. agalactiae*, y Agar Marino para *V. alginolyticus*. Todas las bacterias se incubaron por 48 horas a 22 °C.

Las bacterias patógenas se seleccionaron teniendo en cuenta que causan mortalidad en los cultivos de tilapia y otros peces según diferentes estudios (Cruz e Silva *et al.*, 1997; Bromage, 1999; Eldar y Ghittino, 1999; Conroy, 2004; Brunt y Austin, 2005; Balcázar *et al.*, 2007a; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007; Ospina, 2003).

Para tiempos prolongados de preservación de todas las bacterias empleadas se congelaron a -20 °C en el medio correspondiente para cada una adicionando un 15% de glicerol para su posterior uso.

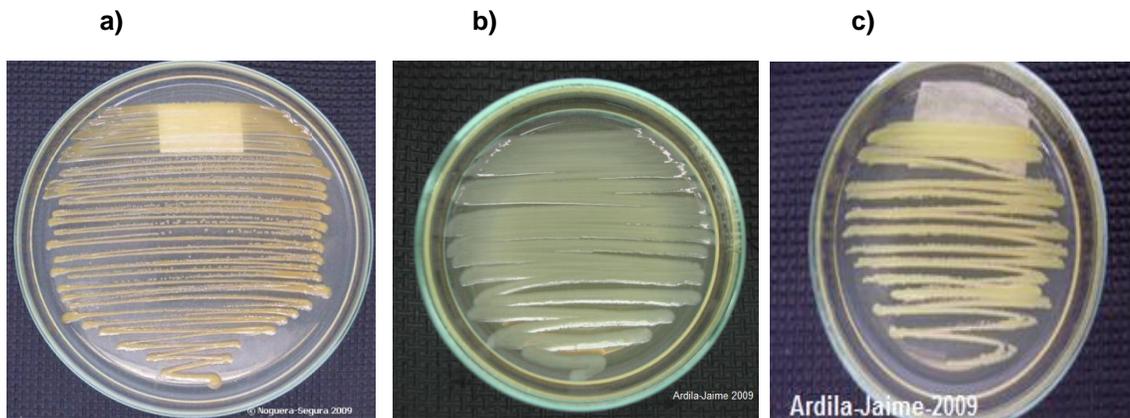


Figura 2. Crecimiento en césped de bacterias nativas de tilapia nilótica **a)** B16, **b)** B17, **c)** IL1.

6.1.4 Recuento de bacterias

El conteo de bacterias se realizó haciendo un recuento en la cámara de Thoma en un microscopio óptico marca Nikon Eclipse modelo E2000. El número de bacterias se determinó empleando la fórmula dada por el fabricante:

Número de células * Dilución * 50.000 (Factor de la cámara)

Las diluciones seriadas necesarias se realizaron en PBS 10% dependiendo de las concentraciones requeridas.

El número de bacterias se confirmó por medio de la siembra en placa de las diluciones seriadas y posteriormente se verificó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) siguiendo los métodos estándar.

6.1.5 Ensayos *In vivo*

6.1.5.1 Preparación del alimento

Las bacterias B16, B17, *B. pumilus* y *Bacillus* sp. se sembraron de forma masiva en incubadas a 22°C por un período de 24 a 48 h. Posteriormente se tomó un inóculo de cada bacteria y se suministró a 10 g alimento comercial con 24% de proteína según la metodología empleada en estudios anteriores del mismo tipo (Ospina 2009). En el caso de los tratamientos suplementados con bacterias nativas de tilapia el alimento fue preparado por separado en una concentración bacteriana de 1×10^6 UFC/ml, y para los experimentos con mezclas probióticas se adicionaron dos cepas de distintas especies para cada tratamiento en una concentración de 5×10^5 UFC/ml para un total de 1×10^6 UFC/ml la cual es la adecuada según varios estudios (Villamil *et al.*, 2003a; 2003b; Balcázar *et al.*, 2007b; Wang *et al.*, 2008a). Posteriormente el alimento se secó en el horno a 45°C con el fin de evitar humedad (Mesalhy *et al.*, 2008c) (Figura 3), y se conservó en frascos plásticos por un período no más de cuatro días para evitar el crecimiento de hongos.



Figura 3. Secado a 45 °C y Almacenamiento del alimento suplementado con probióticos.

6.1.5.2 Sobrevivencia de las cepas probióticas en agua

Se preparó una solución bacteriana de cada bacteria utilizada como suplemento en el alimento y se depositó por individual en 100 ml de agua destilada con el propósito de evaluar la viabilidad de las bacterias en el medio acuático. Se tomó 100 μ L de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas por separado para el posterior recuento en placa con el cual se determinó el número de días de duración de las bacterias probióticas en este medio.

6.1.5.3 Evaluación de las cepas probióticas sobre peso y talla de la tilapia nilótica

En los experimentos con bacterias nativas de tilapia nilótica se llevaron a cabo cuatro tratamientos aproximadamente con 30 individuos de *O. niloticus* y dos

réplicas para cada tratamiento en tiempo distinto. Se utilizaron las individualmente las tres cepas (B16, B17 e IL1) (Tabla 2).

En los experimentos con probióticos (*B. pumilus*, *Bacillus sp*, *L. acidophilus* y *L.casei*) se utilizaron tres tratamientos exactamente con 30 individuos de tilapia nilótica con tres réplicas por cada tratamiento en tiempo distinto. Se utilizaron Mezclas de la siguiente manera: La primera mezcla con *B. pumilus* y *Bacillus sp* (M1); la segunda con *L. acidophilus* y *L.casei* (M2), y la tercera con *Bacillus sp* y *L. acidophilus* (M3) (Tabla 3) bajo el criterio de continuar con estudios antecesores a este (Ospina 2009; Martínez *et al.*, 2008) dentro de los cuales se obtuvieron resultados favorables en cuanto a crecimiento y supervivencia en *O. niloticus* al ser suministradas individualmente en esta especie.

Tabla 2. Tratamientos para evaluar la incidencia de las bacterias probióticas nativas de *O. niloticus* en el peso y talla de la tilapia nilótica.

	TRATAMIENTOS			
Experimento	Control	1	2	3
<i>Bacterias nativas de tilapia</i>	Concentrado	Concentrado + cepa B16	Concentrado + Cepa B17	Concentrado + cepa IL1

Los peces se distribuyeron al azar en acuarios plásticos de 20 L de agua, a 28 °C, en flujo estático de agua, con aireación continúa y un recambio diario del 25% con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Los individuos en todos los tratamientos se alimentaron tres veces al día con un 10% de biomasa durante las dos primeras semanas. Se tomaron medidas de peso y talla el día 1 y 15 de los experimentos.

Tabla 3. Tratamientos para evaluar la posible sinergia entre bacterias probióticas en el peso y talla de la tilapia nilótica.

TRATAMIENTOS			
Control	M1	M2	M3
Concentrado	Concentrado + (<i>B. pumilus</i> y <i>Bacillus</i> sp.)	Concentrado+ (<i>L.acidophilus</i> y <i>L. casei</i>)	Concentrado + (<i>Bacillus</i> sp. y <i>L. acidophilus</i>)

El cálculo de la ración diaria de alimento se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$P \times B \times N:$$

B = Porcentaje de biomasa (10%)

P = Peso promedio del animal en Gramos

N = Número de peces en el estanque

6.1.5.4 Efecto de los probióticos en la supervivencia de tilapia nilótica infectada experimentalmente

Después de las dos semanas de alimentación con suplementos probióticos los peces se infectaron experimentalmente con bacterias patógenas en una concentración de 1×10^6 UFC/ml (Buntin *et al.*, 2008; Martínez-Silva *et al.*, 2008), mediante inyección intraperitoneal de 50 μ l (Mesalhy *et al.*, 2008c). Para el diseño experimental en el caso de los experimentos con bacterias nativas de tilapia, cada uno de los tratamientos utilizados en la alimentación se dividieron equitativamente

en dos acuarios, infectándose uno con *S. agalactiae* y otro con *Vibrio alginolyticus*. El tiempo de estas infecciones fue de 15 a 30 días.

En el caso de los experimentos con mezclas probióticas los tratamientos utilizados en el periodo de alimentación también se dividieron equitativamente en dos y se infectaron experimentalmente, uno con *A. hydrophila* y otro con *S. agalactiae*. Adicionalmente también se realizó un experimento con *V. alginolyticus*. El tiempo duración de estas infecciones fue de 15 a 30 días.

6.1.6 Ensayos *In vitro*

Se llevó a cabo una evaluación de productos extracelulares (ECPs) de las bacterias empleadas como mezclas probióticas en el alimento con el fin de evidenciar la posible actividad antibacteriana entre ellas mismas siguiendo la metodología planteada por Villamil *et al.* (2003b). Las cepas de *Lactobacillus* sp. se crecieron en caldos MRS durante 24 horas a 36 °C y las cepas de *Bacillus* sp. por 24 horas a 22 °C. Se tomaron las bacterias ya crecidas y se centrifugaron quedando un sobrenadante que contiene los ECPs el cual según el tratamiento se mezcló en una placa de 96 pocillos con una bacteria probiótica en una concentración de 1×10^6 en una proporción 1:1, es decir 50 µl de cada uno (Tabla 4). La placa se ubicó en el lector de placa marca Modulus Microplate en el cual se obtuvieron lecturas de absorbancia, con el fin de observar las curvas de crecimiento. Cada prueba se realizó por triplicado y se tomaron como control los tratamientos sin ECPs.

Tabla 4. Diseño experimental de la evaluación de ECPs de bacterias probióticas al ser mezcladas con otras.

Mezcla	Tratamientos		
	Controles	A	B
M1	<i>B. pumilus</i> + TSB <i>Bacillus</i> sp. + TSB	<i>B. pumilus</i> + ECPs <i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. + ECPs <i>B. pumilus</i>
M2	<i>L. acidophilus</i> + MRS <i>L. casei</i> + MRS	<i>L. acidophilus</i> + ECPs <i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> + ECPs <i>L. acidophilus</i>
M3	<i>Bacillus</i> sp.+ TSB <i>Bacillus</i> sp.+ MRS	<i>Bacillus</i> sp. + ECPs <i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> + ECPs <i>Bacillus</i> sp.

6.2 Fase de Gabinete

6.2.1 Evaluación de los efectos de las bacterias probióticas sobre peso, talla y supervivencia de la tilapia nilótica.

Con cada tratamiento se obtuvieron datos iniciales y finales tales como el número de individuos, el peso y la talla de cada animal. Se realizaron cálculos del incremento en peso (gramos) y talla (centímetros), incremento Diario de Peso Individual (IPDE), Tasa de Conversión Alimentaria (TCA), Tasa de Crecimiento Específico (TEC) (Lara-Flores *et al.*, 2002; Guevara *et al.*, 2003; Günter y Jimenez-Montealegre, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Khattab *et al.*, 2006; Mesalhy *et al.*, 2008c; Wang *et al.*, 2008a) y sobrevivencia utilizando el programa Microsoft Excel.

Incremento diario de peso individual (IPDE)

$$\text{IPDE (g/día)} = \frac{W_f - W_i}{t}$$

Tasa de Conversión Alimentaria

$$\text{TCA (gr)} = \text{Alimento suministrado} / \text{Incremento total de peso}$$

Tasa de Crecimiento específica (TEC)

$$\text{TCE (\%/día)} = (\text{Log}_e W_f - \text{Log}_e W_i) / t * 100$$

Sobrevivencia:

$$\text{Sobrevivencia} = (\text{Número de peces final} / \text{Número de peces inicial}) * 100$$

Donde: W_i = Peso promedio inicial

W_f = Peso promedio final

T = número de días del tratamiento

6.2.2 Análisis estadístico

Para todos los experimentos mencionados anteriormente se realizó un análisis exploratorio de los datos, involucrando medidas de tendencia central (media) y medidas de variabilidad de tipo inferencial (error estándar) (Cumming *et al.*, 2007).

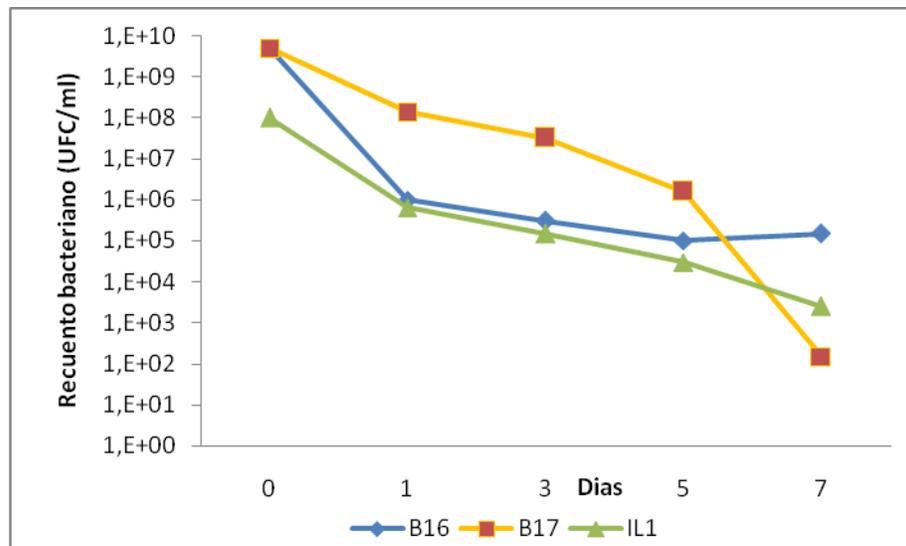
Se ejecutaron las pruebas con el programa Statgraphics Centurion XV. Se realizaron pruebas de normalidad por medio de la prueba estadística de Shapiro-wilks en los experimentos de alimentación y actividad antibacteriana. Al encontrar que no seguía una distribución normal se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En el caso donde existieron diferencias estadísticamente significativas se aplicó el test de Dunn no paramétrico con el programa Biostat para saber que tratamientos eran diferentes. En el experimento de supervivencia los datos se trataron como categóricos y se realizaron tablas de contingencia.

7. RESULTADOS

7.1 Supervivencia en agua de las bacterias empleadas como probióticos

La concentración de bacterias inoculadas en agua destilada disminuyó con el paso del tiempo en todos los tratamientos (Figura 4), siendo para el día cero de 5×10^9 UFC/ml para B16 y B17, y de 1×10^8 UFC/ml para IL1 en el caso de las bacterias nativas de tilapia y en el día siete de $1,5 \times 10^5$ UFC/ml, $1,5 \times 10^2$ UFC/ml y $2,5 \times 10^3$ UFC/ml respectivamente. La concentración de las bacterias empleadas para las mezclas probióticas disminuyeron en mayor tiempo que las nativas de tilapia. Los *Lactobacillus* registraron los valores más bajos, siendo para el día cero de $1,8 \times 10^7$ UFC/ml, $2,1 \times 10^7$ UFC/ml, $1,5 \times 10^7$ UFC/ml y de $2,0 \times 10^7$ UFC/ml para *B. pumilus*, *Bacillus* sp., *L.acidophilus* y *L.casei* respectivamente y aún en el día 13 se registraron concentraciones de $1,5 \times 10^5$ UFC/ml, $4,0 \times 10^7$ UFC/ml, $2,0 \times 10^7$ UFC/ml y $4, \times 10^3$ UFC/ml respectivamente.

a)



b)

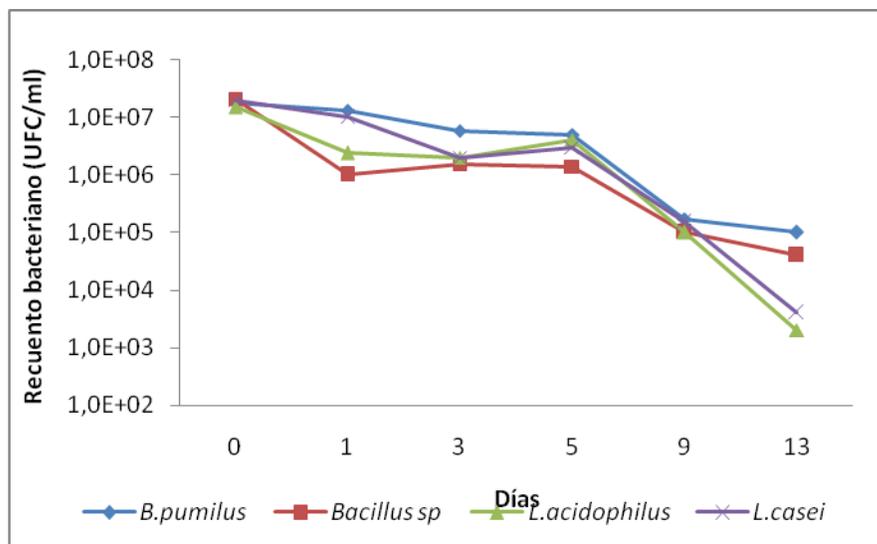


Figura 4. Curvas de supervivencia de las bacterias probióticas en agua a través del tiempo. **a)** Aislados nativos de tilapia, **b)** bacterias empleadas en las mezclas probióticas

7.2 Experimentos con bacterias nativas de tilapia nilótica

7.2.1 Evaluación del efecto de bacterias nativas sobre el peso y talla de tilapia nilótica.

Los peces tratados con alimento suplementado con bacterias nativas de tilapia tuvieron un mayor incremento en peso y talla con respecto al grupo control. Los peces tratados con alimento suplementado con el aislado B17 presentó el incremento más alto en peso y talla ($0,75 \pm 0,025$ gr. y $1,11 \pm 0,006$ cm) durante las dos semanas de alimentación (Figura 5) al igual que el mayor valor de TCE ($2,15 \text{ \%/día} \pm 0,059$) (Figura 6).

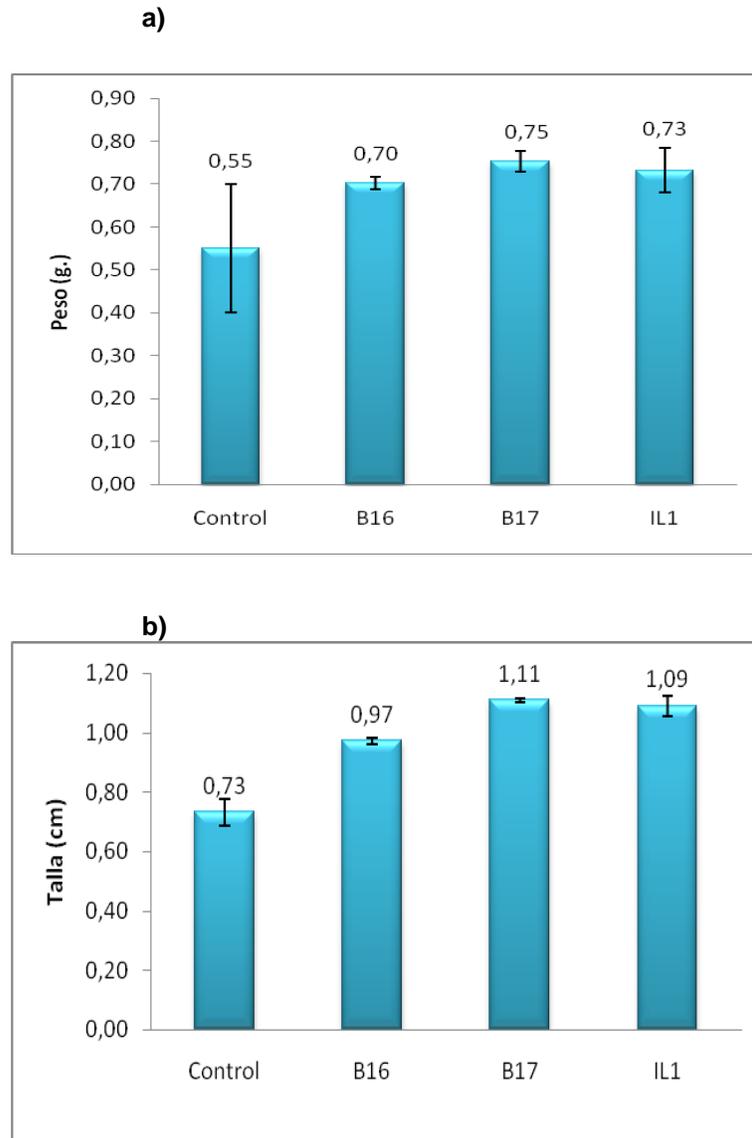


Figura 5. a) Incremento en peso, **b)** incremento en talla de juveniles de *O. niloticus*. Los datos se presentan en g y cm \pm error estándar.

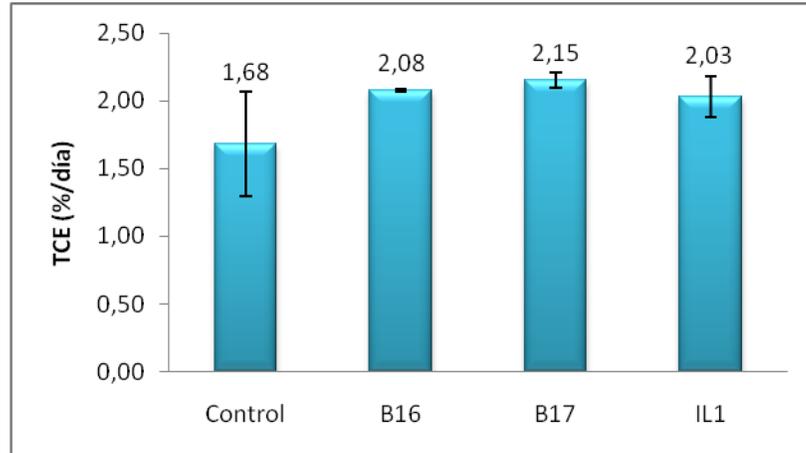
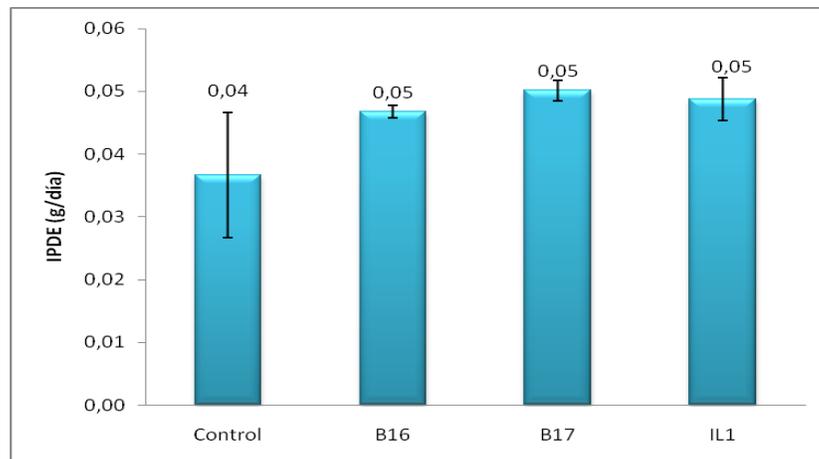


Figura 6. Tasa de crecimiento específica en juveniles de *O. niloticus* alimentados con aislados bacterianos nativos. Los datos se presentan en porcentaje / día \pm error estándar

El incremento diario de peso individual (IPDE) fue similar en los tratamientos con bacterias nativas B16, B17 e IL1 ($0,05 \text{ gr / día} \pm 0,001$; $0,05 \pm 0,002$ y $0,05 \pm 0,003$ respectivamente) y muy parecido con respecto al grupo control ($0,04 \text{ gr / día} \pm 0,003$). En cuanto al aprovechamiento del alimento los tratamientos con bacterias nativas presentaron menores valores de TCA con respecto al grupo control siendo B17 el valor más bajo ($2,11 \text{ gr} \pm 0,067$) (Figura 7).

a)



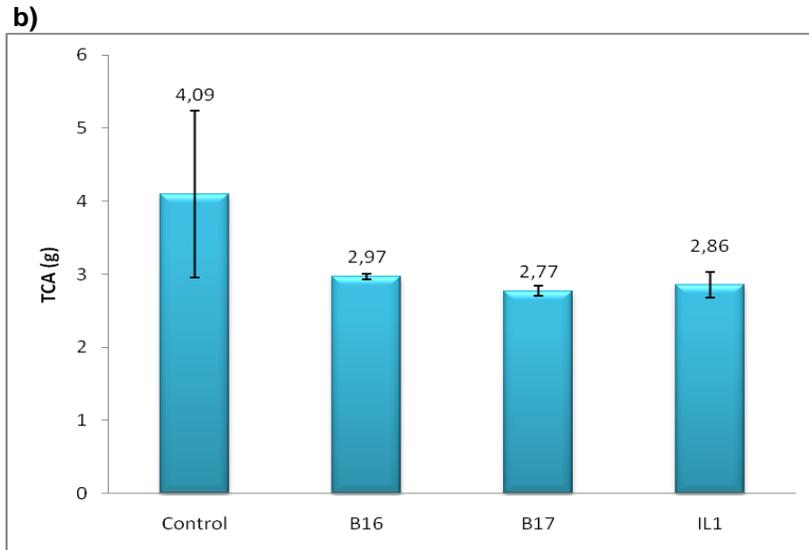


Figura 7. a) Incremento diario de peso individual en *O. niloticus* Datos presentados en gr/día \pm error estándar. **b)** Tasa de conversión alimenticia en tilapia nilótica alimentada con bacterias nativas. Los datos se presentan en gr \pm error estándar.

7.2.2 Supervivencia natural de los peces durante el período de alimentación.

Los peces suplementados con bacterias nativas B16 y B17 presentaron una mayor supervivencia natural que aquellos alimentados únicamente con pienso comercial sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) (Figura 8). El tratamiento suplementado con la bacteria B16 presentó la mayor supervivencia (100 % \pm 0,000) seguido por B17 (98 % \pm 1,666). La supervivencia en el tratamiento suplementado con IL1 (95 % \pm 1,666) fue menor que en el grupo control.

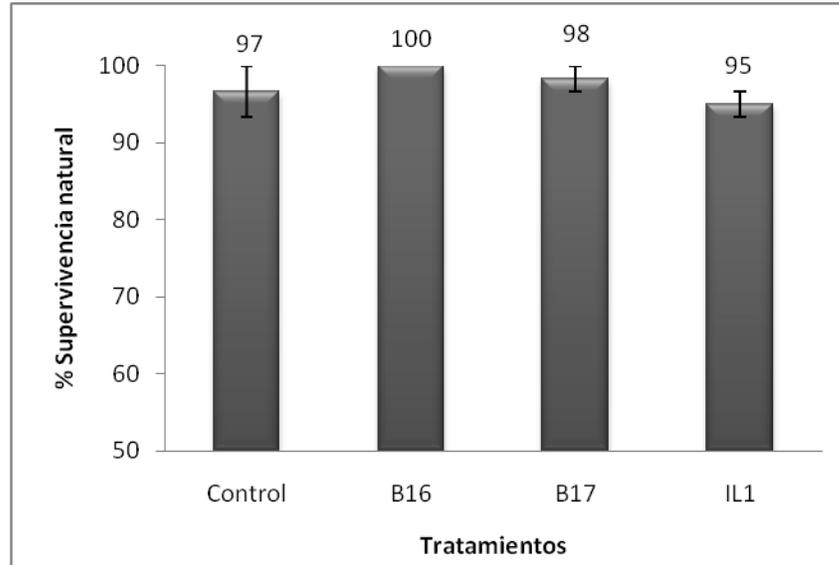


Figura 8. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el periodo de alimentación con bacterias nativas. Los datos se presentan en porcentaje.

7.2.3 Efecto de la alimentación con suplemento de bacterias nativas de tilapia nilótica en la resistencia a infecciones experimentales.

Posterior a la infección experimental por inyección intraperitoneal de 100 μ l con *S. agalactiae* y *V. alginolyticus* en una concentración de 1×10^6 UFC/ml. los peces alimentados con bacterias nativas de tilapia presentaron una supervivencia mayor frente a *S. agalactiae* con respecto al grupo control (Figura 9) aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Los mayores resultados los presentaron los tratamientos suplementados con B16 y B17 ($63 \% \pm 3,921$ y $63 \% \pm 3,333$).

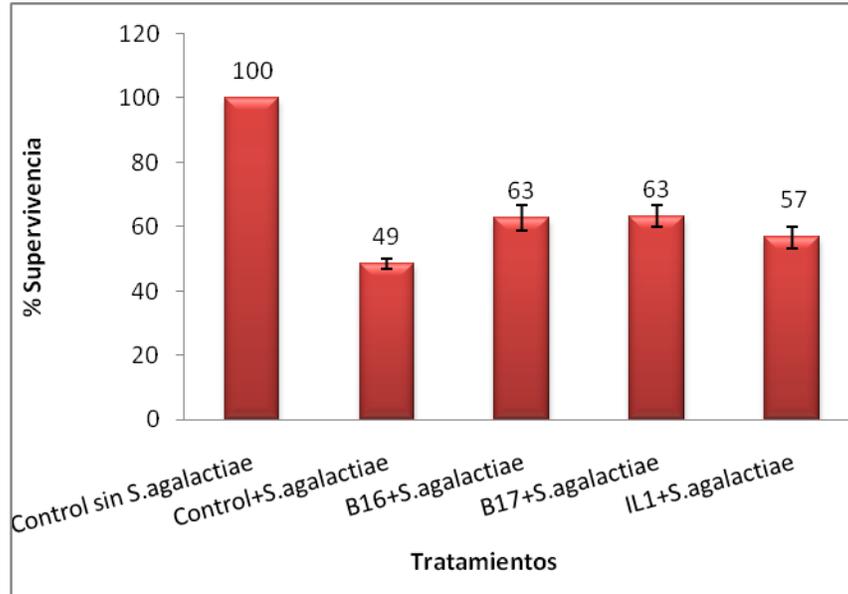


Figura 9. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *S. agalactiae*. Los datos se presentan en porcentaje +/- error estándar. No existen diferencias estadísticamente significativas.

Con respecto a la infección con *V. alginolyticus* se encontró que el tratamiento con el aislado B17 obtuvo una mayor supervivencia con respecto al grupo control aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Los otros dos tratamientos (B16 e IL1) presentaron una supervivencia más baja con respecto al control (Figura 10).

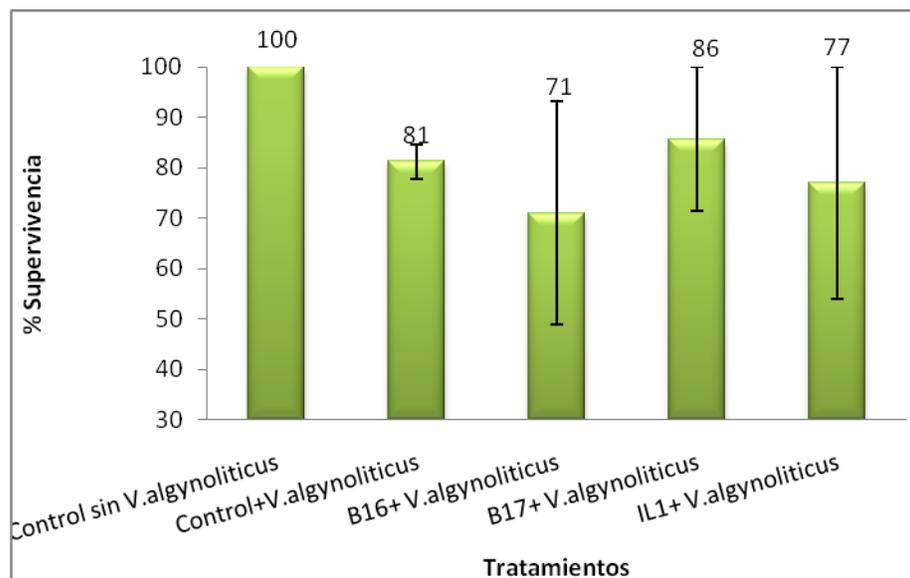


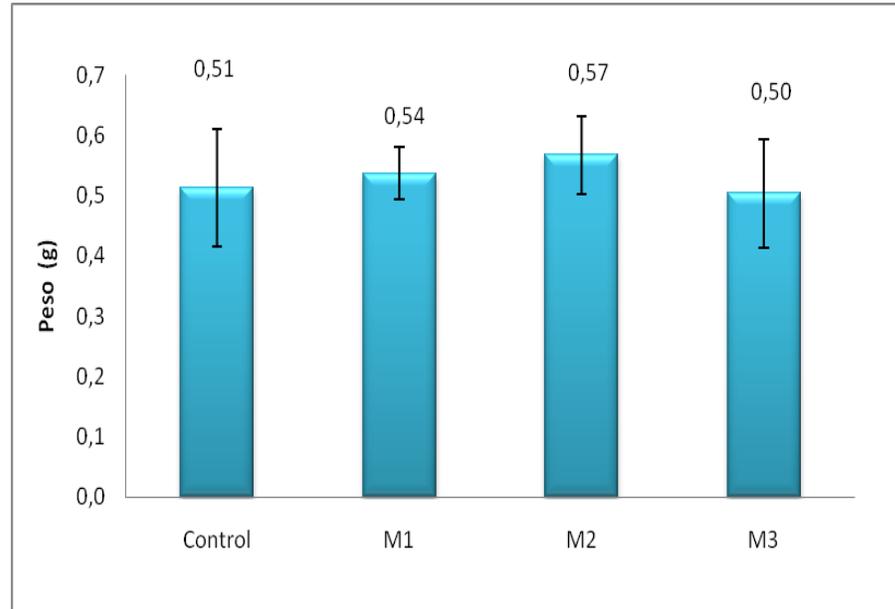
Figura 10. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *V. alginolyticus*. Los datos se presentan en porcentaje +/- error estándar. No hay diferencias estadísticamente significativas.

7.3 Experimentos con mezclas de bacterias probióticas

7.3.1 Evaluación del efecto de mezclas probióticas sobre el peso y talla de la tilapia nilótica

Los peces alimentados con mezclas de bacterias probióticas no presentaron un incremento en peso y talla estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($P > 0.05$). Los valores de incremento en peso para el grupo control, Mezcla 1 (M1), Mezcla 2 (M2) y Mezcla 3 (M3) fueron de 0,51 gr, 0,54 gr, 0,57 gr, y 0,50 gr respectivamente, mientras que el incremento en talla fue de 0,45 cm, 0,38 cm, 0,54 cm y 0,41 cm respectivamente (Figura 11).

a)



b)

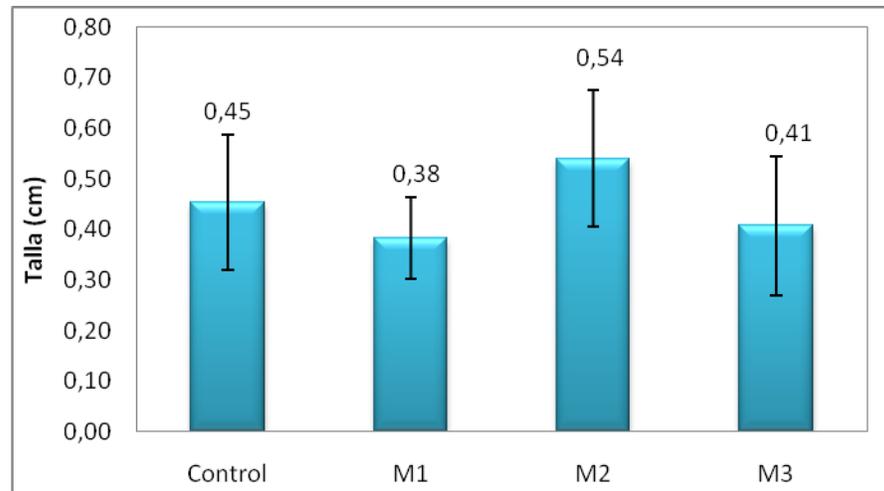


Figura 11. a) Incremento en peso, **b)** incremento en talla de juveniles de *O. niloticus* alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en g y cm \pm error estándar.

El tratamiento alimentado con M2 (*L. acidophilus* + *L. casei*) presentó la mayor TCE (0,94 %/día \pm 0,164) aunque no es estadísticamente significativo con respecto al grupo control (0,81 %/día \pm 0,182) (Figura 12).

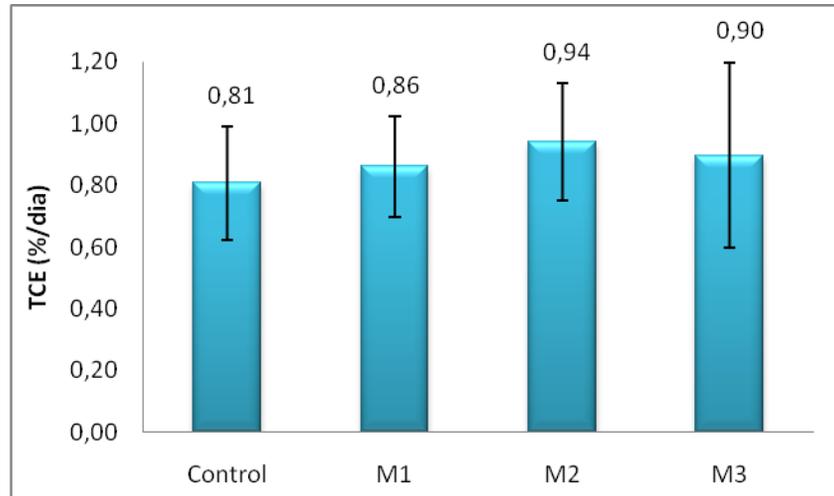


Figura 12. Tasa de crecimiento específica en juveniles de *O. niloticus* alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje / día \pm error estándar

En cuanto al IPDE no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$). En las tilapias alimentadas con las mezclas de bacilos y lactobacilos (M1 y M2) fue de 0,04 g/día, mientras que el control y M3 fue de 0,03 g/día. En cuanto al aprovechamiento de la dieta, los tratamientos M1 y M2 presentaron menores valores de TCA (4,73 gr \pm 0,403 y 4,53 gr \pm 0,540) comparado con el control (5,22 gr \pm 0,899) (Figura 13).

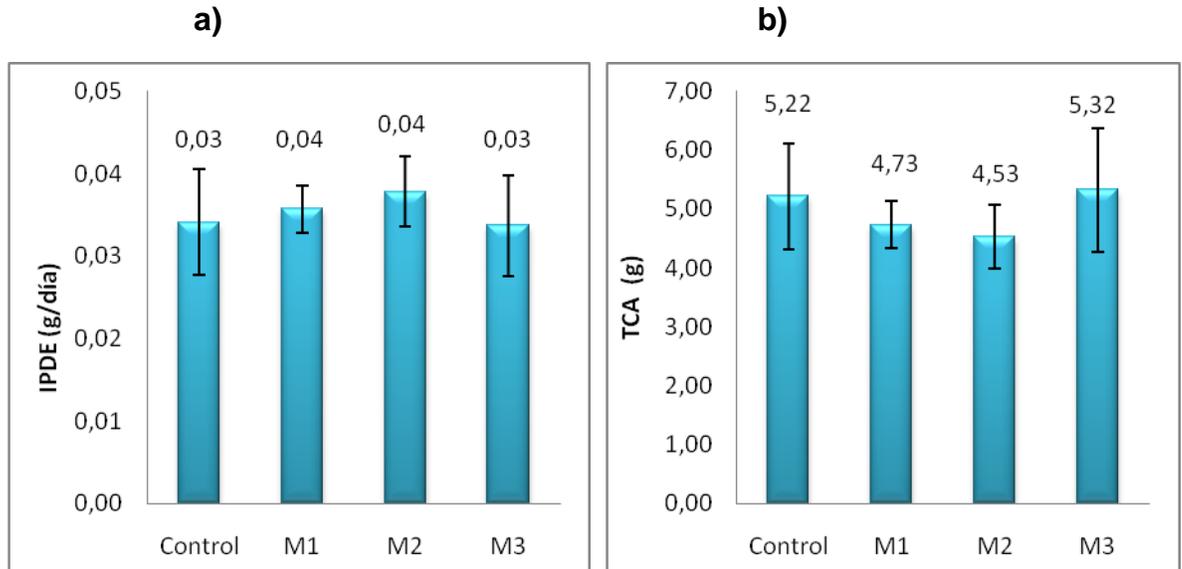


Figura 13. a) Incremento diario de peso individual en *O. niloticus* presentados en gr/día \pm error estándar. **b)** Tasa de conversión alimenticia en tilapia nilótica alimentada con mezclas probióticas. Los datos se presentan en gr \pm error estándar.

7.3.2 Supervivencia natural de los peces durante el período de alimentación.

Los peces alimentados con la mezcla probiótica M1 (*B. pumilus* + *Bacillus* sp) tuvieron una supervivencia del 99 % \pm 1,111 y es estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($P < 0,05$) que fue del 90 % \pm 5,091 (Figura 14). Los otros dos tratamientos aunque fueron mayores que el control no son estadísticamente significativos.

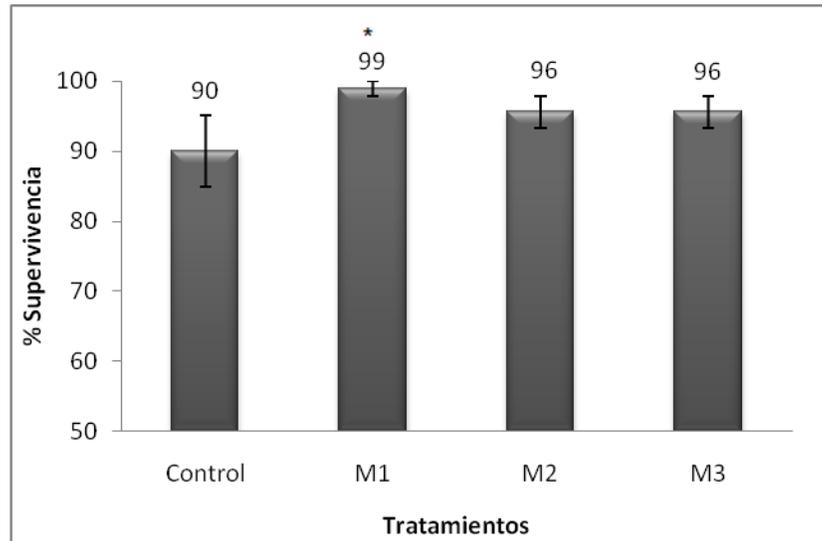


Figura 14. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el periodo de alimentación con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje.

7.3.3 Efecto de la alimentación con suplemento de bacterias nativas de tilapia nilótica en la resistencia a infecciones experimentales.

Se realizaron infecciones experimentales por inyección intraperitoneal con tres patógenos distintos: *A. hydrophila*, *S. agalactiae* y *V. alginolyticus* en concentraciones de 1×10^6 UFC/ml. En el desafío experimental con *A. hydrophila* las tilapias alimentadas con mezclas probióticas presentaron una supervivencia del $100 \% \pm 0,000$ con respecto al grupo control de $88 \% \pm 11,538$ (Figura 15). En este caso particular la virulencia de la cepa pudo haberse perdido por lo cual se presentan valores tan altos.

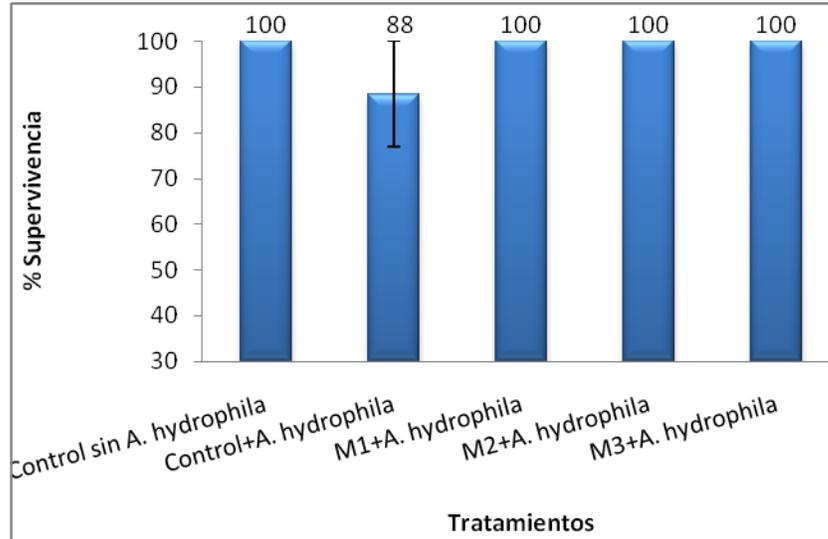


Figura 15. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *A. hydrophila*. Los datos se presentan en porcentaje.

En el desafío experimental con *S. agalactiae* los tratamientos M1, M2 y M3 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) con respecto al grupo control (Figura 16), al igual que en la infección con *V. alginolyticus* (Figura 16). La mayor supervivencia en ambos casos la presentó M1 (60 % \pm 40,000 y 79 % respectivamente).

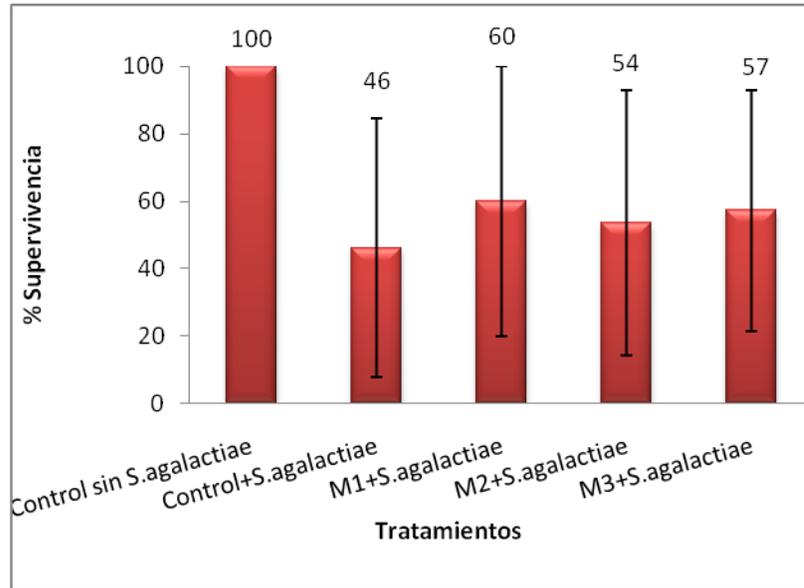


Figura 16. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *S. agalactiae* luego de ser alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje +/- error estándar..

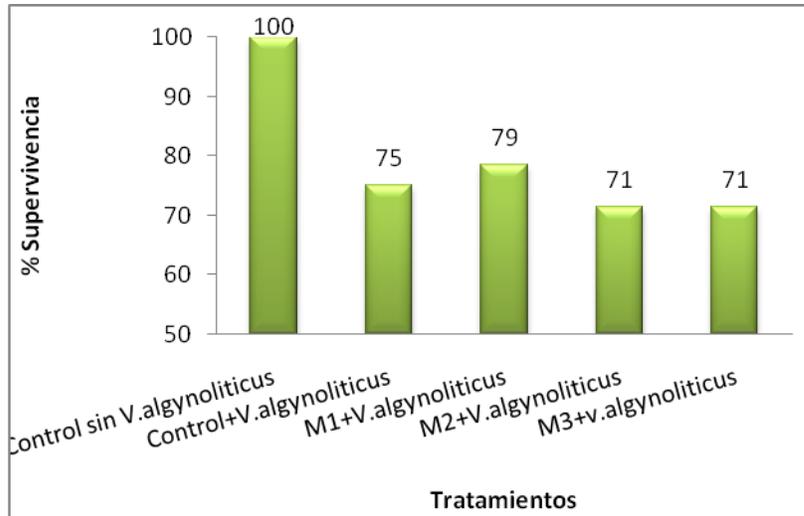


Figura 17. Porcentaje de supervivencia de los individuos de *O. niloticus* durante el desafío experimental con *V. alginolyticus* luego de ser alimentados con mezclas probióticas. Los datos se presentan en porcentaje +/- error estándar.

7.3.4 Evaluación de productos extracelulares de las bacterias empleadas en las mezclas probióticas

En el caso de M1 no se evidenció ninguna inhibición de crecimiento entre ellas al ser expuestas a sus productos extracelulares con respecto al grupo control (Figura 18). Lo cual indica que los productos extracelulares de *B. pumilus* no afectan el crecimiento de *Bacillus* sp. y viceversa ($P > 0,05$).

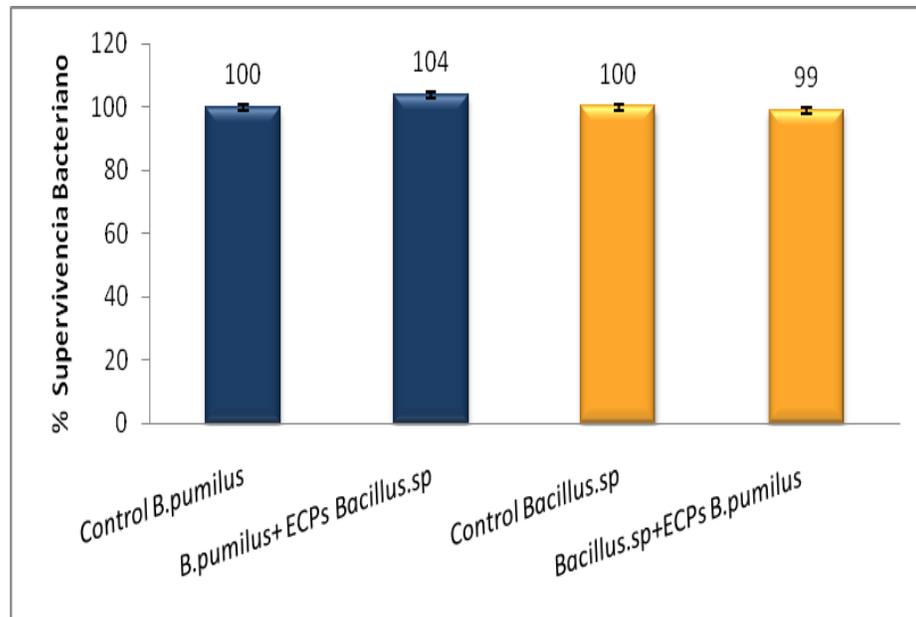


Figura 18. Supervivencia a las 48 h de *B. pumilus* y *Bacillus* sp. frente a sus productos extracelulares. Los datos se presentan en porcentaje +/- error estándar.

En el caso de M2, se obtuvo una clara inhibición del crecimiento de *L. acidophilus* por parte de los productos extracelulares de *L. casei* y viceversa. Los porcentajes

de supervivencia con respecto al control son estadísticamente significativos ($P < 0,05$), en el caso de *L. acidophilus* fue de $70 \% \pm 6,16$ y de *L. casei* de $79 \% \pm 0,480$. (Figura 19).

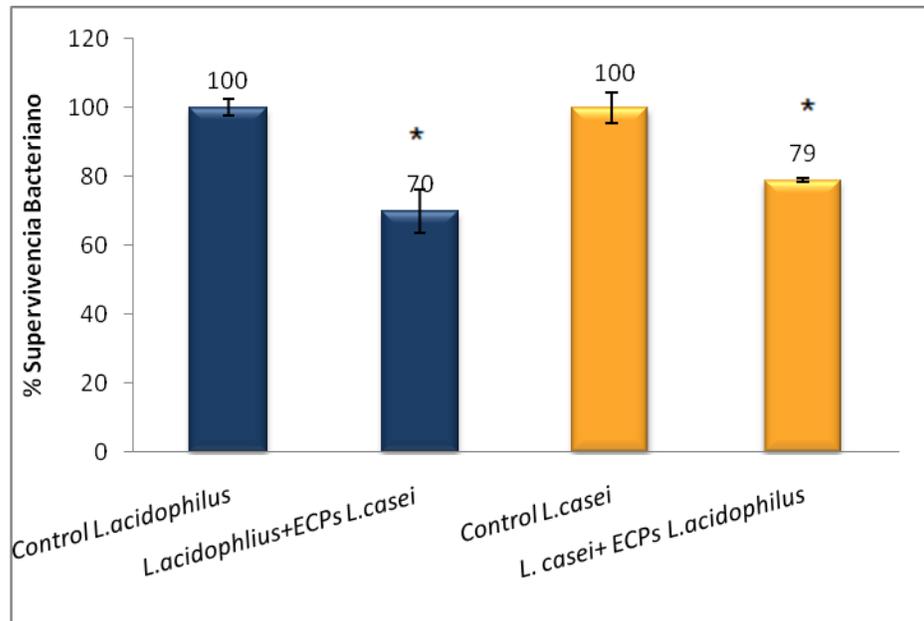


Figura 19. Supervivencia a las 48 h de *L. acidophilus* y *L. casei* frente a sus productos extracelulares. Los datos se presentan en porcentaje.

En el tratamiento M3, la supervivencia a las 48 h de *L. acidophilus* fue menor con respecto al control en medio MRS ($86 \% \pm 2,990$ y $100 \% \pm 5,560$ respectivamente) pero fue mayor con respecto al control preparado en medio TSB ($82 \% \pm 3,870$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre las supervivencia de esta bacteria con respecto a los grupos control ($P > 0.05$) (Figura 19). lo cual indica que no parece haber una inhibición significativa por parte de los productos extracelulares de *Bacillus* sp. sobre *L. acidophilus*. Sin embargo, la supervivencia de *Bacillus* sp. fue de $35 \% \pm 3,730$ y es significativamente menor

($P < 0,05$) con respecto a los grupos control preparados en TSB y en MRS ($100 \pm 3,180$ y $80 \% \pm 11,750$ respectivamente) lo cual sugiere una inhibición en el crecimiento por parte de los productos extracelulares de *L. acidophilus* sobre esta bacteria (Figura 20).

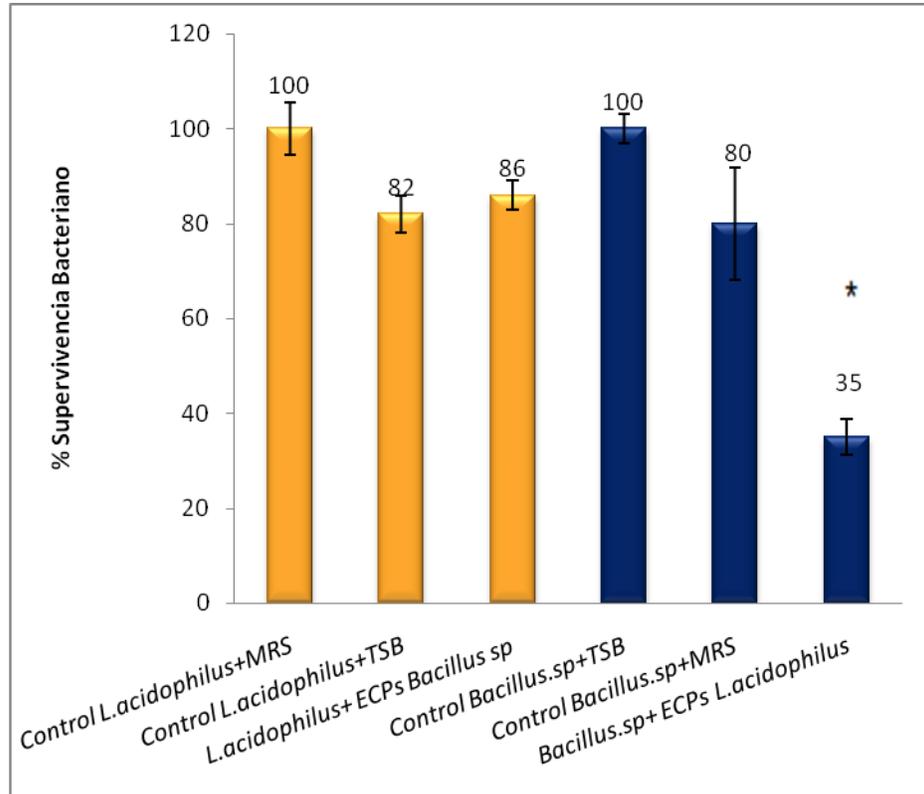


Figura 20. Supervivencia a las 48 h de *L. acidophilus* y *Bacillus sp.* frente a sus productos extracelulares. Los datos se presentan en porcentaje +/- error estándar.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

En la actualidad los probióticos han revelado sorprendentes resultados en los peces sobre el incremento en peso (Lara-Flores *et al.*, 2002. Guevara *et al.*, 2003; Ahilan *et al.*, 2004.; Günter y Jiménez-Montealegre, 2004.; Khattab *et al.*, 2006; Ramakrishnan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008a; Bagheri *et al.*, 2008) y la protección conferida contra patógenos en desafíos experimentales (Nikoskelainen *et al.*, 2001; Brunt y Austin, 2005; Planas *et al.*, 2006; Pirarat *et al.*, 2006; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2007a; Pieters *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2008b) aunque son pocos los estudios que han evaluado el efecto que tienen sobre la respuesta inmune de los peces (Villamil *et al.*, 2002; Panigrahi *et al.*, 2004; Kim y Austin, 2006; Balcázar *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2008a, Aly *et al.*, 2008c; Ma *et al.*, 2009), sin embargo han sido ampliamente utilizados en las fincas productoras por la capacidad que tienen de reducir los costos de producción y porque son una opción muy importante para la obtención de proteína animal (Lara-Flores *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2008) lo cual hace necesario generar mayor información de carácter investigativo acerca de los efectos benéficos que tienen los probióticos en la acuicultura.

En el experimento de supervivencia en agua de las bacterias se evidencia con el paso del tiempo una baja en el recuento bacteriano, tanto en las bacterias nativas de tilapia B16, B17 e IL1 como en *B. pumilus*, *Bacillus* sp., *L. acidophilus* y *L.casei*, lo cual ratifica la necesidad de nutrientes específicos que no tiene el agua destilada para poder tener un crecimiento óptimo, aunque en los acuarios utilizados podrían tener efectos adicionales mejorando la calidad del agua al degradar la materia orgánica generada por los peces (Vershuere *et al.*, 2000;

Planas, 2003) e incluso reduciendo la carga bacteriana circundante gracias al principio de exclusión competitiva (Moriarty, 1999, Laloo *et al.*, 2007) y podrían establecerse fácilmente al interior de los peces teniendo en cuenta su permanencia en el ambiente, incluso hasta más de 13 días en el caso de las especies de *Bacillus sp* y *Lactobacillus sp*.

Al alimentar los peces con tres cepas bacteriana aisladas de tilapia. Se encontró que los animales suplementados con B17 mostraron el mayor crecimiento en peso y talla y TCE posiblemente porque aprovechan mejor el alimento, sin embargo son pocos los estudios que se tienen sobre juveniles en esta especie y sería recomendable realizar más estudios de este tipo. Los peces de los tratamientos con B16 e IL1 también presentaron una ganancia en peso y talla superior a los peces alimentados únicamente con pienso comercial, lo cual quiere decir que las tres cepas nativas favorecen el crecimiento de la tilapia nilótica al suministrarse de manera periódica en el alimento. Esto puede ser posible ya que el tracto gastro intestinal provee nichos ecológicos favorables para muchas especies bacterianas (Syvokienė y Mickėnienė, 1998), basándose en el hecho que la microbiota autóctona actúa sobre la estructura, función y metabolismo del tracto digestivo en los organismos acuáticos (Balcázar *et al.*, 2006b) mejorando la capacidad del animal de asimilar mejor el alimento y por ende la nutrición (Al-Harby y Uddin, 2005) y que incluso sus efectos metabólicos pueden llegar a alterar la morfología del sistema digestivo en *O. niloticus* según lo propuesto por Kihara y Sakata (1997).

Teniendo en cuenta que se ha demostrado el aporte de vitamina B₁₂ y amilasa por bacterias aisladas de tilapia en la digestión (Sugita *et al.*, 1991, 1997) y en otras especies, nutrientes como la vitamina K (Vine *et al.*, 2006), los ácidos grasos

(Clements 1997), carbohidratos como la celulosa (Ringo *et al.*, 1995) y enzimas como las esterasas, lipasas, proteasas, carbohidrasas, fosfatasas y peptidasas las cuales contribuyen a la absorción de sustancias en los procesos digestivos y por lo tanto al mejor aprovechamiento de los nutrientes (Sugita *et al.*, 1997, Lara-Flores *et al.*, 2002, Ramírez y Dixon, 2003; Wang y Zirong, 2006), se puede pensar que las bacterias utilizadas en el presente estudio posiblemente juegan un rol significativo en los procesos de digestión de los peces al mejorar el crecimiento de los animales (Balcázar *et al.*, 2006b) atribuido quizá por la eficiencia en actividad enzimática, síntesis de vitaminas y absorción de nutrientes (Gatesoupe, 1999; Aly *et al.*, 2008c) .

Estos resultados son similares a los encontrados por Lara-Flores *et al.* (2002), y Wang *et al.*(2008a) quienes obtuvieron efectos positivos en incremento en peso total, incremento diario de peso individual y tasa de crecimiento específico en juveniles de *O. niloticus* alimentados con *L. acidophilus* y *Enterococcus faecium* respectivamente, al igual que los reportados en otras especies como *Carassius auratus* (Ahilan *et al.*, 2004) con *Lactobacillus* sp., confirmando un aprovechamiento del alimento y una disminución de la cantidad suministrada necesaria para el crecimiento. lo cual refleja a gran escala una reducción del costo de producción, pero es necesario aclarar que aunque la tasa de conversión alimenticia fue menor en los tratamientos suplementados con bacterias nativas con respecto al control, los valores siguen siendo un poco altos pues superan una relación 2:1 (dos gramos de alimento suministrado: un gramo de crecimiento en peso), lo cual puede atribuirse a dos factores: primero, a una elevada ración de alimento que los peces no consumían en totalidad a la hora de alimentación y por consiguiente se sedimentaba en horas sucesivas, y segundo, al bajo nivel proteico del pienso comercial suministrado que aunque no causa daño alguno en los

animales, si es considerado según Lara-Flores *et al.* (2003) como un factor de estrés para juveniles de esta especie.

Estas bacterias propias de la tilapia, parecen tener resultados positivos en esta especie y aunque aún no se sabe concretamente la razón por la cual los probióticos tienen efectos benéficos sobre el hospedero, se conocen ciertos mecanismos de acción que pueden influir en el potencial de estas bacterias. Dichas propiedades varían en cuanto a la especie pero generalmente se basan en el mecanismo de exclusión competitiva por medio del cual los organismos benéficos excluyen a aquellos patógenos. Estas son: la competencia con otras bacterias por sitios de fijación, dependiendo de la capacidad de ingresar al hospedero y de mantenerse de acuerdo a las propiedades de adherencia al epitelio intestinal permitiendo que sean moduladores de la microbiota intestinal (Balcázar, 2002; Fooks y Gibson, 2002), el éxito se logra gracias a un flujo lento del probiótico a través del tracto gastrointestinal y está determinado por una serie de estructuras superficiales conocidas como adhesinas. La importancia de este punto se fundamenta en que las bacterias patógenas poseen una alta fijación y virulencia, pero su exclusión puede obtenerse por métodos bacteriostáticos (inhibiendo el crecimiento) o bactericidas (matando a otras bacterias) (Gatesoupe, 1999) mediante la producción de sustancias antimicrobianas denominadas bacteriocinas propias de cada especie y otras como, lisozimas, sideroforos, peróxido de hidrogeno (Vershuer *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Kesarkodi-Watson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008b; Villamil y Novoa, 2009) y generando alteraciones de los valores de pH como en el caso de las bacterias ácido lácticas, por la producción de ácido láctico y ácido acético (Ringo y Gatesoupe, 1998; Heczko *et al.*, 2006). Otro mecanismo de acción importante es el aprovechamiento del alimento con el aporte de nutrientes esenciales e incremento de la digestión debido a liberación de enzimas (Balcázar *et al.*, 2006), lo cual pudo haber sucedido en el presente estudio con las bacterias nativas de tilapia nilótica.

Los peces alimentados con las mezclas de bacterias probióticas compuestas por especies de *Lactobacillus* sp. y *Bacillus* sp. no presentaron aumentos significativos en peso y talla con respecto al control. Las tasas de crecimiento específico entre todos los tratamientos no son representativas, y los índices IPDE para todos los casos son similares, lo cual indica que las especies probióticas mezcladas en el presente estudio no presentan un efecto sinérgico que pueda mejorar el crecimiento de *O. niloticus*, aunque en estudios previos se ha comprobado que al ser suministrados individualmente tienen un efecto positivo en los peces (Martínez-Silva *et al.*, 2008; Ospina, 2009). Las tasas de conversión alimenticia, aunque son menores en M1 y M2, presentan valores muy altos con una relación aproximada de 5:1, que se puede atribuir al exceso de comida en la ración suministrada. Estos resultados difieren de los presentados por Aly *et al.* (2008), quienes aseguran que las mezclas de *B. subtilis* y *L. acidophilus* presentan mejores resultados de crecimiento y supervivencia en tilapia nilótica que cuando son suministrados individualmente, atribuyéndolo al gran potencial probiótico que tienen estas cepas para mejorar la digestión y ayudar con el sistema inmune de los peces Sin embargo, en el presente estudio se ha comprobado la capacidad que tienen los productos extracelulares (ECPs) de *L. acidophilus* y *L. casei* para inhibir el crecimiento entre ellas mismas y el de otras bacterias como *Bacillus* sp. Estos ensayos fueron posteriores a los experimentos *in vivo* con el fin de aclarar una posible causa de la no sinergia entre las mezclas.

Es bien conocido que las bacterias ácido lácticas actúan como probióticos en gran cantidad de organismos y por eso son ampliamente utilizadas (Ringo y Gatesoupe, 1998; 2008; Brizuela *et al.*, 2001; Irianto y Austin, 2002; Thin *et al.*, 2007; Kesarkodi-Watson *et al.*, 2008; Villamil y Novoa, 2009). Existen estudios como los de Villamil *et al.* (2003a) en los que se evalúa el efecto inmunomodulatorio de algunas bacterias ácido lácticas en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) lo cual

evidencia la gran efectividad que tienen ciertas especies, en la protección contra patógenos; también hay publicaciones referidas al género *Lactobacillus* sp. donde se confirma el gran beneficio en cuanto a crecimiento y supervivencia a infecciones experimentales en especies de importancia comercial como la trucha arcoíris (Nikoskelainen *et al.*, 2001; 2003, Panigrahi *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009) y específicamente *O. niloticus* donde se ha demostrado que *L. rhamnosus* promueve la aglomeración de fagocitos e incrementa la actividad fagocítica, protegiendo al pez de la muerte causada por *Edwardsiella tarda* (Pirarat *et al.*, 2006), y que *L. acidophilus* puede mitigar los efectos de estrés en juveniles de esta especie siendo también un buen promotor de crecimiento al ser suplementado en dietas con el 40% de proteína (Lara-Flores *et al.*, 2003) gracias a que es un gran colonizador del tracto gastrointestinal mediante factores de adhesión altamente compatibles con las proteínas de las células epiteliales (Buck *et al.*, 2005). Pero en el presente estudio dicho efecto no se evidenció y se debe a la competencia que se puede presentar entre las bacterias ácido lácticas mezcladas.

Los resultados del presente estudio sugieren que al mezclar *L. acidophilus* con *L. casei* o con *Bacillus* sp no se promueve el crecimiento de juveniles de tilapia nilótica y no ayuda a la supervivencia de los peces al ser sometidos a desafíos experimentales, esto se debe a que existe una inhibición del crecimiento por parte de esta bacteria sobre *Bacillus* sp. y *L. casei* que podría llegar a anular cualquier efecto sinérgico en el pez. Esto puede atribuirse a la capacidad antagónica que tienen estas especies (Ringo y Gatesoupe, 1998) con la reducción del pH del medio, el cual, limita el desarrollo de gran cantidad de bacterias basándose en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno y otros derivados del metabolismo del oxígeno, compuestos aromáticos como el diacetilo y acetaldehído, derivados

deshidratados del glicerol, enzimas bacteriolíticas de gran actividad proteolítica, y bacteriocinas como las acidocinas (Rogelj *et al.*, 2002; Matijasic *et al.*, 2004; Majhenič *et al.*, 2004; Azcarate-Peril *et al.*, 2005) entre las que se encuentra Lactacin B, la cual es exclusiva de *L. acidophilus*, termoestable, producida óptimamente a pH 6,0 y activa contra especies estrechamente relacionadas del mismo género disminuyendo su proliferación (Barefoot y Klaenhammer, 1983). Es muy probable que muchos de estos productos estén involucrados en la inhibición del crecimiento entre los mismos lactobacilos y también de *Bacillus* sp., en el cual se ha comprobado con anterioridad que las bacterias ácido lácticas pueden limitar su crecimiento (Wong y Cheng, 1988; Marijasic *et al.*, 1998).

Del mismo modo, se conoce que bacterias del género *Bacillus* sp. pueden tener un efecto positivo sobre el crecimiento de la tilapia nilótica y su resistencia a enfermedades (Günter y Jimenez-Montealegre, 2004; Kumar *et al.*, 2008; Martínez-Silva *et al.*, 2008) al igual que en otras especies (Moriarty, 1999; Farzanfar, 2006; Lallo *et al.*, 2007; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2009), pero pocos estudios tratan sobre la mezcla de varias de estas bacterias. En el presente estudio, al mezclar un cepa de *B. pumillus* con una de *Bacillus* sp. no se encontró algún efecto probiótico sobre la tilapia nilótica y aunque no se evidencia inhibición de crecimiento por parte de sus ECPs, esto no garantiza que no estén compitiendo entre sí por sitios de fijación en el tracto gastrointestinal o que tengan una colonización pasajera en el hospedero considerándose microbiota alóctona (Ringo y Olsen, 2003) y por ende un efecto mínimo cuando son administradas de manera simultanea. Además, hay que tener en cuenta que los probióticos son altamente específicos con relación al hospedero y sus mecanismos de acción pueden variar entre individuos de la misma especie dependiendo del ambiente, aún más en organismos acuáticos donde la composición de la microbiota en el intestino está directamente relacionada con el medio exterior, lo cual hace que no sea una entidad absoluta (Moriarty, 1999; Irianto y Austin, 2002; Escobar-Briones

et al., 2006). Es por esto que no en todas las especies se obtienen los mismos resultados con bacterias catalogadas como probióticos, como es el caso de Günter y Jimenez (2004) quienes obtuvieron menor crecimiento al adicionar *B. subtilis* en la dieta de tilapia nilótica y de Mazurkiewicz *et al.*, (2008) quienes no obtuvieron diferencias significativas con probióticos en la carpa común, y como en muchos casos de las granjas productoras que al probar productos comerciales no tienen ningún efecto positivo. Entonces, no se trata de alimentar a cualquier especie con gran cantidad de probióticos, sino al contrario, de seleccionar de manera específica a los hospederos en los cuales se va a usar, ya que de esta manera se reducen los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos (Duwat *et al.*, 2000) y en el caso de obtener buenos resultados realizar pruebas a gran escala con instrumentos adecuados de monitoreo y la producción bajo un estricto control de calidad.

En cuanto a la supervivencia natural, no se encontraron diferencias durante el período de alimentación y fue alta para todos los tratamientos ratificando la gran supervivencia y facilidad de manejo para el cultivo que tiene esta especie (Covaleda *et al.*, 2005; Baltazar, 2007), En el caso de aislados nativos, se encontró que los peces alimentados con suplemento de M1 presentaron una diferencia significativa con respecto al control, (Lara-Flores *et al.*, 2003). Sin embargo, las supervivencias siguen siendo buenas ya que los valores no son menores a un 90%.

La supervivencia frente al desafío experimental con *S. algactiae* fue muy baja ya que en ninguno de los tratamientos fue superior al 65 %. En el caso de los peces alimentados con bacterias nativas de tilapia fue mayor con respecto al grupo control, pero no existe una diferencia estadísticamente significativa, aunque en

este caso, fue mejor que en los animales suplementados con mezclas de bacterias probióticas. Esta baja supervivencia, puede atribuirse al alto grado de patogenicidad y virulencia que tienen las cepas de *Streptococcus* para causar devastadoras mortalidades en los cultivos de tilapia (Ferguson *et al.*, 1994, Bromage *et al.*, 1999, Romano y Mejía, 2003) por medio de la acción de sustancias conocidas como L-antibióticos que actúan excluyendo a las bacterias circundantes (Nes *et al.*, 2007). También se conoce que *S. agalactiae* tiene estrategias de patogenicidad exitosas gracias a la formación de una capsula de polisacáridos que lo protege del sistema inmune del hospedero en la acción de leucocitos y macrófagos evitando ser fagocitado (Pulido *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2007) de este modo se expande la infección en el hospedero gracias a la propagación de la bacteria contribuyendo a la destrucción de las células del tejido conectivo del hospedero (Rojo *et al.*, 2002), y en algunos casos cuando es fagocitado puede inducir a la apoptosis del macrófago por la acción de una toxina denominada β h/c (Beta hemolítica citotóxica) la cual también causa lisis de los eritrocitos del hospedero (Liu y Nizet, 2006) quedando libre el patógeno para su propagación.

Lo anterior demuestra que aunque algunas cepas nativas puedan inhibir ciertos patógenos como lo revela Aly *et al.* (2008c) quienes caracterizaron algunas bacterias nativas de tilapia nilótica y evaluaron su capacidad antibacteriana *in vitro* no garantiza en ningún momento resultados positivos en experimentos *in vivo* pues en el presente estudio se escogieron los aislados de tilapia nilótica B16, B17 e IL1 porque presentaron *In Vitro* gran actividad antimicrobiana contra *A. hydrophila* y *S. agalactiae*, lo que sugiere que solamente los estudios *In Vitro* son muy limitados a la hora de escoger prebióticos.

En el caso del desafío experimental con *A. hydrophila*, la supervivencia de los peces alimentados con mezclas probióticas fue alta pero no se puede atribuir al grado de protección que pueden conferir los probióticos ya que particularmente en estos experimentos la virulencia del patógeno fue prácticamente nula debido a fallas en el sistema de congelamiento donde se encontraba el stock de esta cepa. Es importante resaltar dos aspectos, primero que se han realizado varios estudios en los que se reconoce que esta bacteria causa mortalidades para la tilapia nilótica (Ospina, 2009) gracias a sus diferentes mecanismos de virulencia tales como la producción de proteasas, aerolisinas, enterotoxinas que son altamente citotóxicas y causan la muerte de eritrocitos en el hospedero (Paniagua *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2003; Urgell, 2004); segundo, que existen varios probióticos tales como *B. subtilis* y *Carnobacterium* sp. utilizados como agentes que ayudan a controlar esta infección (Ringo *et al.*, 2002; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007), llegando incluso a tener efectos positivos sobre la expresión de genes de defensa tal como lo refiere Reyes (2009) quien encontró aumento en la transferrina la cual quela el hierro disponible en la sangre, limitándolo para el crecimiento de bacterias como *Aeromonas* sp., y el aumento de citoquinas como IL-1 β y TNF α que coordinan la acción del sistema inmune gracias a la adición de *L. acidophilus* en la dieta de tilapia nilótica.

Para el desafío experimental con *V. alginolyticus*, ninguno de los tratamientos mostró una supervivencia significativa mayor con respecto al grupo control. En el caso de las bacterias nativas de tilapia, los peces suplementados con B16 e IL1 tuvieron supervivencias menores que los controles. Este patógeno, es oportunista y predominante en ecosistemas marinos (Cruz-Silva *et al.*, 1997) pero en el presente estudio se ha comprobado que puede afectar a *O. niloticus*. debido a factores de estrés como el bajo nivel proteico en la dieta el cual no es ideal para individuos de esta edad (Lara-Flores *et al.*, 2003) la inoculación de la bacteria vía

inyección intraperitoneal pudo afectar el nivel inmunológico de los peces proliferándose la enfermedad, mostrando síntomas claros de infección tales como el nado errático, pérdida del apetito, y exoftalmia, causando la muerte de los individuos (Reed y Francis-Floyd, 1996). Dicho estrés pudo haber sido mayor que la capacidad de recuperación del pez, la acción de su sistema inmune, y por consiguiente de algún efecto benéfico conferido por alguna de las bacterias nativas suministradas generando mortalidades que aunque no fueron altas, si son representativas.

En el desafío con mezclas probióticas con especies de *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp. tampoco se evidenciaron resultados favorables en supervivencia de los peces tratados con las mezclas con respecto al control. Los peces suplementados con M2 (*L. acidophilus* + *L. casei*) y M3 (*L. acidophilus* + *Bacillus* sp.) tuvieron una menor supervivencia que los alimentados únicamente con pienso comercial. Esta mortalidad se puede atribuir a la inhibición que ocurre entre ellas mismas comprobada en los ensayos *in vitro*, y que posiblemente por razones anteriormente expuestas anulan su efecto probiótico sobre este patógeno. En este caso se recomienda realizar estudios posteriores en esta especie donde se implique *V. alginolyticus* como patógeno suministrando las cepas individualmente con el fin de obtener posibles resultados favorables de protección.

Por último, es necesario enfatizar que aunque los probióticos tienen un efecto benéfico en la acuicultura y son ampliamente utilizados en ella, son altamente específicos en cuanto a que resultados varían de acuerdo a la especie hospedera, a las dosis, tiempo de administración, a los factores de estrés, y a los patógenos que se utilicen experimentalmente (Gatesoupe, 2008). Lo cual implica la realización de futuros estudios en la administración de las posibles especies benéficas y de la ecología microbiana tanto del ambiente como del tracto

gastrointestinal de la especies cultivadas pues de esto puede depender la comprensión del tema para avanzar cada vez más en pro de mitigar el uso de antibióticos y reducir los costos de producción acuícola que día a día aumenta su demanda a nivel mundial.

9. CONCLUSIONES

Las bacterias nativas de tilapia B16, B17 e IL1, al igual que los probióticos *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. pumilus* y *Bacillus* sp sobreviven en el agua destilada, esteril por más de una semana aunque no presentan crecimiento debido a la ausencia de nutrientes.

Las bacterias nativas de tilapia B16, B17 e IL1 pueden incrementar el crecimiento de *O. niloticus* al suministrarse como suplemento alimenticio reduciendo la tasa de conversión alimenticia con respecto a la dieta con pienso comercial posiblemente por el aporte de nutrientes esenciales que mejoran los procesos digestivos en esta especie.

La evaluación *in vitro* de productos extracelulares mostró, que las cepas *L. acidophilus* y *L. casei* se inhiben entre ellas, y que *L. acidophilus* limita el crecimiento de *Bacillus* sp.

Las mezclas realizadas con bacterias probióticas no demuestran una acción sinérgica con respecto al crecimiento de *O. niloticus* ni a la resistencia contra infecciones experimentales, debido posiblemente a la producción de sustancias antagónicas por parte de *L. acidophilus* y *L. casei* que inhibe el crecimiento de las demás bacterias y a la exclusión competitiva que posiblemente existe entre ellas.

La mezcla de bacterias probióticas no siempre genera buenos resultados pues sus efectos dependen del tipo de cepas escogidas, de la concentración en la que pueden ser útiles, y de la especificidad que tienen en el hospedero.

No existe ninguna protección conferida por las bacterias nativas de tilapia B16, B17 e IL1, ni por las mezclas de bacterias probióticas M1 (*B. pumilus* + *Bacillus* sp), M2 (*L. acidophilus* + *L. casei*) y M3 (*L. acidophilus*+*Bacillus* sp) contra *S. agalactiae* y *V. alginolyticus* al ser expuestos experimentalmente en juveniles de tilapia nilótica.

10. RECOMENDACIONES

En futuros experimentos con probióticos en tilapias se recomienda realizar un análisis del tracto digestivo con el fin de ratificar la colonización de las bacterias suministradas, observar la exclusión de patógenos y corroborar la digestión del alimento con la adición de probióticos.

Es conveniente realizar más experimentos sobre el uso de probióticos en tilapia nilótica de diferentes edades con el fin de encontrar un probiótico específico que se pueda implementar a una escala piloto en esta especie.

Se consideran necesarios más estudios sobre cepas nativas de tilapia las cuales parecen tener resultados promisorios teniendo en cuenta que al ser autóctonas de esta especie pueden colonizar fácilmente el tracto gastrointestinal generando roles favorables en los peces.

Son necesarios más estudios para entender el efecto y mecanismos de acción *in vivo* de las diferentes cepas nativas de tilapia nilótica y de bacterias probióticas en general en la prevención de enfermedades que causen grandes mortalidades en los cultivos.

Se recomienda probar diferentes mezclas de probióticos para conocer los efectos en el incremento en peso y resistencia a enfermedades en tilapia nilótica, con el fin de encontrar una serie de bacterias que en conjunto puedan reducir a escala comercial los costos de producción de esta especie.

BIBLIOGRAFIA

Ahilan, B., Shine, G. y Santhanam, R. 2004. Influence of probiotics on the growth and gut microbial load of juvenile Goldfish (*Carassius auratus*). Asian fisheries science (17) : 271-278 pp.

Al-Harbi, A.H. y Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. Aquaculture (250): 566-572 pp.

Álvarez, J., Agurto, C., Álvarez, A. y Obregón, J. 2006. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. Laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos. Maracay, Venezuela. Veterinaria completa-14-16 pp.

Alvarez-Pellitero, P., Barja, J., Blanch, A., Estévez-Foranzo, A., Figueras, A., Giorgetti, G., Jofre-Torroela, J., McAllister, E., Sarti, M., Villalba, A. 1988. Patología en Acuicultura. CAICYT. Madrid, España.

Aly, S.M., Abd-El.Rahman, A., John, G., y Mohamed, M. 2008a. Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. Aquaculture 277, 2-6 pp.

Aly, S.M., Mohamed, M. y Jhon, G. 2008b. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research. 39, 647-656 pp.

Aly, S.M., Abdel.Galil, Y., Abdel-Aziz, Mohamed, M. 2008c. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish y Shellfish Immunology (2008) 25, 128-136 pp.

APROMAR. 2007. Guía para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Mediterránea. Interacciones entre la Acuicultura y el Medio Ambiente. UICN, Gland, Suiza y Málaga, España. 114 p.

APROMAR. 2008. La acuicultura marina de peces en España. Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. España. 71 p.

Arijo, S., Brunt, J., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P. y Austin, B. 2008. Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *V. harveyi*. *Journal of Fish Diseases* 31, 579-590 pp.

Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. (APROMAR). 2004. La acuicultura en el mundo. UICN, Gland, Suiza y Málaga, España 4 pp.

Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR). 2008. La acuicultura marina de peces en España. Informe anual. 71p.

Azcarate-Peril, A. McAuliffe, O. Atermann, E. Lick, S. Rusell, M. y Klaenhammer, R. 2005. Microarray Analysis of a Two-Component Regulatory System Involved in Acid Resistance and Proteolytic Activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied And Environmental Microbiology*. Oct., 5794–5804 pp.

Bagheri T., Hedayati, S., Yavari, V., Alizade, M. y Farzanfar, A. 2008. Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. *Turkian journal of Fisheries and Aquatic. Sciences*. (8): 43-48 pp.

Balcázar, J.L. 2002. Use of probiotics in aquaculture: general aspects. En: de Blas, I. (Ed.), *Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, España. 877–881. pp.

Balcázar, J.L., Blas, i., Ruiz., I., Cunningham, D., Vendrell, D. & y Múzquiz, L. 2006a. The role of probiotics in aquaculture (Review). *Vet. Microbiol* 114, 173-186 pp.

Balcázar, J:L: Decamp, O. Vendrell, D. De Blas, I. y Ruiz-Zarzuela, I. 2006b. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease* (18)

Balcázar , J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Fironés, O. y Muzquiz, J. 2007a. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Med. Microbiol.* (51): 185-193 pp.

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

Baltazar, P. 2007. La Tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. *Rev. Perú. Biol.* Número especial 13(3):267–273 pp.

Barefoot, S. y Klaenhammer, T. 1983. Detecrion and activity of Lacracin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Jun., 1808-1815 pp.

Bautista, E., Ornelas, P., Pedraza, C. y Gutiérrez-Yurrita, P. 2006. Influencia de la administración de alimento complementario sobre el crecimiento de *Oreochromis mossambicus* (Steindachner, 1864) cultivada en jaulas flotantes en un embalse eutrofizado. *Memorias del IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, España.

Brizuela, M.A., Serrano, P. y Pérez, Y. 2001. Studies on Probiotics Properties of Two *Lactobacillus* Strains. *Brazilian archives of biology and technology*, 44 (1): 95-99 pp.

Brunt, J. y Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and *streptococcosis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 28, 693–701 pp.

Brunt, J., Newaj-Fizul, A. y Austin, B. 2007. The development of probiotics for the control of multiplebacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 30, 573–579 pp.

Bromage, E.S., Thomas, A. y Owens, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Org (36): 177-181 pp

Buck, B. Altermann, E. Svingerud, T. y Klaenhammer, R. 2005. Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Applied and Environmental Microbiology, Dec. 8344–8351 pp.

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. Journal of Science and Technology, 30 (1): 141-148 pp.

Cahill, M. 1990. Bacterial Microflora of fishes. A review. Microbial ecology (19): 21-41 pp.

Cantor, F. 2007. Manual de producción de tilapia. Secretaría de Desarrollo rural del Estado de Puebla. 60 p.

Castillo, L. 2004. La importancia de la tilapia roja en el desarrollo de la piscicultura en Colombia. Memorias del taller latinoamericano Tilapia. Situación Actual de la Tecnología, Desarrollo y Perspectivas de Mercado para la Tilapia y sus Productos Puerto Vallarta (Jalisco), México.

Castillo, L. 2008. Tilapia roja: una evolución de 26 años, de la incertidumbre al éxito. *Panorama Acuícola Magazine* 10 (2): 28-33 pp.

Castro, L. y de Rovetto, C. 2006. Probióticos: utilidad clínica- *Colomb. Méd.* 37 (4): 308-314 pp.

Cerdá, J., Pérez-Igualada, L., Zaragoza, L. y Fernandez-Carmona, J. 1998. Crecimiento de tilapias (*oreochromis niloticus*, L.) con piensos extrusionados de diferente nivel proteico. *Arch. Zootec.* (47): 11-20 pp.

Cely, L. y Nina, L. 2004. Perfil de mercado de Estados Unidos de Norteamérica para tilapia. Corporación de promoción de exportaciones e inversiones. Oficina CORPEI. Miami 23 p.

Clements KD (1997) Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. *Gastrointestinal Microbiology* 156–198 pp. Chapman y Hall Microbiology Series, International Thomson

Conroy, G. 2004. Importantes enfermedades detectadas en tilapias cultivadas en América Latina. *Panorama Acuícola Magazine* (sept/oct): 20-25 pp.

Corporación Colombiana Internacional (CCI). 2006. Pesca y Acuicultura Colombia 2006. Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial 138 p.

Covaleda H., Espinal C., y Rodríguez, F. 2005. La cadena de la piscicultura en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica: 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas. Colombia Bogotá 41p.

Cruz e Silva, M.P. Freitas, M.S., y Orge, M.L. 1997. Co-infection by monogenetic trematodes of the genus *Microcotyle* V. Beneden and Hesse 1863, *Lamellodiscus ignoratus* Palombi, 1943, the protozoan *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1838 and the presence

of epitheliocystis, *Vibrio alginolyticus* and *V. vulnificus* in cultured seabream (*Sparus aurata* L.) in Portugal. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 17(2): 40-42 pp.

Cumming, G., Filder, F., y Vaux, D. 2007. Error bars in experimental biology. The journal of cell biology. (177): 7-11 pp.

Daniel, W. 2004. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa-Wiley. México. 775 p.

Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S. y Gruss, A. 2000. *Lactococcus lactis*, as bacterial model for stress responses and survival. International Journal of Food Microbiology (55): 83-86 pp.

Eldar, A. y Ghittino, C. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Diseases of aquatic organism (36): 227-231 pp.

Escobar-Briones, L., Olvera-Novoa, A., Puerto-Castillo, C. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. Avances en nutrición acuícola VIII. VIII simposium internacional de nutrición acuícola. México. 107-128

Espejo, C. y Torres, E. 2001. Cultivo de tilapias rojas (*Oreochromis* spp.) y plateada (*Oreochromis niloticus*) En: Fundamentos de acuicultura continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Bogotá. 283-299 pp.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. Inmunol. Med. Microbiol (48): 149-158 pp.

Ferguson, G., Morales, J. y Ostland, V. 1994. Streptococcosis in aquarium fish. Dis. Aquat. Org.(19): 1-6 pp.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2002. El estado mundial de la pesca y acuicultura. Departamento de pesca. Roma 148 p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003. El papel de la acuicultura en la mejora de la seguridad alimentaria y la nutrición. Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, 29º periodo de secciones, Roma

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2004. Capture based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2006. State of world aquaculture- Inland Water Resources and Aquaculture Services. Fishery Resources Division. Roma 132 p.

Fooks, L.J. y Gibson, G. R. 2002- Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of nutrition (88): S39 - S42 pp.

Frouël, S. Le Bihan, E., Serpentini, A. Lebel, J.M., Koueta, N. y Nicoas J.L. 2008. Preliminary Study of the Effects of Commercial Lactobacilli Preparations on Digestive Metabolism of Juvenile Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 14:100–106 pp.

Fuentes-Rodríguez, JM. y Pérez-Hernandez, JA. 1998. Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Mex., 29 (1): 117-119 pp.

Gatesoupe, F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture (180). 147-165 pp.

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, 107-114 pp.

Guevara, J., Mateus, R. y Quintero, L. 2003. Evaluación de la utilización de probióticos en la fase de levante del ciclo de producción de la mojarra roja (*Oreochromis* sp.). Memorias IV Seminario Internacional de Acuicultura. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina veterinaria y de Zootecnia, Bogotá.

Günter, J. y Jiménez-Montealgre, R. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* vol. 52 (4): 937-943 pp.

Heczko, P. Strus, M. y Kochan, P. 2006. Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *Journal of physiology and pharmacology* (57): 5-12 pp.

Irianto, A. y Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25,1–10 pp.

Janda JM, y Abbott SL. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* (27): 332- 344 pp.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. y Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1–14 pp.

Kent, G. 1995. Aquaculture and Food Security. En: Proceedings of the PACON Conference on Sustainable Aquaculture. Pacific Congress on Marine Science and Technology. Honolulu, Hawaii, USA.

Khattab, Y., Shalaby, A. y Abdel-Rhman, A. 2006. Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. Memorias del VII International Symposium on Tilapia in aquaculture, Mexico.

Kihara, M. y Sakata, T. 1997 Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp Biochem Physiol* (118): 1201-1207.

Kim, D. y Austin, B. 2006. Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Induced by Probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* Vol (21): 513-524 pp.

Kumar, R. Mukherjee, S.C. Ranjan, R. y Nayak, S.K. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish and Shellfish Immunology* (24): 168-172 pp.

Laloo, R. Ramchuran, S. Ramduth, D. Görgens, J. y Gardiner, N. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology* (103): 1471–1479 pp.

Lara-Flores, M. Escobar-Briones, L. y Olvera-Novoa, M. 2002. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). En: Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M.m Gaxiola, M. y Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, México.

Lara-Flores, M. Olvera-Novoa, M. Guzmán-Méndez, B. y López-Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast

Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
Aquaculture (216):193-201 pp.G

Liu, G. y Nizet, V. 2006. The group B streptococcal β -hemolysin/cytolysin. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Cap 43. 735-745 pp.

Lowe, B. Miller, J. y Neely, M. 2007. Analysis of the polysaccharide capsule of the systemic pathogen *Streptococcus iniae* and its implications in virulence. Inft. Inmun 73 (3): 1255-1264 pp.

Lüders, T., Birkemo, G., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. y Nes, I. 2002. Strong synergy between a Eukaryotic Antimicrobial Peptide y bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69 (3): 1797-1799 pp.

Ma, C.; Chon, Y y Oh, K. 2009. Removal of Pathogenic Bacteria and Nitrogenes by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. Aquaculture (287): 266-270 pp.

Mahecha, C. 2006. Efecto de la inclusión de Probióticos y prebióticos sobre el desempeño productivo y la sobrevivencia de alevinos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) variedad chitralada. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de biología Marina. 50 p.

Majhenič . A. Č. Venema K. Allison, G. E. Matijašić, B. B. Rogelj, I. y Klaenhammer, T.R. 2004. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasser* LF221. Appl Microbiol Biotechnol (63): 705–714 pp.

Mann, C., McDowell, J., Kenney, A., O'Neill, B. y DeRosa, S. 2007. Sustainable Marine Aquaculture: Fulfilling the Promise; Managing the Risks. Report of the marine aquaculture task force. 117 p.

Martín, G. y Carmona, O. 2003. Prevención de la Resistencia bacteriana a antimicrobianos. Aspectos farmacológicos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 23 (1): 55-59 pp.

Martínez-Silva, M., Devia, A., Ospina, A., Reyes, C. y Villamil, L. 2008. Relación entre el uso de *Bacillus* y *Lactobacillus* y el nivel de sobrevivencia de tilapia nilótica durante desafíos experimentales con bacterias patógenas. Memorias IV Congreso Colombiano de Acuicultura. "Comercialización y potencial de mercadeo de los Recursos Acuícolas".

Matijašić, B. B. Rogelj, I. Nes, I. F. y Holo, H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl Microbiol Biotechnol* (49) : 606-612 pp.

Matijašić, B. B. Stojković, S. Salobir, J. Malobrh, S. y Rogelj, I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Anim. Res.* (53): 35–44 pp.

Mazurkiewicz, J. Przybyt, A., Sip, A. y Grajck, W. 2007. Effect of *Carnobacterium divergens* and *Enterococcus hirae* as probiotic bacteria in feed for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Arch. Pol. Fish.* 15 (2): 93-102 pp.

Mercenier, A. Lenoir-Wijnkoop, L. y Sanders, M. E. 2008. Physiological and functional properties of probiotics. *Bulletin of the International Dairy Federation*. Bélgica. 6 p.

MINCOMEX. 2000. Ministerio de Comercio Exterior. División de competitividad. Acuerdo de Competitividad Perfil Cadena Piscicultura de Exportación: Tilapia, trucha y Cachama.

Moriarty, D. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Microbial Biosystems: New frontiers*. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada

Nes, I. Diep, D. y Holo, H. 2007. Bacteriocins diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Bacteriology, Feb. 1189-1198 pp.

Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, J., Brunt, J. y Austin, B. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 103 (5): 1699-16705 pp.

Nikoskelainen, S., Ouweahnd, A., Salminen, S. y Bylund, G. 2001. Protection of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Furunculosis by *Lactobacillus rahnosus*. Aquaculture 198, 229-236 pp.

Nikoskelainen, S., Ouweahnd, A., Salminen, S. Bylund, G. Salminen, S. y Lilius E. M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish y Shellfish Immunology (15): 443–452 pp.

Ochoa L y Olmos J. 2005. Funcional nutritions in aquaculture: Probiotics, a sustentainable reality. Panorama Acuícola Magazine. México. Sept-Oct. 14-16 pp.

Olveira, G. y González-Molero, I. 2007. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. Nutr. Hosp. 22 (2): 26-32 pp.

Ospina, A. Evaluación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* como agentes probióticos sobre la resistencia a infecciones e incremento en peso de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*. 2009. Tesis de grado. Facultad de ciencias naturales. Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Oso, J. A., Ayodele, I.A., y Fagbuaro, O. 2006. Food and Feeding Habits of *Oreochromis niloticus* (L.) and *Sarotherodon galilaeus* (L.) in a Tropical Reservoir. World Journal of Zoology 1 (2): 118-121 pp.

Palacios, J. Coral, S. Zambrano, L. y López, J. 2007. Evaluación comparativa de prebióticos y probióticos incorporados en el alimento comercial sobre el crecimiento y la sobrevivencia de una especie nativa, el sábalo amazónico (*Brycon melanopterus*) y una especie foránea, trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Revista Electrónica de Ingeniería en Producción acuícola (2): 191-228 pp.

Paniagua, C. Rivero, O. Anguita, J. y Naharro, G. 1990. Pathogenicity factors and virulence for Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. J. Clin. Microbiol. 28 (2): 350-355 pp.

Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., y Sugita, H. 2004. Immune Responses in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Induced by a Potential Probiotic Bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary Immunology and Immunopathology. 102:379-388

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, 241-154 pp.

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): 723–732 pp.

Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., 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) 339–347pp.

Planas, M. Vasquez, J.y Marquez, J. 2003. Efecto de ácidos orgánicos presentes en extractos postincubados de bacterias lácticas terrestres en el crecimiento poblacional del

rotífero *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. Memorias del II congreso iberoamericano virtual de acuicultura, 347-357 pp.

Planas, M. Perez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Fiksdal, I.M., Bergh, O. y Pintado, J. 2006. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 255, 323–333 pp.

Ponce, D. Hernández, J. y Gasca, E. Viabilidad económica del policultivo de tilapia nilótica y langosta australiana en el estado de Yucatán, México. Documento de trabajo. Fac. CC. Económicas y Empresariales Universidad de La Laguna.

Pulido, A. Iregui, C. Figueroa, J. y Klesius, P. 2004. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia. *Rev. Aquatic.* (20): 97-106 pp.

Ramakrishnan M., Haniffa, M.A., Manohar, M., Dhanaraj, M., Jesu Arockiaraj, A., Seetharaman, S. y Arunsingh S. V. 2008. Effects of Probiotics and Spirulina on Survival and Growth of Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* (60), 128-133 pp.

Ramírez RF, y Dixon BA. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* (227): 417-426 pp.

Ramorino, L. 1974. Biología de moluscos cultivados en América latina. Actas del simposio sobre acuicultura en América Latina vol.2-documentos de reseña.

Robertson, P., O'Dowd, C.O., Burrels, C., Williams, P. y Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243 pp.

Reed, P. y Francis-Floyd, R. 1996. *Vibrio* infections of fish. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida.

Reyes, C. 2009. Expresión de genes de defensa de la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* alimentada con suplemento de bacterias probióticas. 2009. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias naturales.

Ringo, E. y Gatesoupe, F. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* (160): 177-203 pp.

Ringo E, Strom E, Tabachek JA. 1995. Intestinal microbiota of salmonids: a review. *Aquacult Res.* (26): 773-789 pp.

Ringo, E. Lodemel, J. Myklebust, R. Jensen, L. Lund, V. Mayhew, T. y Olsen, R. 2002. The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquaculture research* (33): 591-606 pp.

Ringo, E. y Olsen, R. 2003. Electron microscopy of the intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* (227): 395-415 pp.

Rodríguez, M., Botero, E., Iregui, CA. y Figueroa, J. 2005. Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en tilapia roja (*Oreochromis* spp.) y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 10 No. 2, 75-93 pp.

Rodríguez, I., Novoa, B. y Figueras, A. 2008. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* (25) 239-249 pp.

Rogelj, I. Bogovic-MAtijasic, B. Canzek-Majhenic, A. y Stojkovic, S. 2002. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* (76): 83– 91 pp.

Rojo, L. Araya, P. Martínez, M. Hormazábal, J. Maldonado, A. y Fernandez, J. 2007. Caracterización molecular en aislados chilenos de *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Méd. Chile.* (136): 606-612 pp.

Romano, A. y Mejia, J. 2003. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. *Rev. Aquatic.* N.º 18. 25-32 pp.

Saavedra, M. 2006. Manejo en el cultivo de tilapia. Coordinación de Acuicultura, Departamento de Ciencias Ambientales y Agrarias, Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente Universidad Centroamericana. Nicaragua. 22 p.

Sierra de La Rosa, J., Martínez, X. y Mendoza, M. 2009. Evaluación del cultivo de tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) y tilapia roja (*Oreochromis* sp.) en diferentes sistemas intensivos de granjas camaroneras como alternativa productiva del sector camaronicultor colombiano. Colciencias, Ceniagua, Acuacultivos el Guajaro, C.I. Agrosoledad S.A.

Sugita H, Chihiro M y Yoshiaki D. 1990. The vitamin B12- producing ability of intestinal bacteria isolated from tilapia and channel catfish. *Nippon Suisan Gakk* (56): 701–708 pp.

Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett Appl Microbiol.* (24): 105-108 pp..

Syvokienė, J. y Mickėnienė, L. 1998. Microorganisms of the digestive tract of hydrobionts as indicators of pollution. *ICES Symposium on Brackish Water Ecosystems*, Helsinki, 25-28 pp.

Sotomayor, M.A. y Balcázar, J.L. 2003. Inhibición de patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Aquatic*, 19 p.

Thin, N. Dieckers, K. Sorgeloos, P. y Bossier. 2007. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine biotechnology* (35): 1-12 pp.

Tseng, D. Ho, P. Huang, S. Cheng, S. Siu, Y- Ciu- C- y Liu, C. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology* (26): 339–344 pp.

Urgell, C. 2004. Análisis genómico y proteómico de los mecanismos de captación de hierro en *Aeromons mesófilas*. Tesis doctoral en biología. Facultad de biología. Departamento de microbiología. Universidad de Barcelona. España. 208 p.

Vasquez, C., Villanueva, M. y Rodríguez, H. 2001. Principales enfermedades de los peces en cultivo. En: Rodríguez, H., Daza, P. y Carrillo, M. *Fundamentos de Acuicultura Continental*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Bogotá. 283-299 pp.

Verschuere, L. Rombaur, G. Sogeloos, P. y Verstraete, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dec. 655-671 pp.

Villamil L, Tafalla C, Figueras A, Novoa B: 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin Diagn Lab Immunol*, 9:1318-1323.

Villamil, L., Figueras, A., Toranzo, AE., Planas, M. y Novoa. 2003a. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases* 26, 293–303 pp.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. y Novoa, B. 2003b. Control of *vibrio algynoliticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219, 43–56 pp.

Villamil, L. y Novoa, B. 2009. Probiotics in aquaculture. En: Perez-Guerra, N. *Biotechnology and applied Biochemistry – Review Book*. Ed. Transworld Research Network.

Vine, N. Toward the development of a protocol for the selection of probiotics in marine fish larviculture. 2004a. Tesis de doctorado. Rhodes university. 222 p.

Vine, N., Leukes, W. y Kaiser, H. 2004b. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *Microbiology Letters*. 231, 145-152 pp.

Vine, N., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya., S. Baxter, J. y Hecht, T. 2004c. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish diseases* 27, 319-326 pp.

Vine, N., Leukes, W. y Kaiser, H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30, 404–427 pp.

Wang, G. Clark, C. Iiu, C. Pucknell, C. Munro, C. Kruk, T. Caldeira, R. Woodward, D. yRodgers, F. 2003. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J. CLin. Microbiol.* 41 (3): 1048-1054 pp.

Wang, Y. 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): 283–292 pp.

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

Wang, Y. Li, J. Lin, J. 2008b. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* (281): 1-4 pp.

Wong, H. C. Chen, Y. L. 1988. Effects of Lactic Acid Bacteria and Organic Acids on Growth and Germination of *Bacillus cereus*. *Applied And Environmental Microbiology*, Sept., 2179-2184 pp.

Zar, J.H: 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth edition. Prentice Hall. 663 p.

12. COMPLEMENTARIOS

Juveniles de tilapia nilótica afectados por *V. alginoliticus*. Se evidencian síntomas de exoftalmia.

