

Identificación de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad probiótica del tracto gastrointestinal de tilapia roja en Antioquia

Ricardo García Naranjo

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Medellín, Colombia
2016

Identificación de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad probiótica del tracto gastrointestinal de tilapia roja en Antioquia

Ricardo García Naranjo

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Microbiología y Bioanálisis

Directora

Msc. cPhD Luz Adriana Gutiérrez Ramírez

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

Medellín, Colombia

2016

(A mi familia)

Alguno se estima atrevido, cuando con otros se compara. Algunos creo que hubo tan discretos que no acertaron a compararse sino a sí mismos.

Miguel de Cervantes (1547-1616).

Agradecimientos

A mi familia por apoyarme incondicionalmente siempre en todo lo que me he propuesto, sé que no fue fácil, pero hoy estamos acá diciendo ¡lo logramos!

A La Corporación Universitaria Lasallista, por permitirme formarme desde el pregrado en los valores lasallistas.

A profesora Luz Adriana Gutiérrez, por brindarme su conocimiento, su paciencia y su disposición para que este trabajo fuera un aprendizaje académico y personal.

Al profesor Carlos Arturo David Ruales, por creer en mí y en mis capacidades para embarcarme en este proyecto.

¡Mil gracias a todos!

Resumen

En el presente estudio se aislaron, caracterizaron y evaluaron cepas de bacterias lácticas y bacterias esporuladas con potencial probiótico a partir del tracto gastrointestinal de tilapia roja (*Oreochromis sp*). Se procesaron 40 muestras de tejido gastrointestinal en medios de cultivo selectivos para bacterias ácido lácticas (Agar M 17, Agar MRS) y para bacterias esporuladas (Agar Nutritivo). Entre las pruebas para evaluar la capacidad probiótica se determinó: tolerancia a pH ácido y alcalino (2,5 y 8,0), resistencia a la acción de las sales biliares (0.3 %), resistencia a un medio hipertónico (NaCl 2,5%), sobrevivencia a lisozima actividad hemolítica, actividad antibacteriana frente a cepas patógenas (*Aeromonas veronni*, *Streptococcus agalactiae*) y su sensibilidad a antibióticos (penicilina, cloranfenicol, ampicilina, ampicilina sulbactam, tetraciclina, eritromicina, y amoxicilina), para luego ser identificadas por pruebas bioquímicas e identificación molecular. Se obtuvieron 3 cepas de bacterias ácido lácticas y 3 cepas de *Bacillus sp.* con actividad probióticas.

Palabras clave: tilapia, probióticos, bacterias ácido lácticas, *Bacillus Sp*: PCR

Abstract

In the present study were isolated, characterized and evaluated acid - lactic bacteria and spore-forming bacteria with probiotic potential from the gastrointestinal tract of red tilapia (*Oreochromis sp*).

40 gastrointestinal tissue samples were processed in selective culture media for lactic acid bacteria (Agar M 17, Agar MRS) and sporulated bacteria (Nutrient Agar). The following tests were conducted to determine their probiotic potential, tolerance acid and alkaline pH (2.5 and 8.0), resistance to the action of bile salts (0.3%), resistance to hypertonic medium (NaCl 2.5 %), survival lysozyme hemolytic activity, antibacterial activity against pathogenic strains (*Aeromonas veronii*, *Streptococcus agalactiae*) and the sensitivity to antibiotics (penicillin, chloramphenicol, ampicillin, ampicillin sulbactam, tetracycline, erythromycin, and amoxicillin) to finally be identified by biochemical tests and molecular identification.

3 lactic acid bacteria and 3 *Bacillus sp* were obtained with probiotic activity

Keywords: tilapia, probiotics, lactic acid bacteria, *Bacillus Sp*: PCR

Contenido

Pág.

Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
Hipótesis.....	4
Objetivos.....	5
1. Marco teórico.....	6
1.1 Estado actual de la acuicultura a nivel mundial.....	6
1.2 Estado actual de la acuicultura en Colombia	7
1.3 Características de la tilapia (<i>Oreochromis sp</i>).....	8
1.4 El sistema digestivo de los peces	9
1.5 Microbiota intestinal de los peces	10
1.6 Inocuidad en la producción piscícola	12
1.7 El uso de antibióticos como método de control de enfermedades infecciosas en acuicultura.....	13
1.8 Los probióticos como solución	14
1.9 Mecanismo de acción de los probióticos.....	17
1.10 Métodos de selección de un microorganismo probiótico	18
2. Aislamiento de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas del tracto gastrointestinal de tilapia roja (<i>Oreochromis sp</i>).....	19
2.1 Materiales y métodos.....	19
2.1.1 Aislamiento de bacterias	19
2.1.2 Actividad hemolítica	21
2.2 Resultados.....	22
2.2.1 Caracterización morfológica.....	22
2.2.2 Actividad hemolítica	23
2.3 Discusión:	23
3. Evaluación de la actividad probiótica, de los aislados de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas.....	26
3.1 Materiales y métodos.....	26
3.1.1 Resistencia a pH, sales biliares NaCl y lisozima	26
3.1.2 Sensibilidad a los antibióticos.....	27

XII Caracterización de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad probiótica del tracto gastrointestinal de tilapia roja en Antioquia

3.1.3	Efecto antimicrobiano	28
3.2	Resultados	28
3.2.1	Pruebas para determinación de actividad probiótica:	28
3.2.2	Cinética de crecimiento de los aislados probióticos	30
3.2.3	Sensibilidad a antibióticos:.....	34
3.2.4	Pruebas Bactericidas:.....	35
3.3	Discusión.....	36
4.	Identificación de los microorganismos aislados.....	39
4.1	Materiales y métodos.	40
4.2	Resultados.	40
4.3	Discusión.....	43
5.	Conclusiones y recomendaciones	45
5.1	Conclusiones.....	45
5.2	Recomendaciones.....	45
A.	Anexo1: Protocolo de identificación bioquímica de bacterias esporuladas (manual del Bergey).....	47
B.	. Anexo 2: protocolo de extracción de DNA.....	48
C.	Anexo 3: Protocolo gel de agarosa	49
D.	Anexo 4: Protocolo PCR.....	50
E.	Anexo 5: Publicaciones derivadas de la investigación.....	51
	Bibliografía	55

Lista de figuras

Imagen 1.1 Sistema digestivo de los peces, tomado de NYSDEC, 2013.....	10
Imagen 2.1 Tilapia en estado juvenil y la porción media del intestino	20
Imagen 2.2 colonias de bacilos esporulados en cajas de agar nutritivo.	22
Imagen 2.3 Bacilos gram positivos, esporulados en aumento 100x.....	22
Imagen 2.4 colonias de BAL en cajas de agar MRS	22
Imagen 2.5 Cocos gram positivos en cadena en aumento 100x.....	22
Imagen 2.7 α -hemólisis en caja de agar sangre, halo verdoso alrededor de la colonia ..	23
Imagen 2.6 γ -hemólisis en caja de agar sangre.....	23
Imagen 4.2 Electroforesis luego de realizar la extracción de DNA.....	41
Imagen 4.3 PCR de los microorganismos aislados, la muestra fue coloreada con EZ vision	41
Imagen 4.4 Árbol filogenético BAL 0018 Y 0019.....	42

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1.1 Principales grupos de probióticos considerados como agentes de control biológico en cultivos de peces (adaptada de Wang, et al., 2008)	16
Tabla 2.1 Tipos de hemolisis en placas de agar sangre	21
Tabla 4.1 Género y especie de los microorganismos aislados	42

Introducción

La FAO define acuicultura como: Cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción y la propiedad individual o empresarial del stock cultivado(FAO, 2011). En forma global el término acuicultura reúne a todas aquellas acciones que tienen por objeto la producción, el crecimiento y comercialización de organismos acuáticos animales o vegetales de aguas dulces, salobres o saladas(Bocek, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - Departamento de Acuicultura de Uruguay, & FAO, 2010). La acuicultura implica el control de las diferentes etapas de desarrollo hasta la cosecha, proporcionando a los organismos los medios adecuados para su crecimiento y engorde(Bocek et al., 2010)

La producción pesquera mundial ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de peces comestibles se ha incrementado a una tasa media anual del 3,2 %, (Bocek et al., 2010) .El consumo aparente mundial de pescado per capita aumentó de un promedio de 9,9 kg en el decenio de 1960 a 19,2 Kg en 2012, este incremento notable se ha debido a una combinación de crecimiento demográfico, aumento de los ingresos y urbanización, y se ha visto propiciado por la fuerte expansión de la producción pesquera y la mayor eficacia de los canales de distribución(FAO, 2014). China ha sido responsable de la mayor parte del aumento de la disponibilidad de pescado, como consecuencia de la expansión de su producción pesquera, especialmente de la acuicultura (Agricultura & Medio, 2015)

Colombia es un territorio que favorece el desarrollo de la acuicultura debido a los recursos hídricos, su práctica es relativamente nueva, a mediados de la década de los 80, se iniciaron procesos encaminados a formar empresas acuícolas, primero en el cultivo de camarón y después con la piscicultura comercial de especies foráneas como la carpa, la tilapia y la trucha y sólo una nativa, la cachama (Gasto,

2015) Es importante resaltar que la mayor parte de la producción piscícola del país está concentrada en dos especies exóticas: la tilapia y la trucha, siendo la tilapia la que muestra una mayor dinámica en producción y participación en el mercado, ubicándose principalmente en la zona Andina, con una presencia relativamente baja en las zonas de la Orinoquia, Caribe y Pacífica (Gasto, 2015). La tilapia posee propiedades importantes para la producción masiva, crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación a cautiverio, y aceptación de una amplia gama de alimentos; además de contar con algunos atributos para el mercado, como: carne blanca de buena calidad, buen sabor, poca espina, buena talla y precio accesible (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - Departamento de Acuicultura de Uruguay, 2010).

Con la creciente intensificación y comercialización de la producción acuícola a nivel nacional y local, aparecen enfermedades e infecciones que se convierten en un problema para el cultivo de muchas especies acuáticas (Qi, Zhang, Boon, & Bossier, 2009), para contrarrestar este problema los productores a nivel mundial han optado por el uso de antibióticos; sin embargo el uso indiscriminado de los mismos desequilibra la microbiota gastrointestinal, aumentando el riesgo a contraer enfermedades (Qi et al., 2009) y el desarrollo de genes de resistencia antibiótica en algunos microorganismos, transmitiéndose de forma horizontal a la descendencia. (Qi et al., 2009). Una alternativa para contrarrestar el impacto negativo de los antibióticos y fomentar procesos productivos limpios, es el uso de los probióticos. La FAO y la OMS (Organización Mundial de la Salud) definen a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del consumidor (FAO & OMS, 2006) (S. K. Nayak, 2010) Los probióticos se han comenzado a incorporar dentro de las matrices alimentarias, ya que se ha evidenciado que estos aportan efectos saludables en el cuerpo, como producción de metabolitos que generan antagonismo contra los patógenos (Tinh et al., 2007), estimulación del sistema inmune (S. K. Nayak, 2010) protegen la mucosa intestinal (Ringø et al., 2010), suplementos digestivos que favorecen la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal (Kesarcodi-Watson, Kaspar, Lategan, & Gibson, 2008). En muchas

ocasiones, estos microorganismos son utilizados como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolácticos (Carmen et al., 2011).

Un microorganismo probiótico, debe resistir las condiciones ambientales que se encuentran a través del tracto gastrointestinal, para ello, se han establecido diferentes pruebas que están basadas en las condiciones ambientales que los microorganismos deben tolerar a través de su paso por el tracto gastrointestinal y su capacidad de permanecer en el intestino grueso.

En el presente trabajo se aislaron bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas del tracto gastrointestinal de tilapia roja, y se evaluaron para determinar su acción probiótica.

Hipótesis

Ha: Se encuentran bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad con actividad probiótica en el tracto gastrointestinal de tilapia roja.

Ho: No se encuentran bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad con actividad probiótica en el tracto gastrointestinal de tilapia roja.

Objetivos

Objetivo general:

Aislar e identificar bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad probiótica del tracto gastrointestinal de tilapia roja.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas del tracto gastrointestinal de tilapia roja.
2. Evaluar la actividad probiótica, por medio de pruebas de desempeño (resistencia a: pH ácido y alcalino, sales biliares, lizosima y NaCl 3,5%), susceptibilidad a antibióticos y efecto bactericida, los aislados de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas.
3. Identificar por medio de técnicas bioquímicas y moleculares género y especie de los microorganismos seleccionados como posibles probióticos.

1.Marco teórico.

1.1 Estado actual de la acuicultura a nivel mundial

La acuicultura es el conjunto de actividades tecnológicas orientadas al cultivo o crianza de especies acuáticas desde su ciclo biológico completo o parcial hasta la comercialización; realizándose en un medio seleccionado y controlado en ambientes hídricos naturales o artificiales, tanto en aguas marinas, dulces o salobres (Bocek et al., 2010). En la acuicultura, se incluyen las actividades de poblamiento o siembra y repoblamiento o resiembra, así como las actividades de investigación y el procesamiento primario de los productos generados en dicha actividad (Bocek et al., 2010), la acuicultura presenta ciertas ventajas significativas con respecto a la pesca tradicional: la producción se efectúa en forma controlada, obteniéndose productos de mayor calidad, con posibles cosechas parciales y una llegada continua al mercado, lográndose un aprovechamiento sustentable y económicamente apto para el productor.(Bocker, 2007)

A nivel mundial, la acuicultura se ha convertido en una importante industria proveedora de alimentos de alto valor nutricional y generadora de empleo e ingresos en los países tanto desarrollados así como en los que se encuentran en vía de desarrollo (Cochrane, De Young, Soto, & Bahri, 2012), la pesca y la acuicultura, desempeñan funciones fundamentales en el suministro de alimentos, en la seguridad alimentaria y en la generación de ingresos. Unos 43,5 millones de personas trabajan directamente en el sector pesquero y la gran mayoría de ellas viven en países en desarrollo (Cochrane et al., 2012). Sumándose a esta cifra las personas que intervienen en las industrias afines de elaboración, comercialización, distribución y suministro. El sector sostiene la subsistencia de cerca de 200 millones de personas.(Cochrane et al., 2012)

Según cifras de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura) el suministro mundial de alimentos pesqueros ha aumentado considerablemente en las cinco últimas décadas, con una tasa media de crecimiento del 3,2 por ciento anual en el período de 1961 - 2009, siendo China el

responsable de la mayor parte del incremento registrado en el consumo mundial de pescado per cápita, debido al considerable aumento de su producción pesquera, en particular de la acuicultura (Villamil & Angélica, 2009). Por su parte, Latino América y el Caribe experimentaron el crecimiento más acelerado de la actividad en los últimos años, con una expansión mayor al 20% anual (Bocek et al., 2010) lo que contribuye con un 2.3% de la producción acuícola global. Los países que aportan la mayor producción en la región son Chile, Brasil, México y Ecuador respectivamente(Bocek et al., 2010).

1.2 Estado actual de la acuicultura en Colombia

Colombia es un territorio que favorece positivamente el desarrollo de la acuicultura debido a que es un país tropical con temperaturas estables, posee todos los pisos térmicos y una vasta red fluvial que recorre todo el país. Tiene una superficie continental de 1 441 748 km² y posee costas sobre el océano Pacífico (1 300 KM) y el océano Atlántico (1 600 KM). Cuenta con una gran cantidad de cuencas hidrográficas que lo posicionan en un lugar destacado en recursos hídricos en el mundo. Posee una de las mayores diversidades de peces del planeta y una alta biodiversidad de organismos hidrobiológicos, al igual que aguas dulces, salobres y marinas y terrenos aptos que le otorgan un gran potencial para el desarrollo de la acuicultura.(Gasto, 2015), sin embargo; su práctica en el país es relativamente nueva, a mediados de la década de los 80, se iniciaron procesos encaminados a formar empresas acuícolas, primero en el cultivo de camarón y después con la piscicultura comercial de especies foráneas como la carpa, la tilapia y la trucha y sólo una nativa, la cachama (Franco & Pelaez, 2007). Para el año 2011 la producción pesquera total fue 162.815 toneladas, de las cuales, la acuicultura aportó el 51,4%. La tendencia de crecimiento de la actividad de la acuicultura en el periodo 1985-2011 es muy positiva (20,44% anual promedio al pasar de 572 toneladas en 1985 a 83.680 toneladas en 2011) y, aun cuando el crecimiento es menor con respecto a otros países de Latinoamérica, supera ampliamente la tasa media de crecimiento del sector agropecuario y del conjunto total de la economía nacional (Gasto, 2015). Es importante resaltar que la mayor parte de la producción

piscícola del país está concentrada en dos especies exóticas: la tilapia y la trucha, siendo la tilapia la que muestra una mayor dinámica en producción y participación en el mercado, la producción de tilapia ha participado con el 49% de la actividad piscícola, mientras la cachama y la trucha han constituido el 31% y 16%, de manera respectiva. La producción de tilapia en el país se ubica principalmente en la zona Andina, con una presencia relativamente baja en las zonas de la Orinoquia, Caribe y Pacífica (Bash, 2015).

El cultivo en estanques de tilapia roja es el más frecuente en Colombia pues lo realizan desde pequeños hasta grandes cultivadores de los departamentos de Antioquia, Huila y Meta (Sagarpa & FUNPROVER, 2008).

1.3 Características de la tilapia (*Oreochromis* sp)

Las tilapias, como se les conoce a un grupo de peces de origen africano, habitan principalmente en regiones tropicales del mundo, donde existen las condiciones necesarias para su reproducción y crecimiento (Nitzan, Rozenberg, & Cnaani, 2016). Entre sus variedades destacan la Tilapia del nilo (*O. niloticus*), la Tilapia azul (*O. aureus*) y la Tilapia de Mozambique (*O. mossambicus*). La tilapia roja, pez que taxonómicamente no responde a un nombre científico, es el producto del cruce de cuatro especies de tilapia: tres de ellas de origen africano y una cuarta israelita; el cruce selectivo permitió la obtención de un pez cuya coloración fenotípica puede ir desde el rojo cereza hasta el albino, pasando por el animal con manchas negras o completamente negro (Acuña-Monsalve, 2013). El cultivo de tilapia roja requiere de temperatura entre los 24 y 30°C, alimentación con concentrado comercial, y protección especial en todas las etapas, por cuanto es vulnerable a la predación dado que carece de mimetismo natural (SAGARPA, 2012), sin embargo; la tilapia posee propiedades importantes para la producción masiva como son, crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación a cautiverio, y aceptación de una amplia gama de alimentos; además de contar con algunos atributos para el mercado, como: carne blanca de buena calidad, buen sabor, poca espina, buena talla y precio accesible (Sagarpa & FUNPROVER, 2008)

En la actualidad en el país, el departamento del Huila continúa liderando la producción de tilapia a nivel nacional. De acuerdo con la última información del INCODER, en el año 2002, la producción nacional alcanzó las 15.224 Tm, y de éstas, el Huila registró 6.909 Tm, es decir, el 45% del total. Otros departamentos de relativa importancia son Valle (8,5%), Santander (7,5%), Tolima (6,8%) y Boyacá (5%), cabe resaltar que Antioquia años atrás se consideraba como un departamento líder en la producción de tilapia en el país y actualmente ha pasado a registrar volúmenes marginales del cultivo de tilapia. De hecho, en el año 2002, solamente se obtuvo 241 Tm(Sagarpa & FUNPROVER, 2008)

1.4 El sistema digestivo de los peces

Los peces son animales vertebrados de sangre fría que respiran por branquias y utilizan las aletas para la locomoción. Los *Osteichthyes* (peces óseos) comparten varias características entre ellos, incluyendo: un esqueleto de huesos, escamas, aletas pares, un par de aberturas branquiales, las mandíbulas, y las fosas nasales pareadas. Esta clase contiene alrededor del 96% de todas las especies de peces. Los peces no incluidos en los *Osteichthyes* son los *condrictios* (tiburones y rayas), los *Myxini* (mixinos), y los *Cephalaspidomorphi* (lampreas)(NYSDEC, 2013). Su sistema digestivo dependerá del tipo de alimentación de cada especie. El tracto gastrointestinal tiene una forma tubular entre el píloro y el ano y se encuentra dividido en cuatro partes: ciegos pilóricos, intestino craneal, caudal y recto. Los ciegos pilóricos son proyecciones ciegas del tubo digestivo, sencillas o con ramificaciones, extendidas a partir del píloro del estómago o de la parte más craneal del intestino, la mucosa está provista de numerosos pliegues con glándulas secretoras de enzimas (lactasa, sacarasa, lipasa) que intervienen en la digestión de las grasas(Center & Marine, 2013). También se les atribuye un papel en la absorción de los alimentos ya digeridos, al ampliar la superficie del tracto intestinal(Mancini, 2002).Órganos tales como el hígado o el páncreas forman parte del aparato digestivo, teniendo funciones de favorecimiento de la digestión, por

ejemplo la regresión de bilis e incluso de generación de reservas como es el caso de formación de glucógeno (NYSDEC, 2013) (Imagen 1.1).

La mayor parte de las tilapias, poseen tendencia para hábitos alimenticios herbívoros. Las adaptaciones estructurales a este tipo de dieta, son principalmente un largo intestino largo muy plegado, dientes bicúspides o tricúspides sobre las mandíbulas y la presencia de dientes faríngeos, que utilizan para poder cortar y

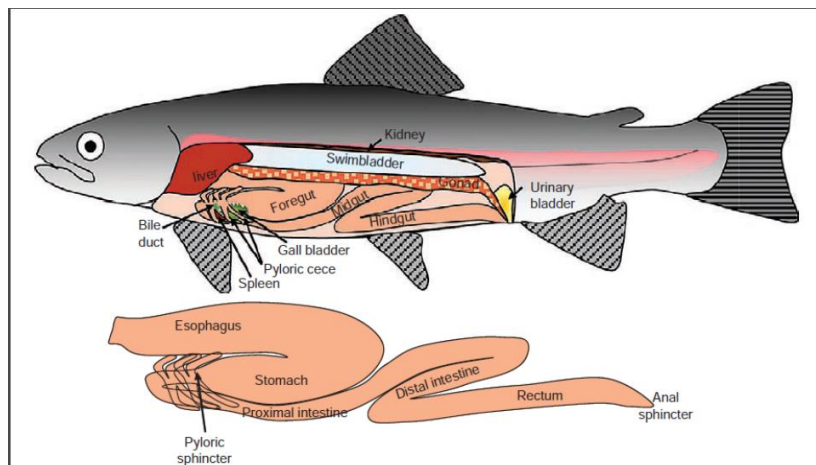


Imagen 1.1 Sistema digestivo de los peces, tomado de NYSDEC, 2013

rasgar plantas y hojas fibrosas (SAGARPA, 2012).

Con la creciente intensificación y comercialización de la producción acuícola a nivel nacional y local, aparecen enfermedades e infecciones que se convierten en un problema para el cultivo de muchas especies acuáticas (Qi et al., 2009).

1.5 Microbiota intestinal de los peces

Los animales acuáticos, incluyendo peces, están en contacto más íntimo con los microorganismos externos que los animales terrestres por lo tanto, la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) y las branquias se considera que es un reflejo de la composición de la microbiota del agua (Burr, Gatlin, & Ricke, 2005) (Al-Hisnawi, Mustafa, Yasser, Hussain, & Jabur, 2016) La microbiota del TGI de un organismo por lo general consiste en una comunidad diversa de bacterias no patógenas, patógenas y comensales que difiere entre especies de peces y entre las diferentes etapas de la vida de la misma especie (Sukanta K. Nayak, 2010).

En los peces se reconocen dos grupos distintos de microbiota, autóctonas (transitoria) y autóctona (adherentes). La microbiota autóctona, en virtud de su capacidad para tolerar el pH bajo en los jugos gástricos y de la resistencia a las acciones de los ácidos biliares, coloniza la superficie epitelial del estómago, intestino delgado y tienen la capacidad de unirse firmemente a la mucosa intestinal (Sukanta K. Nayak, 2010). El establecimiento de la microbiota en estados larvales y alevinos es un proceso muy complejo y en su mayoría dependen del tipo de peces, nutrientes / alimentos y las condiciones circundantes (Sukanta K. Nayak, 2010). La carga total de bacterias en la etapa larval es baja (aproximadamente 10^2 UFC) antes de la alimentación activa. Sin embargo, el número aumenta rápidamente ($>10^5$ UFC) (Sukanta K. Nayak, 2010). Además, la composición microbiana y la densidad también varían en diferentes regiones del tracto gastrointestinal de los peces en función de las condiciones físico-químicas del intestino. Levaduras y bacterias aerobias o anaerobias facultativas se han aislado en la mayoría de los peces como componentes esenciales de la microbiota intestinal (Navarrete, Espejo, & Romero, 2009). En los peces, se ha reportado a menudo un aumento progresivo de los niveles de bacterias cultivables desde el estómago hasta el intestino posterior encontrando bacterias viables en más alto porcentaje en la parte anterior y posterior del intestino que en el estómago (Sukanta K. Nayak, 2010).

1.6 Inocuidad en la producción piscícola

El término inocuidad, se define como la característica que tiene un producto al estar libre de cualquier sustancia o material extraño que represente un peligro para la salud de las personas (OMS, 2007). El control y eliminación de agentes peligrosos ya sean físicos, químicos o biológicos en los alimentos, se ha transformado en una preocupación importante a nivel mundial, y es en el proceso de producción, cosecha, distribución y venta (Sagarpa & FUNPROVER, 2008). La acuicultura, a pesar de tener mejores condiciones de control “sanitario” que la pesca silvestre, no está exenta de presentar algún peligro de contaminación química, física o biológica, pues existen factores internos y externos que vulneran la seguridad e inocuidad durante los diferentes eslabones en los procesos de producción y comercialización. Medicamentos veterinarios, infecciones patógenas, químicos utilizados para la producción y contaminación de las fuentes de agua (residuos industriales, coliformes fecales, basureros, animales, plagas, etc.), son factores que propician la aparición de enfermedades en los peces (Sagarpa & FUNPROVER, 2008).

La mayoría de infecciones en especies acuáticas son causadas por microorganismos de los géneros *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp. (ictiobacteriosis) y están implicadas en altas tasas de mortalidad especialmente de tilapia roja en el país. Ambos microorganismos son gram negativos, los *Vibrios* sp son microorganismos anaerobios facultativos y pertenecen a la familia *Vibrionaceae*. Las *Aeromonas* sp son bacilos cortos, aerobios facultativos, móviles y pertenecen a la familia *Aeromonaceae*; los miembros de este género producen varas exoenzimas como: proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, muchas de ellas consideradas factores de virulencia (Acosta-García & Aguilar-García, 2014).

Algunos de los signos y lesiones observados en animales infectados con cepas de los géneros *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp abarcan hemorragias difusas y necrosis de órganos internos (fundamentalmente aquellos filtradores de sangre como el riñón y el bazo), úlceras y hemorragias petequiales y equimosis en tegumento con

necrosis de las aletas, exoftalmia uni o bilateral y ascitis (Rodríguez Gutiérrez, Rodríguez Cázares, Monroy García, & Mata Sotres, 2001).

Otro género de bacteria que afecta notablemente a los peces es *el Streptococcus agalactiae*, el cual se ha llegado a considerar que es una de las enfermedades bacterianas más importantes en el cultivo de tilapia tropical marcadas por una alta morbilidad y mortalidad (Mian et al., 2009). Los síntomas descritos incluyen nadado en espiral o nadado errático, hemorragia periorbital e intraocular, la opacidad ocular y exoftalmos, enrojecimiento o hemorragia en el tegumento y sistemas musculoesqueléticos, ascitis y ulceración. Sin embargo, en algunos casos, los peces no pueden mostrar signos clínicos antes de la muerte. (Suanyuk, Kong, Ko, Gilbert, & Supamattaya, 2008)

1.7 El uso de antibióticos como método de control de enfermedades infecciosas en acuicultura.

La intensificación de la acuicultura ha aumentado el riesgo de enfermedades debido a las altas densidades poblacionales y a las tasas de alimentación que conducen a cambios adversos en la calidad del agua y el aumento de la incidencia de enfermedades. Los antibióticos, han sido la forma como se ha tratado de controlar la aparición de estas enfermedades; sin embargo su uso continuado desequilibra la microbiota gastrointestinal, (Labella et al., 2013) (Qi et al., 2009) y el desarrollo de genes de resistencia antibiótica en algunos microorganismos, transmitiéndose de forma horizontal a la descendencia. (Qi et al., 2009)(Heuer et al., 2009)

Algunos estudios revelan que ciertos genes de resistencia antibiótica que se han reportado en humanos, pueden tener su origen en microorganismos provenientes de explotaciones animales (Love, Rodman, Neff, & Nachman, 2011), de hecho en países del primer mundo como China, existe toda una política pública la cual establece un número limitado de antibióticos aprobados y los agentes quimioterapéuticos que se utilizan para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas en explotaciones acuáticas (Qi et al., 2009)(Love et al.,

2011), todo esto encaminado a disminuir la aparición de cepas resistentes que afecten la producción piscícola y puedan repercutir en alguna medida a la salud humana.

1.8 Los probióticos como solución

Una alternativa para contrarrestar el impacto negativo de los antibióticos y fomentar procesos productivos limpios, es el uso de los probióticos. La FAO y la OMS (Organización Mundial de la Salud) definen a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud del consumidor (FAO & OMS, 2006)

La mayoría de los probióticos propuestos para el uso en acuicultura pertenecen a las bacteria ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*), a los géneros *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp, principalmente como se expone en la tabla 1.1. Se ha reportado que el consumo de productos que contienen probióticos generan resultados similares a los obtenidos cuando se emplean los antimicrobianos (Córdoba, Chaves, & Arias, 2009).

Cepa probiótico	Fuente de microorganismo	Usos	Método de aplicación	Referencia
<i>Streptococcus lactis</i> and <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	No conocida	Larvas de Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Enriquecimiento de alimento vivo	García de la Banda et al. (1992)
<i>Lactobacillus</i> sp. and <i>Carnobacterium</i> sp.	Rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i>)	Larvas de Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Enriquecimiento de rotíferos	Gatesoupe (1994)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Granja comercial de camarones	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i> L.)	Baño en suspensión	Austin et al. (1995)

<i>Carnobacterium divergens</i>	Intestinos de salmón del atlántico	Alevinos de Cod del Atlantico	Adición a la dieta	Gildberg and Mikkelsen (1998)
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. licheniformis</i>	Producto comercial	Bagre del canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Adición a la dieta	Queiroz y Boyd (1998)
<i>Vibrio Pelagius</i>	Larvas de turbo	Turbot	Adición al agua	Ringø and Vadstein (1998)
G-Probiótico	Producto comercial	Tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Adición a la dieta	Naik et al. (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pez del hielo (Lates niloticus)	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Adición al agua	Gram et al. (1999)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103 Cultivo de colección	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Adición a la dieta	Nikoskelaiet al. (2001)
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Carnobacterium sp</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Tracto digestivo de Trucha arco iris	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Adición a la dieta	Irianto y Austin (2002)

<i>Bacillus circulans</i>	Intestinos de carpa rohu (Labeo rohita)	Carpa rohu	Adición a la dieta	Ghosh et al. (2004)
<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Producto comercial	<i>O. niloticus</i>	Adición a la dieta	Lara-Flores, et al. (2003)
<i>Enterococcus faecium</i>	Producto comercial	<i>O. niloticus</i>	Adición a la dieta	Wang, et al. (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Producto comercial	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Adición a la dieta	Ozorio, et al. (2010)
<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Producto comercial	carpa grass (<i>Ctenopharyngodon idella</i>),	Adición a la dieta	Wang (2010)

Tabla 1.1 Principales grupos de probióticos considerados como agentes de control biológico en cultivos de peces (adaptada de Wang, et al., 2008)

1.9 Mecanismo de acción de los probióticos

En la acuicultura, el rango de los probióticos evaluados para su uso es considerablemente más amplio que en la agricultura terrestre. Varios probióticos, en diferentes presentaciones, en una sola especie o en combinaciones múltiples están disponibles comercialmente para fines de acuicultura (S. K. Nayak, 2010).

Los microorganismos probióticos producen metabolitos que generan antagonismo contra los patógenos, estimulan el sistema inmune, protegen la mucosa intestinal (S. K. Nayak, 2010) (Kesarcodi-Watson et al., 2008), mejoran la calidad del agua (Boyd & Massaut, 1999), mejoran la alimentación de las especies de acogida a través de la producción de suplementos de enzimas digestivas (Dawood & Koshio, 2016) y favorecen la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

La FAO designó el uso de los probióticos como una alternativa importante para la mejora de la calidad del medio ambiente acuático. La mayoría de estudios a nivel mundial sobre los efectos de los probióticos en animales acuáticos cultivados han revelado una reducción en la mortalidad o la mejora de la resistencia contra los agentes patógenos oportunistas (FAO & OMS, 2006); por ejemplo, Grisez et al., (1996) reportan que cepas bacterianas asociadas a mucosa intestinal de turbot (*Scophthalmus maximus*), suprimen el crecimiento del patógeno *V. anguillarum* (Grisez, Chair, Sorgeloos, & Ollevier, 1996). En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), Balcázar, et al., (2007) reportaron un estudio sobre la presencia de un alto número de bacterias ácido lácticas del tipo *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* en poblaciones sanas después de presentarse una epidemia de furunculosis (Jose Luis Balcazar et al., 2007) . En otro estudio con Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), Aly, et al., (2008), reportan actividad probiótica de *Citrobacter freundii*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus firmus* contra *Aeromonas hydrophila* (Aly, Abd-El-Rahman, John, & Mohamed, 2008); por otro lado, algunas investigaciones sugieren que los microorganismos probióticos tienen efectos benéficos en los procesos digestivos y que estos efectos pueden verse reflejados en su desempeño y tasas de crecimiento; Lara-Flores, et al., (2003),

aseguran que una mezcla de *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, mejoran el desempeño y las tasas de crecimiento en *O. niloticus* (Lara-Flores, Olvera-Novoa, Guzman-Mendez, & Lopez-Madrid, 2003), similares hallazgos reporta Wang et al., (2008) en una investigación con la misma especie usando la bacteria *Enterococcus faecium*, donde la adición en la dieta de la bacteria mejoró significativamente la ganancia de peso diaria y final en comparación con la dieta sin el probiótico. Una investigación con juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), reemplazando hasta un 50% de la proteína (harina de pescado) por *Saccharomyces cerevisiae*, logró mejorar el desempeño y la utilización del alimento en comparación con la dieta sin inclusión de *S. cerevisiae*, (Watanabe, Viegas, & Gonçalves, 2010). Wang, (2011), reporta un incremento significativo en la ganancia de peso diaria y final, además de un incremento en la actividad proteasa y celulasa en alevinos de la carpa grass (*Ctenopharyngodon idella*), alimentados con dietas que incluían *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Lactobacillus acidophilus*.(Wang, 2011)

1.10 Métodos de selección de un microorganismo probiótico

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico y pueda ser administrado en la dieta de un organismo, se debe evaluar la capacidad de resistencia que estos presentan frente a diferentes pruebas que están basadas en las condiciones ambientales que los microorganismos deben tolerar a través de su paso por el tracto gastrointestinal y su capacidad de permanecer en el intestino grueso, además las cepas susceptibles a caracterizarse como probióticos deben poseer características de seguridad como son la sensibilidad antibiótica y la no producción de hemolisinas(Mohapatra, Chakraborty, Kumar, Deboeck, & Mohanta, 2013).

2. Aislamiento de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas del tracto gastrointestinal de tilapia roja (*Oreochromis* sp)

Todos los organismos multicelulares viven en estrecha asociación con los microorganismos del medio ambiente y la mayoría de los organismos vivos son centro de grandes asociaciones microbianas. El conjunto de microorganismos que viven en coexistencia pacífica y armoniosa con sus hospedadores se ha referido como la microbiota (Lazado, Caipang, & Estante, 2015). Muchas especies de microorganismos hacen parte de la microbiota intestinal de los peces, de los cuales algunos géneros han sido utilizados como probióticos. Los probióticos comúnmente utilizados en la acuicultura pertenecen a los géneros *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Vibrio* sp., *Saccharomyces* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus subtilis* y *Bacillus* sp (S. K. Nayak, 2010)(Apun-Molina, Santamaria- Miranda, Luna-Gonzalez, Martinez-Diaz, & Rojas-Contreras, 2009)

2.1 Materiales y métodos

Área de estudio: Tilapias en estado juvenil

Todos los análisis experimentales se realizaron en el laboratorio de microbiología industrial de la Corporación Universitaria Lasallista.

2.1.1 Aislamiento de bacterias

Se tomaron 40 muestras de tejido gastrointestinal de tilapias, suministradas por la estación piscícola Doradal (Puerto triunfo, Antioquia), Se sacrificaron mediante choque térmico tilapias en estado juvenil, de cualquier sexo con una talla de 8 a 10

cm de largo y un peso de 10 g y por disección aséptica se extrajo el tracto gastrointestinal, el cual se dividió en tres porciones y tomándose para el aislamiento la porción media del intestino (Imagen 2.1).



Imagen 2.1 Tilapia en estado juvenil y la porción media del intestino

El intestino fue lavado varias veces con solución salina estéril y luego macerado con el fin de recuperar la mayor cantidad de microorganismos adheridos a la mucosa. De la solución obtenida se tomó 1 mL y se adicionó en 9 mL de agua peptonada estéril (dilución 10^{-1}), de esta dilución 10^{-1} se tomó 1 mL y se llevó a un tubo con 9 mL de agua peptonada estéril (dilución 10^{-2}). La dilución 10^{-1} se calentó a 80°C durante 10 minutos con el propósito de que solo bacterias esporuladas resistieran a estas condiciones y posterior a esto se inoculó 0,1 mL en agar nutritivo (Merck) llevándose a incubación a 37°C durante 24 horas. De la dilución 10^{-2} se tomó 0,1 mL y se inoculó por siembra en superficie en agares selectivos para bacterias ácido lácticas como Man, Rogosa y Sharpe, MRS (Merck) y agar M17 (Merck) llevándose a incubación en durante 48 horas a 37°C /anaeróticamente. A las colonias presuntivas para bacilos esporulados y bacterias lácticas se les realizó tinción de gram y pruebas de oxidasa y catalasa, como método de identificación preliminar, seleccionándose solamente bacterias gram positivas, catalasa y oxidasa negativas para el caso de BAL y bacterias gram positivas, con presencia de endosporo, catalasa positiva, oxidasa negativa para el caso de bacterias esporuladas. Las colonias que cumplían estas características fueron purificadas en agares selectivos, con el fin de obtener cultivos puros.

Una vez purificadas las cepas, los microorganismos fueron criopreservados en glicerol al 10% v/v a -80°C según el protocolo descrito por Leal y colaboradores en 2005.(Leal & Ramírez, 2005) (Consuelo, Leal, Constanza, & Ramírez, n.d.) Los aislados correspondientes a bacilos esporulados se denominaron así: 16, 15, 17,19, 07B, 10,6A, 14, 6B, 4, 13, 18; y las bacterias ácido lácticas como 019BL, 018BL, 008BL.

2.1.2 Actividad hemolítica

Para determinar el carácter virulento de los aislados se determinó la actividad hemolítica de estos mediante la siembra en superficie en placas de agar sangre, inoculando 100 μL de una concentración de 1×10^8 bacterias/ml (por patrón de turbidez de Mcfarland) incubándose a 37°C por 24 horas (Velez Zea, 2014), posterior a este tiempo se determinó si producían hemólisis o no, tomando como referencia la tabla 2.1, que se muestra a continuación, sólo los microorganismos no productores de hemólisis fueron incluidos dentro de este estudio.

β - Hemólisis	Lisis completa de los glóbulos rojos Halo transparente alrededor de la colonia
α - Hemólisis	Lisis parcial de los glóbulos rojos Se abren poros en la membrana Salida de hemoglobina al medio Oxidación del grupo hemo. Formación de biliverdina (color verdoso) Halo verdoso alrededor de la colonia
γ -Hemólisis	No se presenta hemólisis.

Tabla 2.1 Tipos de hemólisis en placas de agar sangre

2.2 Resultados

2.2.1 Caracterización morfológica.

De las 40 muestras procesadas se obtuvieron alrededor de 200 aislados, 85% de ellos correspondieron a bacterias esporuladas y el 15% a bacterias lácticas .

Bacillus sp.: Macroscópicamente en cajas de Agar Nutritivo se observaron colonias redondas, lisas, de borde irregular consistencia cremosa tal cual como se observa en la imagen 2.2. En la caracterización microscopica se observaron bacilos Gram positivos, con bordes redondeados, y presencia de endosporo tal y como se observa en la imagen 2.3



Imagen 2.2 colonias de bacilos esporulados en cajas de agar nutritivo.

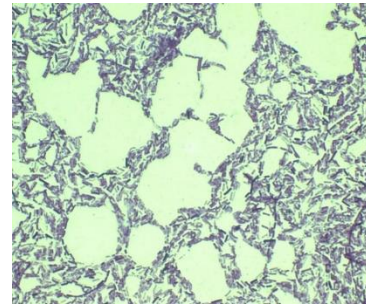


Imagen 2.3 Bacilos gram positivos, esporulados en aumento 100x

Bacterias ácido lácticas: Para la caracterización morfológica de bacterias ácido lácticas en las cajas de agar MRS se observaron colonias pequeñas, puntiformes y de bordes enteros como se puede observar en la imagen 2.3. En la caracterización microscopica se encontraron cocos y bacilos Gram positivos, no esporulados imagen 2.4.

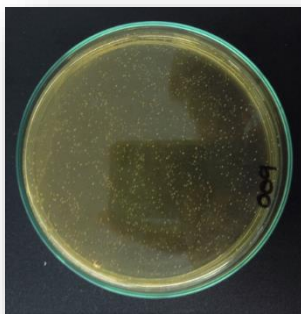


Imagen 2.4 colonias de BAL en cajas de agar MRS

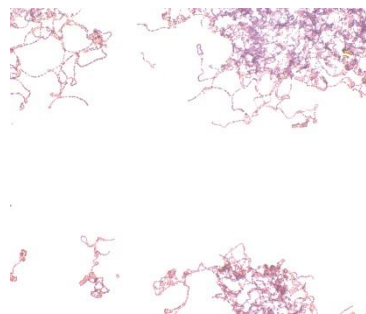


Imagen 2.5 Cocos gram positivos en cadena en aumento 100x

2.2.2 Actividad hemolítica

Los microorganismos que presentaron γ -hemólisis (imagen 2.6) fueron seleccionados como cepas libres de hemolisinas debido a que en el agar sangre no se observó ningún halo transparente alrededor de la línea de inoculación y las cepas puras que presentaron α y β hemólisis fueron descartadas del estudio, ya que para efecto de este trabajo, los microorganismos susceptibles a caracterizarse como probióticos no deben presentar hemolisinas. La presencia de hemólisis fue un factor determinante ya que aproximadamente el 50% de los microorganismos aislados salieron del estudio por presencia de hemólisis in vitro.



Imagen 2.7 γ -hemólisis en caja de agar sangre

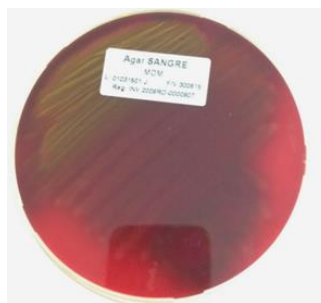


Imagen 2.6 α -hemólisis en caja de agar sangre, halo verdoso alrededor de la

2.3 Discusión:

En este estudio se recuperaron mayor cantidad de bacterias de esporuladas que de bacterias ácido lácticas esto debido a que en el tracto gastrointestinal de los peces las condiciones de temperatura y humedad son diferentes a lo de organismos superiores, como es el caso de los mamíferos, permitiendo que bacterias más resistentes sobrevivan a estas condiciones, Al-Hisnaw *et al* en 2016 determinaron la microbiota presente en el TGI y las branquias de *Liopropoma santi*, reportando que existe una mayor presencia de bacterias aerobias en el TGI que en las branquias y, que en el TGI la mayor cantidad de bacterias aerobicas se encuentran en la proción anterior del tracto(Al-Hisnawi et al., 2016).

La temperatura fue un factor determinante para el aislamiento de bacterias esporuladas (*Bacillus* sp), ya que su condición esporulada les confiere resistencia a las condiciones adversas, este tipo de microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a cambios bruscos de temperatura, y para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas (Calvo, 2010), que les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente hostil (Petersohn et al., 2001).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos auxotrofos, mesófilos, característica que limita su presencia en el intestino de los peces, puesto que las condiciones al interior del tracto gastrointestinal (temperatura y pH) no son las condiciones más aptas para el crecimiento de este tipo de microorganismos. Los microorganismos aislados en esta investigación, confirman lo reportado por Martínez y colaboradores en 2012 que sostienen que la población más abundante de bacterias con actividad probiótica aisladas de intestino de peces provienen del género *Bacillus* sp, mientras que las bacterias ácido lácticas son relativamente escasas, esto posiblemente se deba a las condiciones fisiológicas propias de los peces, entre ellas, el hecho de que sean poiquioterms, lo cual promueve la aparición de microorganismos más resistentes a los cambios de temperatura como los esporulados, situación que no es igual para las bacterias lácticas, que necesitan temperaturas más altas y estables como las mesófilas y termófilas (Martinez Cruz, Ibanez, Monroy Hermosillo, & Ramirez Saad, 2012) esto explica el porqué de los pocos aislamientos de BAL realizados, ya que las BAL son microorganismos mucho más exigentes, fisiológicamente hablando, que las bacterias esporuladas y requieren condiciones de oxígeno, y de nutrientes que no se encuentran fácilmente en el agua.

Un factor de selección inicial para continuar con los análisis para probióticos fue la generación de hemolisinas (FAO/ WHO, 2002), Un microorganismo que se considere candidato a probiótico no puede presentar factores que alteren la seguridad de los alimentos, como es la presencia de hemolisinas. Los microorganismos aislados en este trabajo que presentaron α y β hemólisis fueron

descartados del estudio, ya que según lo propuesto por Jeong en 2015 los microorganismos probióticos que exhiben α y β hemolisinas (exotoxinas) como estreptolisina, causan la lisis completa de los eritrocitos a través de la degradación de esfingomielinas (Jeong & Lee, 2015) (Velez Zea, 2014)

3.Evaluación de la actividad probiótica, de los aislados de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas.

Los microorganismos susceptibles a caracterizarse como probióticos deben resistir a las barreras naturales que el cuerpo le pone a estos microorganismos (enzimas, pH, sales biliares, medios hipertónicos) un microorganismo probiótico debe resistir a estas pruebas ya que en el momento de ser administradas a los animales deben llegar en una concentración adecuada al intestino(Velez Zea, 2014). En acuicultura, existen varios criterios que deben ser considerados al momento de elegir la cepa probiótica apropiada. Las características a tener en cuenta son las siguientes: origen del hospedero, la seguridad de la cepa, la producción de sustancias antimicrobianas, capacidad para modular la respuesta inmune del huésped o la competencia eficiente con patógenos para los sitios de adhesión de la mucosa intestinal.(Perez-Sanchez, Ruiz-Zarzuela, de Blas, & Balcazar, 2014). En el siguiente capítulo se realizaron pruebas in vitro, mediante el uso de espectrofotometría, para caracterizar los aislados como probióticos estas pruebas incluyeron: capacidad de resistir a pH (ácido y alcalino), sales biliares 0,3%, NaCl 3.5% y lisozima, para luego, determinar su actividad bactericida frente a microorganismos patógenos y evaluar su resistencia a antibióticos.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Resistencia a pH, sales biliares NaCl y lisozima

Las enzimas digestivas se encuentran a lo largo del TGI, tienen como función la destrucción de enlaces de los alimentos, y poseen función bactericida ya que destruyen el peptidoglucano de las bacterias (Abergel et al., 2007). La lisozima presente en la saliva protege frente a una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos (CARRILLO, 2013). El pH del estómago es de 2.5, para la mayoría de organismos superiores; la evaluación a este pH incluye la viabilidad

que la cepa bacteriana presenta en llegar viva al intestino,. estas pruebas incluyen rangos de pH que van de 1 a 8, los microorganismos probioticos deben sobrevivir a la acidez gástrica, que se presenta por la secreción de jugos gástricos como mecanismo de defensa del estómago hacia la mayoría de los microorganismos ingeridos, esta prueba está dirigida a determinar el grado de tolerancia a la acidez que presentan diferentes bacterias probióticas(Collado Amores, 2004). Las sales biliares se liberan al intestino delgado y son las encargadas de emulsificar las grasas, un microorganismo probiótico debe resistir a la acción que ejercen las sales biliares en intestino, para evaluar este efecto fueron inoculados en microplatos de ELISA de 300 (uL) 150uL del caldo selectivo para cada aislado a una concentración de 1×10^6 UFC/mL y 150µL de los analitos específicos, sales biliares 0,3%p/v, pH 2,5 y 8,5, NaCl 2%p/v y Lisozima 0,5UI, las condiciones de incubación incluyeron, incubación a 37°C y agitación constante durante 4 horas. Las medidas de absorbancia se realizaban al iniciar el ensayo tiempo 0 y al finalizar las cuatro horas, tiempo 1. Transcurrido este tiempo se tabularon los resultados presentados por el espectrofotómetro en términos de absorbancia. Solo a las cepas que presentaron los mejores perfiles se les evaluó la cinetica de crecimiento durante 16 horas, tomando medidas cada 2 horas, para evaluar el nivel de recuperación de los microorganismos.

El diseño estadístico empleado para los análisis fue diseño por bloques completamente aleatorizados y se realizó mediante el programa Stratgraphics centurión con licencia para la Corporación Universitaria Lasallista.

3.1.2 Sensibilidad a los antibióticos

Se empleó la prueba de difusión agar con sensidiscos (Becton Dickinson, BBL) de antibióticos. Las cepas fueron activadas previamente en caldos selectivos para BAL y *Bacillus* sp. y se incubaron a 37 °C por 24 h y luego se determinó el diámetro de inhibición en milímetros (mm)(Abreu-Abreu, 2012) (Cueto-vigil, Acuña-Monsalve, & Valenzuela, 2010).

Se usaron los siguientes antibióticos: penicilina, cloranfenicol, ampicilina, ampicilina sulbactam, tetraciclina, eritromicina, y amoxicilina (Cueto-vigil et al., 2010).

3.1.3 Efecto antimicrobiano

Se determinó el efecto antimicrobiano que tienen las cepas de BAL y *Bacillus* sp, mediante la técnica de difusión en agar, frente a 2 cepas patógenas que causan altas tasas de mortalidad en peces *Aeromona veronii* (aislada de una lesión ulcerada y hemorrágica de tilapia en estado juvenil) y *Streptococcus agalactiae*, (cepa proporcionada por la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín). Los microorganismos probióticos se reactivaron en caldo para bacterias esporuladas (caldo nutritivo) y para bacterias lácticas (caldo MRS y M17). Luego del período de incubación se centrifugaron a 6.000 rpm durante 15 minutos, los sobrenadantes libres de células se emplearon en el ensayo antimicrobiano. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se inocularon en sensidiscos estériles mediante la técnica ensayo doble capa, y se mantuvieron a 8°C durante 1h y luego se incubaron a 37°C durante 24 horas (Muñoz-Atienza et al., 2014).

3.2 Resultados

3.2.1 Pruebas para determinación de actividad probiótica:

Del total de aislados correspondientes solo 12 aislados de bacilos esporulados y 3 de bacterias lácticas soportaron todas las pruebas probióticas.

Los microorganismos se sometieron a análisis de varianza para comparar la resistencia de estos a cada una de las variables. Los microorganismos del estudio tienen comportamientos fisiológicos diferentes, por tanto los análisis se realizaron de forma independiente para cada género de microorganismos. Los resultados para bacilos esporulados y BAL son mostrados en las tablas 6.1 y 6.2, en donde se puede apreciar que hubo diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de los microorganismos a las variables expuestas $p < 0,05$.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2,49816	16	0,156135	4,06	0,0001
Residuo	1,99743	52	0,0384121		
Total (Corr.)	4,49559	68			

Tabla 3.1 Bacilos esporulados frente a los analitos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,39228	6	0,232047	25,66	0,0000
Residuo	0,208014	23	0,00904407		
Total (Corr.)	1,60029	29			

Tabla 3.2 BAL frente a los analitos

Para establecer la homogeneidad entre las cepas aisladas, se realizó análisis de comparación de medias, encontrando que no hubo homogeneidad de los aislados 0013, 006B y 0018 con respecto a los demás grupos para el caso de bacterias esporuladas. Los 3 aislados de BAL (0018, 008, 0019) no presentaron homogeneidad entre ellos. Tablas 3.3 y 3.4.

<i>Aislamiento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
16	0,267547	0,0637239	X
17	0,311947	0,0637239	X
15	0,340347	0,0637239	XX
19	0,399947	0,0637239	XXX
14	0,417833	0,0575771	XXX
10	0,4185	0,0575771	XXX
4	0,42375	0,0575771	XXX
07B	0,482443	0,0535597	XX
6A	0,505	0,0575771	XX
13	0,54625	0,0575771	X
6B	0,547667	0,0575771	X
18	0,739167	0,0575771	X

Tabla 3.3 análisis de comparación de medias de los aislados de bacilos esporulados

<i>Bacteria láctica</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
18BL	10	0,2419	0,0300734	X
8BL	10	0,4047	0,0300734	X

19BL	10	0,7361	0,0300734	X
------	----	--------	-----------	---

Tabla 3.4 Análisis de comparación de medias de los aislados de bacterias lácticas

Una vez se tuvieron todos los resultados se seleccionaron los aislados con los mejores perfiles en las pruebas de desempeño, seleccionando las cepas 0013, 006B, 0018 de *Bacillus* sp y las cepas 0018, 008 y 0019 de BAL

3.2.2 Curvas de crecimiento de los aislados probióticos

Los 3 tres mejores aislados de bacilos esporulados correspondiente a los microorganismos 0013, 0018 y 006B presentaron comportamientos similares en cuanto a la acidez, variable en la cual, las bacterias mostraron una curva de crecimiento menor a partir de la sexta hora se evidencia como disminuye el crecimiento de los microorganismos, el bajo nivel de pH disminuyó la tasa de división de las bacterias esporuladas. El microorganismo 0013 en presencia de sales biliares evidenció una curva de recuperación menor que a las demás variables, puesto que su crecimiento exponencial comenzó a las 12 horas con una absorbancia de 0,2 nanómetros. El microorganismo 006B a excepción de la acidez, presentó una recuperación a las variables expuestas, en las cuales se puede observar que su crecimiento exponencial comenzó a las 6 horas. El microorganismo 0018 evidenció una curva de recuperación rápida a las variables expuestas, su crecimiento exponencial comenzó a las cuatro horas y se mantuvo en esas condiciones hasta la hora 16, la variable que limitó su crecimiento fue la acidez, la cual, durante las 16 horas los valores de absorbancia fueron disminuyendo en el tiempo, a la hora 16 el valor de absorbancia fue de 0,281 nm. Las curvas de crecimiento se muestran en los gráficos 3.1, 3.2 y 3.3

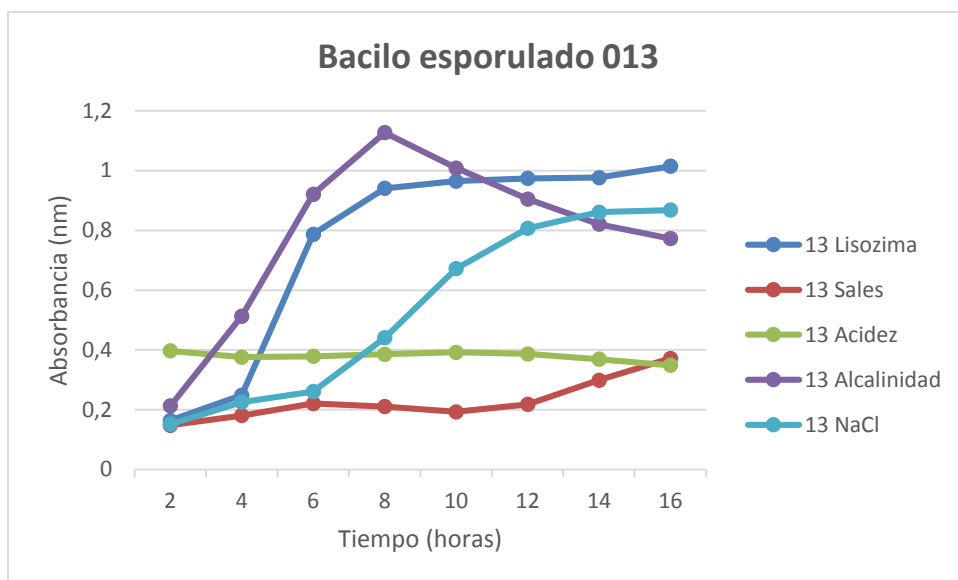


Gráfico 3.1 Curva de crecimiento bacilo esporulado 0013

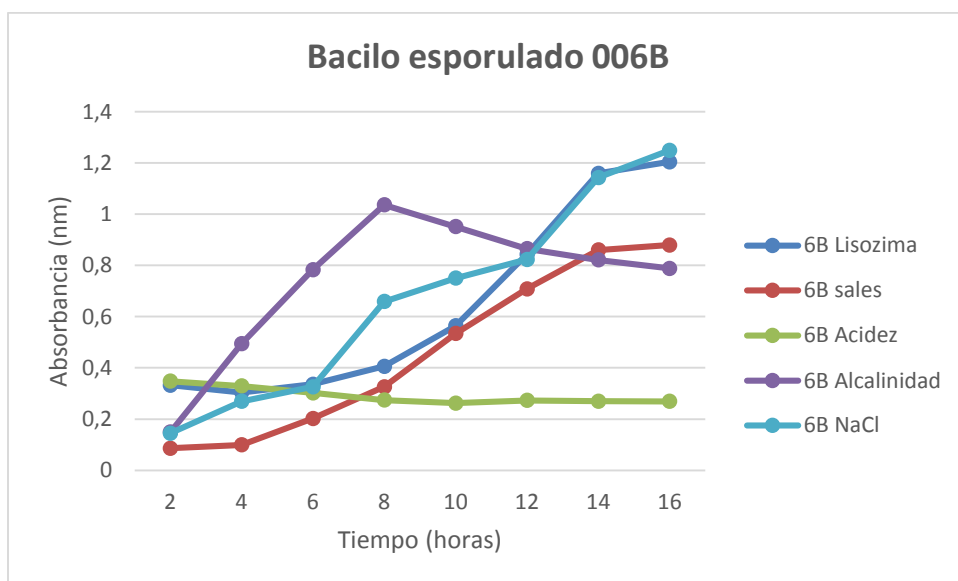


Gráfico 3.2 Curva de crecimiento bacilo esporulado 006B

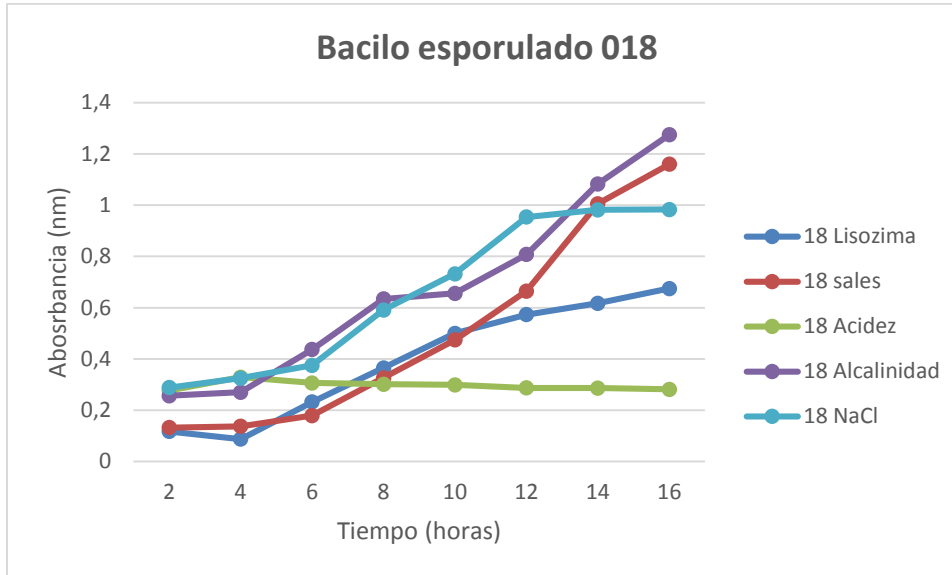


Gráfico 3.3 Curva de crecimiento bacilo esporulado 0018

La cepa 0018 BAL a las 8 horas comenzó su crecimiento exponencial para las variables de acidez y NaCl, para las demás variables su crecimiento exponencial comenzó a las 14 horas. Para la cepa 0019 BAL mostró una curva de crecimiento similar a las variables lisozima, sales biliares, alcalinidad y NaCl, en la cual su crecimiento exponencial comienza a las 2 horas y se conservó ese crecimiento durante las 16 horas, la variable al cual no se evidenció una curva de crecimiento fue a la acidez, estuvo en fase de latencia y no se multiplicó exponencialmente como sucedió con las demás variables. La cepa 008 BAL la curva de recuperación a sales biliares presentó un crecimiento exponencial durante las 16 horas, con un valor final mayor a 0.5 nm; la alcalinidad presentó una cinética de crecimiento constante hasta las 8 horas momento en el cual su crecimiento se mantuvo estable, para las demás variables evaluadas, la curva de recuperación del microorganismo se mantuvo estable durante las 16 horas.

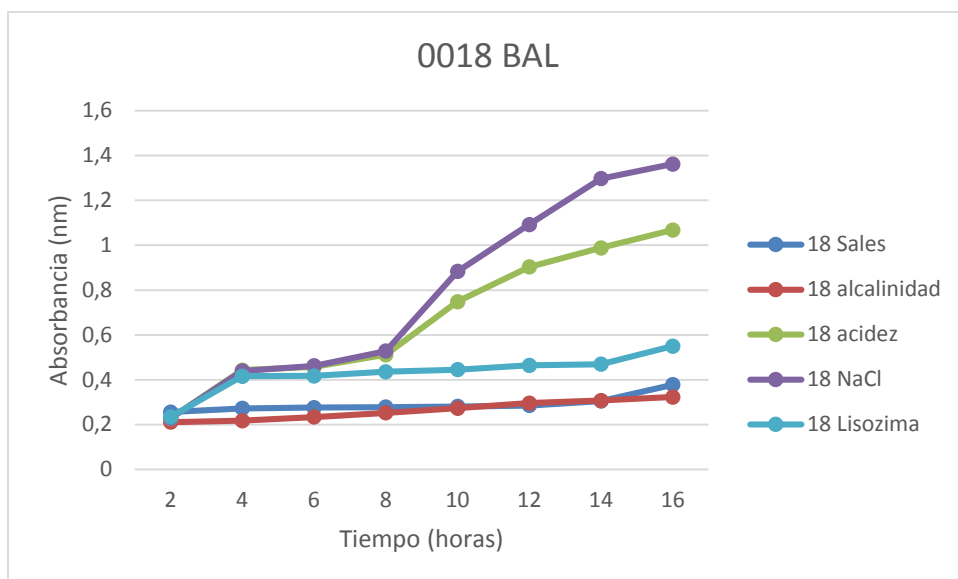


Gráfico 3.4 Curva de crecimiento BAL 0018

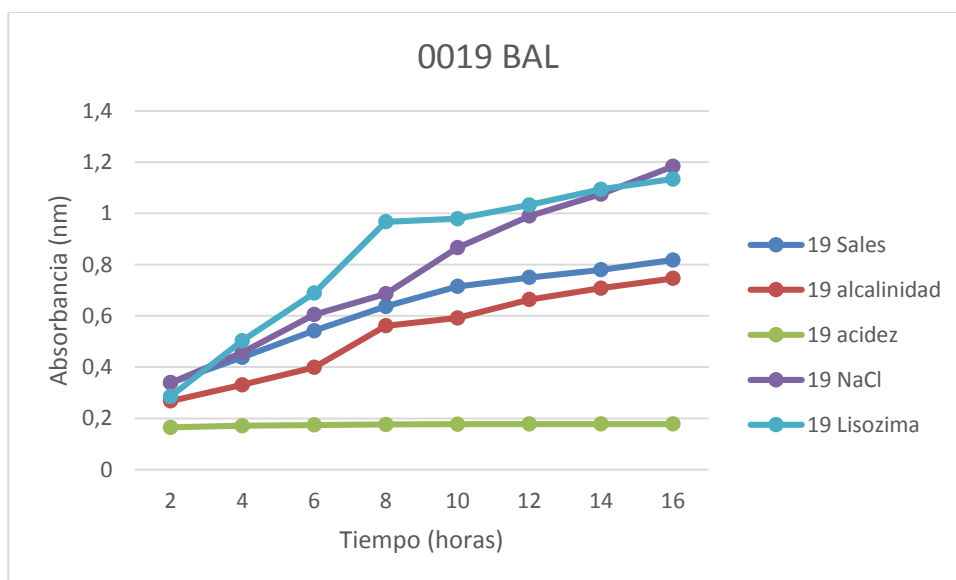


Gráfico 3.5 Curva de crecimiento BAL 0019

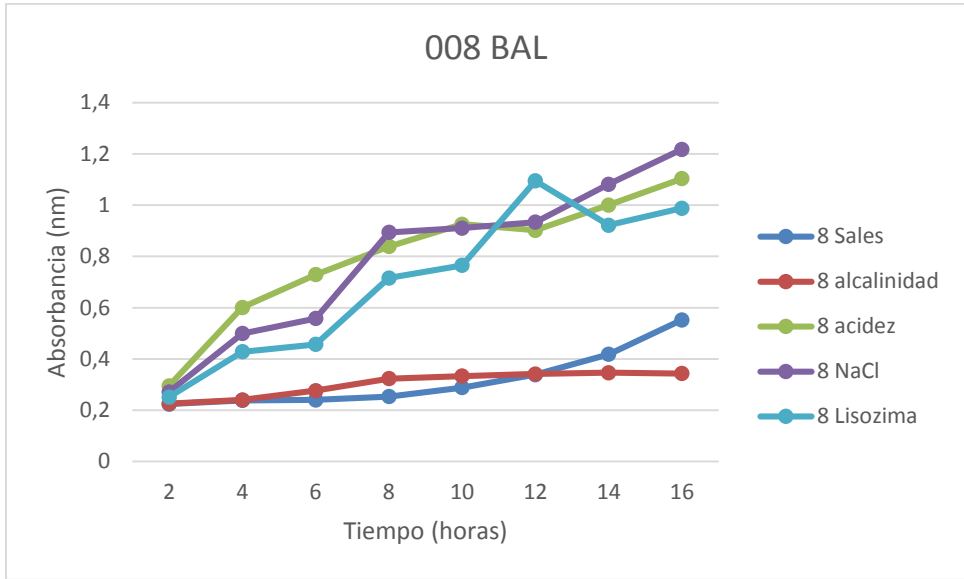


Gráfico 3.6 Cinética de crecimiento BAL 008

3.2.3 Sensibilidad a antibióticos:

La sensibilidad a antibióticos de cada uno de los microorganismos se expresa en milímetros (mm) y los resultados se muestran en la gráfica 6.7.

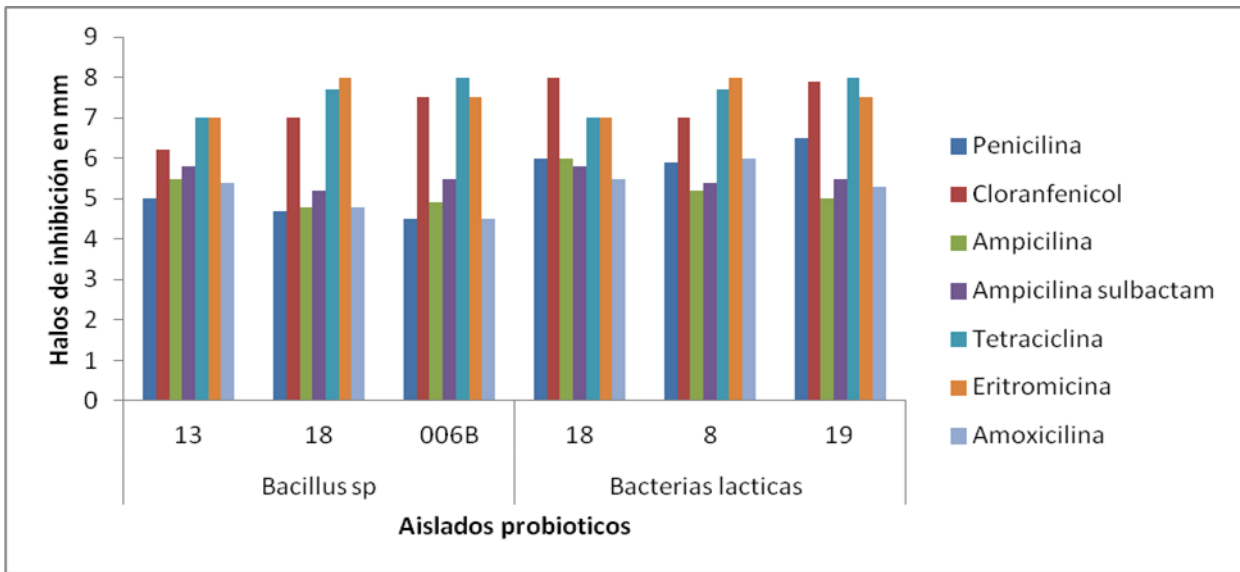


Gráfico 3.7 Sensibilidad antibiótica de los aislados.

Tanto las bacterias ácido lácticas como los bacilos esporulados fueron sensibles a la acción de los antibióticos empleados, ya que al realizar los antibiogramas, los antibióticos generaron halos de inhibición mayores 2 mm, siendo la tetraciclina, la eritromicina y el cloranfenicol los antibióticos de más rango de acción y la ampicilina, la amoxicilina y la ampicilina sulbactam presentaron un rango de acción menor.

3.2.4 Pruebas Bactericidas:

La actividad bactericidas de los microorganismos frente a cepas patógenas se evaluó por la técnica de ensayo doble capa, los resultados se muestran en la gráfica 3.8Al observar los resultados encontrados en la actividad bactericida generado por los extractos de bacilos esporulados y bacterias lácticas se pudo determinar que los extractos de bacterias ácido lácticas son los que generan los mayores halos de inhibición tanto en *S. agalactiae* como en *A. veroni*, y de las cepas de bacterias esporuladas, la cepa 006B fue la que presentó menor capacidad inhibitoria.

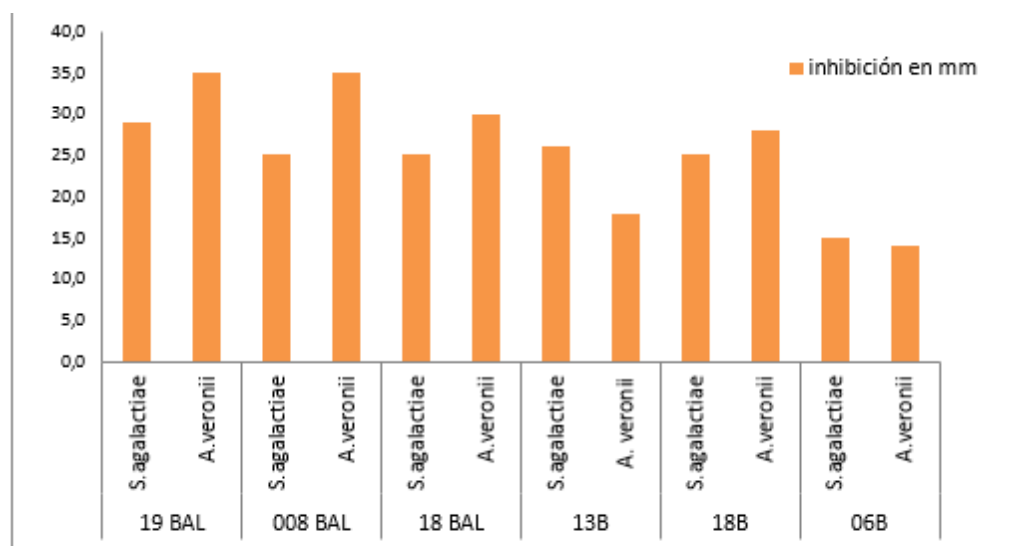


Gráfico 3.8 Actividad bactericida de los extractos frente a *S.agalactiae* y *A. veroni*

3.3 Discusión

Pruebas para determinación de actividad probiótica, dentro de las pruebas de desempeño probiótico, los microorganismos deben resistir a la acción de enzimas proteolíticas tal y como sucedió en este estudio, pues, los 6 microorganismos evaluados presentaron curvas de recuperación a las variables evaluadas. Las variables en las que no se presentó recuperación del microorganismo, éste no entró en fase de muerte, si no, más bien se mantuvo en fase de latencia, estos hallazgos se soportan con lo encontrado en 2015 por Angmo y colaboradores, quien evaluaron en potencial probiótico de 25 cepas de BAL aislados de alimentos fermentados, estos microorganismos fueron sometidos a una concentración de lisozima de 100 ppm durante una hora, demostrando que los microorganismos sometidos a estas condiciones son capaces de resistir a la acción proteolítica de la lisozima (Angmo, Kumari, Savitri, & Bhalla, 2016).

Las sales biliares no ejercieron su efecto frente a los microorganismos, los 6 microorganismos fueron resistentes a la acción de estas variables, demostrando que las bacterias probióticas resisten a las sales biliares ya que generan solutos compatibles como método de adaptación a estas condiciones. (Khan & Kang, 2016). Cueto *et al* en 2010, evaluaron la resistencia a sales biliares de 53 cepas de BAL aisladas de queso costeño a una concentración de sales al 0,3% durante 2 horas y reportaron una resistencia del 49,1 % de los aislados a esta condición (Cueto-vigil *et al.*, 2010), por su parte Ji *et al* evaluaron bacterias lácticas a una concentración del 0,3% p/v durante 24 horas concluyendo que el 90% de los microorganismos evaluados resistieron a estas condiciones (Ji, Jang, & Kim, 2015)(Ji *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015), Ramesh y colaboradores en 2015 determinaron la capacidad de cepas de *Bacillus* sp para resistir a las sales biliares encontrando una sobrevivencia del 72% (Ramesh, Vinothkanna, Rai, & Vignesh, 2015),. En trabajos realizados por (Chaves, Silva, Pinheiro, Valadares Filho, & Campos, 1999; Ji *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015; Ramesh *et al.*, 2015; Rodríguez, 2009) (Cervantes & Ciencias, 2014)(Perez-Sanchez *et al.*, 2014) la evaluación de la resistencia al pH y a las sales biliares se llevó a cabo de manera conjunta concluyendo que no hay diferencias en la combinación del pH con las sales biliares,

puesto que la respuesta de los microorganismos es diferente para cada uno de los analitos (Saran, Bisht, Singh, & Teotia, 2012). La evaluación de la resistencia a NaCl se incluyó en este estudio, porque las tilapias cultivadas en tanques se les debe introducir sal con el fin de osmorregular el agua, entonces la resistencia de los microorganismos a medios hipertónicos se usó como criterio para adicionar este analito como prueba de desempeño probiótico en tilapia roja.

Resistencia antibiótica: Para este estudio todas las cepas aisladas fueron sensibles a los antibióticos empleados, lo cual concuerda con lo expuesto por Ramesh y colaboradores los cuales evaluaron el potencial probiótico de cepas de *Bacillus sp.* aislados de peces Rohu (*Labeo rohita*), determinando la resistencia de estos microorganismos frente a 11 antibióticos de uso comercial, y determinaron la sensibilidad de estos microorganismos a los antibióticos (Ramesh et al., 2015). Cueto-Vigil en 2010 evaluó la resistencia antibiótica de cepas de BAL, seleccionando solamente cepas susceptibles a los antibióticos utilizados (Cueto-vigil et al., 2010) ratificando la selección de los microorganismos probióticos realizada en este trabajo.

Actividad bactericida: Los extractos de los microorganismos aislados presentaron actividad bactericida, Bálcazar y colaboradores en 2008 demostraron la capacidad bactericida de tres cepas de BAL frente a 4 bacterias que causan infecciones en peces (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Vibrio anguillarum*) (Jose L. Balcazar et al., 2008), en otro estudio, Pirarat y colaboradores evaluaron la capacidad bactericida de una cepa de BAL tenían contra *S. agalactiae*, demostrando que las BAL pueden disminuir la mortalidad por este agente al menos en un 50% en tilapias. (Pirarat et al., 2015) Apún en 2009 evaluó la capacidad bactericida de extractos de BAL y *Bacillus sp.* aislados de tilapia frente a cepas de *Vibrio sp.* encontrando halos de inhibición de 6 mm de diámetro (Apun-Molina et al., 2009), en 2015 Bentzon y colaboradores demostraron que cepas de *Roseobacter* tienen capacidad antagónica frente a cepas de *V. anguillarum* y *V. harveyi*, que son los principales patógenos bacterianos en los crustáceos y larvas de róbalo en los países mediterráneos (Bentzon-tilia, Dourala, Nielsen, Gram, & Street, 2015),

Ramesh y colaboradores en 2015 evaluaron la actividad bactericida que cepas de *Bacillus* Sp. tenían frente a cepas de *A. hydrophila* concluyendo que los bacilos esporulados producen compuestos con actividad bactericida. (Ramesh et al., 2015), la actividad bactericida de cepas de *Bacillus* sp se debe a que estos microorganismos producen proteasas y fosfatasas.(Aly et al., 2008) Wu en 2014 evidenció el aumento de la respuesta inmune y la protección contra *Vibrio parahaemolyticus* por cepas nativas de *Bacillus* sp. en el cangrejo de barro, los cuales gracias a la suplementación con cepas nativas mostraron una expresión más elevada de los genes de la respuesta inmune (Wu et al., 2014); Muñoz y colaboradores en 2014 evaluaron la capacidad bactericida de cepas de BAL en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) contra cepas de *Vibrio splendidus*, de las cuales 7 de 8 cepas evaluadas ejercieron actividad antimicrobiana directa contra, al menos, cuatro cepas de *V splendidus* (Muñoz-Atienza et al., 2014).En 2012 Zhao y colaboradores determinaron los efectos de potencial probiótico de cepas de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento, la inmunidad y la resistencia a la enfermedad contra la infección por *Vibrio splendidus* en juveniles pepino de mar *Apostichopus japonicus* (Zhao et al., 2012) todos estos estudios soportan los resultados encontrados en este trabajo, puesto que tanto bacterias lácticas como bacterias esporuladas demostraron tener actividad bactericida frente a cepas de bacterias gram positivas y gram negativas, lo que convierte a estos microorganismos en un método de control natural contra bacterias oportunistas.

4. Identificación de los microorganismos aislados

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010). Estas pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metaboliza. Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos en el cual no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros, los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. En este capítulo se realizó la identificación bioquímica y molecular de los microorganismos aislados.

4.1 Materiales y métodos.

Luego de la realización de las pruebas de desempeño y de seguridad de los microorganismos aislados, a las 6 cepas seleccionadas se les realizó identificación bioquímica por medio del kit comercial api 50CHL (BAL), e identificación bioquímica siguiendo el manual del Bergey para bacterias esporuladas (Anexo 1).

Posteriormente, se realizó extracción de DNA utilizando un kit comercial de purificación Norgen's Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Anexo 2), evaluando la presencia de DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa (Anexo 3) (Imagen 4.2) y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) kit PCR master mixer Thermo scientific (Anexo 3), se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, EE.UU.), usando los primers universales para procariontas 5'- GCG GAT GGG TGA GTA ACA C - 3' y 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3' (BAL) y 5'- GCTTGCTCCCTGATGTTAGC- 3' y 5'- CGGGTCCATCTG TAAGTGGT - 3' (Bacillus sp.)(Mora, Cabrefiga, & Montesinos, 2011). Los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales del laboratorio de secuenciación de la Universidad Nacional de Colombia (SSiGMOL) (Bogotá, Colombia). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4.2 Resultados.

En la imagen 4.2 se muestran los resultados de la electroforesis luego de realizar la extracción de DNA, en la cual se observan bandas de diferentes pesos moleculares entre 250pb y 1000 pb, cada uno correspondiente al DNA de las bacterias extraídas, esto confirma la presencia de DNA en el producto y valida el proceso de extracción.

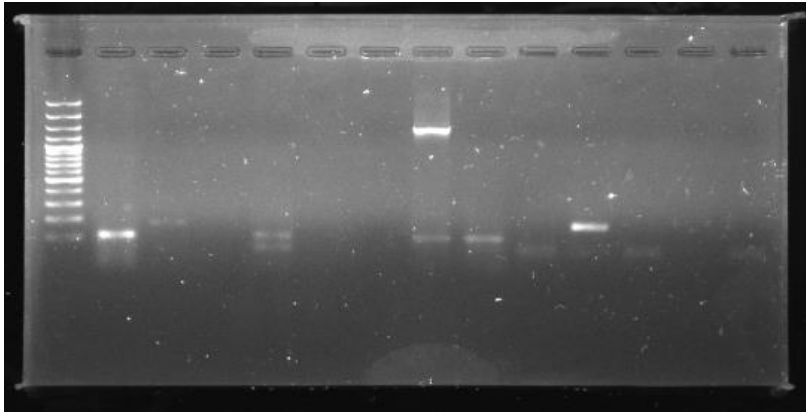


Imagen 4.1 Electroforesis posterior a la extracción de DNA.

La electroforesis de los productos de PCR (Imagen 4.3) mostró bandas de unos pesos correspondientes entre 1000 y 1500 pb correspondientes al peso de los primers utilizados, esto fue un factor muy importante para la identificación molecular

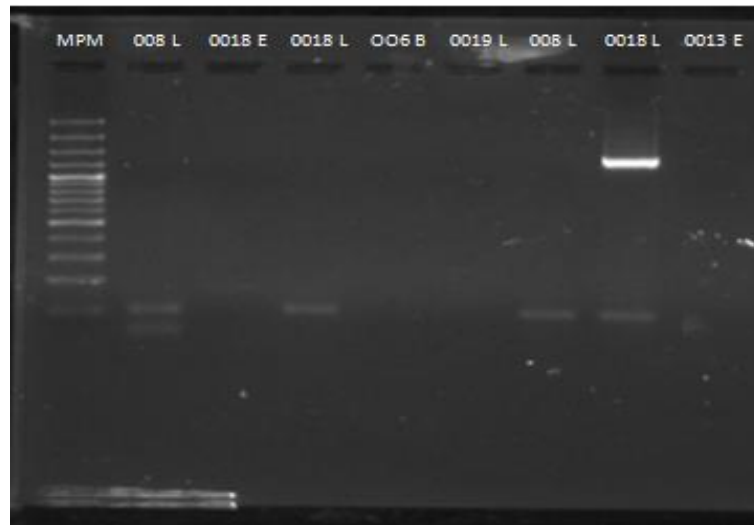


Imagen 4.2 PCR de los microorganismos aislados, la muestra fue coloreada con EZ vision

La identificación de los aislados por las diferentes técnicas se muestra en la tabla 4.1

Microrganismo	Género y Especie	Método de identificación
006B	<i>Bacillus shpaericus</i>	Bioquímica
0013	<i>Paenibacillus polimyxa</i>	Bioquímica
0018	<i>Bacillus megaterium</i>	Bioquímica
008 BAL	<i>Lactococcus Lactis</i>	Secuenciación
0019 BAL	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	Secuenciación
0018 BAL	<i>streptococcus parasanguinis</i>	Secuenciación

Tabla 4.1 Género y especie de los microorganismos aislados

En el árbol filogenético de BAL se puede determinar que las bacterias ácido lácticas identificadas por secuenciación son de la misma especie pero son de generos diferentnes. (Imagen 4.4)

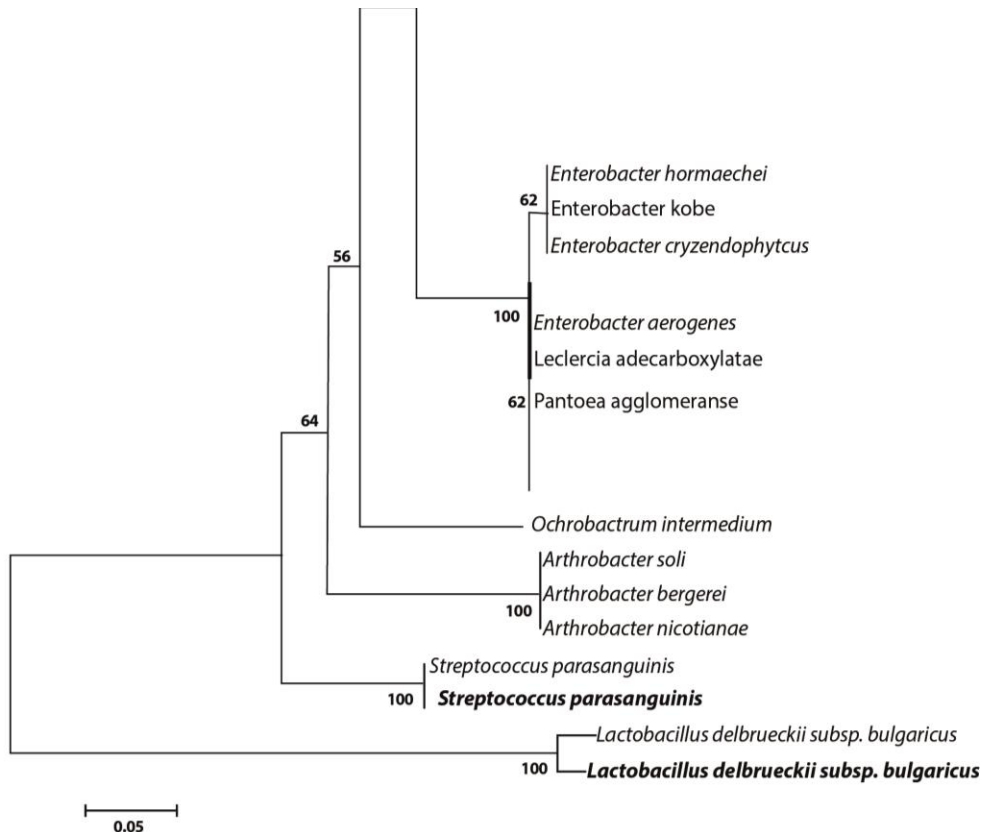


Imagen 4.3 Árbol filogenético BAL 0

4.3 Discusión

La propiedad probiótica de los microorganismos esporulados se ha reportado por varios autores, su uso en acuicultura es una práctica realizada a nivel mundial con resultados similares a los obtenidos en este trabajo, por ejemplo en el 2000 McIntosh y colaboradores, emplearon cepas de *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus megatherium* en cultivos de camarón durante 94 días.(McIntosh et al., 2000) al *Paenibacillus polymyxa* se le han atribuido además otras características, como es la degradación de histamina en la industria alimentaria, utilizándose como microorganismo iniciador, para los procesos industriales.(Lee, Lin, Liu, Huang, & Tsai, 2014), en otro estudio el *Paenibacillus polymyxa* demostró ser un agente de control biológico eficaz para suprimir el crecimiento de *Pseudomonas syringae* en plantas(Hong, Kwon, & Park, 2016). Para el caso de *Bacillus shpaericus*, a este microorganismo no se le han atribuido propiedades probióticas en acuicultura. Las propiedades que le han atribuido a este microorganismo son propiedades insecticidas ya que sus metabolitos tienen efecto de controlador de plagas. Mansour y colaboradores en 2012 reportaron que los extractos de estos microorganismos tienen efecto letal en larvas y adultos de mosquitos del género *Culex* (Mansour, Foda, & Aly, 2012)., esto soporta el hecho que este microorganismo pese a resistir las pruebas de desempeño probiótico, presentaba un rendimiento menor en las pruebas bactericidas. Varias cepas de *Bacillus* sp han demostrado que el control de enfermedades de las plantas y animales por diferentes mecanismos de acción, incluyendo antibiosis, la inducción de respuestas de defensa en el individuo y la competencia por las fuentes de nutrientes.

Las bacterias ácido lácticas son los probióticos más destacados que han estado recibiendo una gran atención por su capacidad de prevenir diversas enfermedades o trastornos en los animales y el hombre(Khan & Kang, 2016). Las bacterias lácticas se consideran seguros para la salud y se han reconocido como alimentos seguros, recibiendo la lista GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos. La producción de metabolitos tales como ácido acético, etanol, compuestos aromáticos, bacteriocinas, exopolisacáridos, y varias enzimas son características que le confieren el título de probióticos(Vizoso Pinto, Franz, Schillinger, & Holzapfel, 2006) Las bacterias ácido lácticas se emplean como probióticos en acuicultura puesto que sus características probióticas han sido ampliamente estudiadas, Apun y colaboradores concluyeron que las bacterias lácticas son buenos candidatos como probióticos en el cultivo de tilapia.(Apun-Molina et al., 2009)

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

De los 200 aislamientos, 15 se caracterizaron como probióticos y solo 6 aislados mostraron los mejores perfiles en las pruebas de desempeño para caracterizarse como probiótico.

Los microorganismos probióticos mostraron actividad bactericida frente a cepas de bacterias patógenas, lo que podría ser una forma de contrarrestar, la infección por microorganismos oportunistas de manera natural y sin afectar la salud animal o humana.

Se identificaron 6 bacterias con actividad probiótica *Bacillus shpaericus*, *Paenibacillus polimyxa*, *Bacillus megaterium*, *Lactococcus Lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y *Streptococcus parasanguinis*

5.2 Recomendaciones

Si bien un microorganismo susceptible a caracterizarse como probiótico, debe tolerar las condiciones del TGI in vitro, aún no existe una unificación sobre la concentración de los analitos a usar, se debe propender por estandarizar las concentraciones de los analitos que estarán sometidos los microorganismos, como de las pruebas de seguridad.

Se debe considerar no solo la resistencia a la lisozima si no también evaluar la producción de lisozima en los modelos animales, ya que autores han reportado que los probióticos, ya sea solos o en combinación se encuentran para aumentar los niveles de lisozima en teleósteos (S. K. Nayak, 2010) y que el mejoramiento del nivel de lisozima por los probióticos en la trucha marrón (*Salmo trutta*) es de suma importancia ya que les confiere resistencia contra patógenos (Kim & Austin, 2006). Taoka et al. (Taoka et al., 2006) reportó un nivel significativamente más alto de lisozima en la mucosa de la piel, suplementando probióticos comerciales a través del agua en comparación con la suplementación oral en tilapias (*Oreochromis niloticus*).

Para futuros estudios se recomienda la cuantificación de DNA por medio de equipos que permitan saber la cantidad de DNA extraído (Nanodroops) puesto que la electroforesis solo determina presencia o ausencia de DNA y la calidad de DNA permitirá que la PCR sea exitosa.

B. Anexo 2: protocolo de extracción de DNA

Product Information
Bacterial Genomic DNA Isolation Kit

Bacterial Genomic DNA Isolation Kit

Figure 1. Isolation of Genomic DNA from both Gram Positive and Gram Negative Bacteria
The Bacterial Genomic DNA Isolation Kit was used to isolate genomic DNA from the gram-negative bacterium *E. coli* (lanes 1 and 2), the lysozyme-resistant gram positive bacterium *S. cerevisiae* (lanes 3 and 4) and the gram positive bacterium *M. luteus* (lanes 5 and 6). Lane M is Norgen's Ultraladder 1 kb DNA Ladder.

Figure 2. High Yield Purification
The high yield of the Bacterial Genomic DNA Isolation Kit is illustrated by purifying genomic DNA from both a Gram positive and a Gram negative strain, and comparing the yield with two major competitors. With both types of bacteria, Norgen's kit was found to give a higher recovery (after both 1 and 2 aliquots).

Bacterial Genomic DNA Isolation Kit Contents

1. Resuspension Solution A
2. Lyse Buffer P
3. Solution SX
4. Wash Solution A
5. Elution Buffer B
6. Proteinase K
7. Spin Columns inserted into Collection Tubes
8. Elution tubes (1.7 mL)
9. Product Insert

Shipping Conditions
The Bacterial Genomic DNA Isolation Kit is shipped at room temperature.

Kit #	Description	Quantity
1700	Bacterial Genomic DNA Isolation Kit	50 preps
1702	Bacterial Genomic DNA Isolation 96-Well Kit	192 preps

3430 Schuman Parkway, Thornhill, ON, Canada L2V 4Y6 Phone: 905-227-8848 Fax: 905-227-1061
North American Toll Free: 1-866-667-4362
© Norgen Biotech Corp., 2014 P817900-PA114

Product Information
Bacterial Genomic DNA Isolation Kit

Bacterial Genomic DNA Isolation Kit

Norgen's Bacterial Genomic DNA Isolation Kit is designed for the rapid preparation of genomic DNA from 2 x 10⁸ viable bacterial cells (between 0.5 and 1.0 mL of culture). Purification is based on spin column chromatography as the separation matrix. Norgen's column binds DNA under high salt concentrations and releases the bound DNA under low salt and slightly acidic conditions. The purified genomic DNA is fully digestible with all restriction enzymes tested, and is completely compatible with PCR and Southern blot analysis.

The Bacterial Genomic DNA Isolation Kit allows for the isolation of genomic DNA from both gram-negative and gram-positive cultures, including *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. The genomic DNA is preferentially purified from other cellular proteinaceous components. Typical yields of genomic DNA will vary depending on the cell density of the bacterial culture and the bacterial species. Preparation time for a single sample is approximately 45 minutes, and each kit contains sufficient materials for 50 or 192 preparations.

Kit Specifications - Spin Columns

Maximum Input	2 x 10 ⁸ bacterial cells	Average Yield*	Up to 20 µg
Column Binding Capacity	25 µg	Time to Complete 10 Purifications	1 hour

Kit Specifications - 96-Well Plates

Maximum Input per Well	2 x 10 ⁸ bacterial cells	Average Yield*	Up to 20 µg
Well Binding Capacity	25 µg	Time to Complete 10 Purifications	90 minutes

* Average yield will vary due to cell density of the bacterial culture, the growth conditions, and the bacterial species.

Bacterial Genomic DNA Isolation Kit Benefits

Fast and easy processing	Rapid spin-column format allows for the processing of multiple samples in 1 hour, and the 96-well plate can be processed in 90 minutes.
High binding capacity of columns	The binding capacity of the columns in the Bacterial Genomic DNA Isolation Kit is 25 µg.
Isolate genomic DNA from all types of bacteria	Genomic DNA can be isolated from both Gram negative and Gram positive bacteria (Figure 1).
Recovered genomic DNA is suitable for downstream applications	Purified genomic DNA is fully compatible with restriction enzyme digestions, sequencing and PCR analysis.
High quality DNA	No degradation of the genomic DNA isolated with the Bacterial Genomic DNA Isolation Kit is observed.

© Norgen Biotech Corp., 2014 P817900-PA114

C. Anexo 3: Protocolo gel de agarosa

Método

1. Preparación del gel de agarosa
 - 1.1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración deseada (ver Tabla 1) en función del volumen de gel.
 - 1.2. Añadir la agarosa al *buffer* (TAE 1x o TBE 0.5x) en un matraz.
 - 1.3. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido.
 - 1.4. Dejar enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50 °C (Nota: si se opta por añadir el BrEt al gel debe realizarse en este momento, a una concentración final de 0.5 µg/ml).
 - 1.5. Mientras la solución de agarosa se enfría, preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta masking, o colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada.
 - 1.6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.
 2. Preparación de las muestras
 - 2.1. Mezclar tanto las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del *buffer* de carga 6x. El volumen total estará determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 15-30 µl.
 3. Carga de las muestras y corrida del gel
 - 3.1. Una vez que el gel ha solidificado retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis.
 - 3.2. Añadir *buffer* de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.
 - 3.3. Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
 - 3.4. Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon en el paso 7. Nota: Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.
 4. Tinción del gel y visualización del ADN
 - 4.1. Si no se añadió el BrEt al gel (paso 1.4), éste debe teñirse una vez finalizada la electroforesis. Para ello se saca el gel de su molde y se sumerge en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante al menos 15 min. Nota: Ambas formas de tinción rinden resultados similares, pero se recomienda la tinción una vez finalizada la electroforesis para mantener el molde, peine y cámara libres de BrEt.
 - 4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda = 300 \text{ nm}$), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.
 - 4.3. (Opcional) Si hay bandas de tamaño pequeño que no se visualizan bien puede hacerse una etapa de desteñido con H₂O o 1 mM MgSO₄ durante 20 min.
 - 4.4. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.
- tamaños que se pretenden separar, se recomienda voltajes no muy altos para tamaños muy grandes del ADN.
Nota: Debe tenerse en cuenta que el ADN migra hacia el ánodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables.
- 3.6. Correr el gel hasta que el colorante azul de bromofenol esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel. En ese momento debe detenerse la electroforesis.

D. Anexo 4: Protocolo PCR

Thermo
SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION
PCR Master Mix (2X)

#K0171 for 200 rxns
Lot: _____ Expiry Date: _____
Store at -20°C

Ordering Information

Component	#K0171 200 rxns of 50 µL	#K0172 100 rxns of 50 µL
PCR Master Mix (2X)	4 × 1.25 mL	20 × 1.25 mL
Water, nuclease-free	4 × 1.25 mL	20 × 1.25 mL

www.thermoscientific.com/onebio

Description

PCR Master Mix is a 2X concentrated solution of Taq DNA polymerase, dNTPs and all other components required for PCR, except DNA template and primers. This pre-mixed formulation saves time and reduces contamination due to a reduced number of pipetting steps required for PCR set up. The mix is optimized for efficient and reproducible PCR.

Applications

- High throughput PCR.
- Routine PCR with high reproducibility.
- Generation of PCR products for TA cloning.
- RT-PCR.

Composition of the PCR Master Mix (2X)

0.05 U/µL Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP).

PROTOCOL

1. Gently vortex and briefly centrifuge PCR Master Mix (2X) after thawing.
2. Place a thin-walled PCR tube on ice and add the following components for each 50 µL reaction:

PCR Master Mix (2X)	25 µL
Forward primer	0.1-1.0 µM
Reverse primer	0.1-1.0 µM
Template DNA	10 pg - 1 µg
Water, nuclease-free	to 50 µL
Total volume	50 µL

3. Gently vortex the samples and spin down.
4. When using a thermal cycler that does not contain a heated lid, overlay the reaction mixture with 25 µL of mineral oil.
5. Perform PCR using the recommended thermal cycling conditions outlined below:

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	1-3 min	1
Denaturation	95	30 s	25-40
Annealing	Tm-5	30 s	
Extension	72	1 min/kb	
Final Extension	72	5-15 min	1

GUIDELINES FOR PREVENTING CONTAMINATION OF PCR REACTION

During PCR more than 10 million copies of template DNA are generated. Therefore, care must be taken to avoid contamination with other templates and amplicons that may be present in the laboratory environment. General recommendations to lower the risk of contamination are as follows:

- Prepare your DNA sample, set up the PCR mixture, perform thermal cycling and analyze PCR products in separate areas.
- Set up PCR mixtures in a laminar flow cabinet equipped with an UV lamp.
- Wear fresh gloves for DNA purification and reaction set up.
- Use reagent containers dedicated for PCR. Use positive displacement pipettes, or pipette tips with aerosol filters to prepare DNA samples and perform PCR set up.
- Always perform "no template control" (NTC) reactions to check for contamination.

GUIDELINES FOR PRIMER DESIGN

Use the Thermo Scientific REViewer primer design software at www.thermoscientific.com/reviewer or follow the general recommendations for PCR primer design as outlined below:

- PCR primers are generally 15-30 nucleotides long.
- Differences in melting temperatures (T_m) between the two primers should not exceed 5°C.
- Optimal GC content of the primer is 40-60%. Ideally, C and G nucleotides should be distributed uniformly along the primer.
- Avoid placing more than three G or C nucleotides at the 3'-end to lower the risk of non-specific priming.
- If possible, the primer should terminate with a G or C at the 3'-end.
- Avoid self-complementary primer regions, complementarities between the primers and direct primer repeats to prevent hairpin formation and primer dimerization.
- Check for possible sites of undesired complementary between primers and template DNA.
- When designing degenerate primers, place at least 3 conserved nucleotides at the 3'-end.
- When introducing restriction enzyme sites into primers, refer to the table "Cleavage efficiency close to the termini of PCR fragments" located on www.thermoscientific.com/onebio to determine the number of extra bases required for efficient cleavage.

Estimation of primer melting temperature

For primers containing less than 25 nucleotides, the approx. melting temperature (T_m) can be calculated using the following equation:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

where G, C, A, T represent the number of respective nucleotides in the primer.

If the primer contains more than 25 nucleotides we recommend using specialized computer programs e.g., REViewer™ (www.thermoscientific.com/reviewer) to account for interactions of adjacent bases, effect of salt concentration, etc.

COMPONENTS OF THE REACTION MIXTURE

Template DNA

Optimal amounts of template DNA for a 50 µL reaction volume are 0.01-1 ng for both plasmid and phage DNA, and 0.1-1 µg for genomic DNA. Higher amounts of template increase the risk of generation of non-specific PCR products. Lower amounts of template reduce the accuracy of the amplification.

All routine DNA purification methods can be used to prepare the template, e.g. Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721) or GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (#K0502). Trace amounts of certain agents used for DNA purification, such as phenol, EDTA and proteinase K, may inhibit DNA polymerase. Ethanol precipitation and repeated washes of the DNA pellet with 70% ethanol usually removes trace contaminants from DNA samples.

Primers

The recommended concentration range of the PCR primers is 0.1-1 µM. Excessive primer concentrations increase the probability of mispriming and generation of non-specific PCR products. For degenerate primers and primers used for long PCR we recommend higher primer concentrations in the range of 0.3-1 µM.

(continued on reverse page)

E. Anexo 5: Publicaciones derivadas de la investigación.



Recibido 01/10/2015, Aceptado 03/11/2015, Disponible online 24/12/2015

El uso de los probióticos en la industria acuícola. Artículo de revisión.

¹Ricardo García Naranjo; ²Luz A Gutiérrez, ³ Carlos A David RB.

^{1,2,3} Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia Carrera 51 118 sur 57 Caldas - Antioquia - Colombia.A.A 50130

rigarcia@lasallistadocentes.edu.co

RESUMEN

El crecimiento acelerado de la acuicultura y su intensificación expone a los peces de cultivo a condiciones estresantes, las cuales conllevan al desarrollo de enfermedades y pérdidas económicas. Por lo general para resolver esta afectación se utiliza con poco control antibióticos, los cuales en la actualidad tienen restricción de uso. Estas condiciones han generado la búsqueda de alternativas que mejoren la producción; tal es el caso de los probióticos cuyo efecto benéfico ya ha sido comparado en muchos estudios y en diferentes sistemas de producción pecuaria. La presente revisión presenta el estado del arte de los probióticos y su influencia en la acuicultura.

Bibliografía

- Abergel, C., Monchois, V., Byrne, D., Chenivesse, S., Lembo, F., Lazzaroni, J.-C., ... Eslava-Mocha. (2007). Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria. *Orinoquia- Universidad de Los Llanos - Villavicencio, Meta. Colombia*, 104(15), 6394–9.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0611019104>
- Abreu-Abreu, A. T. (2012). Prebióticos, probióticos y simbióticos. *Revista de Gastroenterología de México*, 77, 26–28.
<http://doi.org/10.1016/j.rgmx.2012.07.011>
- Acosta-García, J., & Aguilar-García, C. (2014). Infección de tejidos blandos por *Aeromonas salmonicida*. Primer reporte de caso en México y revisión de la bibliografía Soft Tissues Infection Due to *Aeromonas*. *Medicina Interna de México*, 30(2), 221–226.
- Acuña-Monsalve, Y. (2013). SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BAL CON POTENCIAL PROBIÓTICO AISLADAS DEL SUERO COSTEÑO. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Agricultura, M. D. E., & Medio, A. Y. (2015). Intercambios comerciales de productos pesqueros.
- Al-Hisnawi, A. A., Mustafa, J. M., Yasser, Y. K., Hussain, K. A., & Jabur, A. M. (2016). Influence of aquatic environment on microbiota of *Liopropoma santi* fish in a local river in Iraq. *Karbala International Journal of Modern Science*, 1–5.
<http://doi.org/10.1016/j.kijoms.2016.01.001>
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008). Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. *Aquaculture*, 277(1-2), 1–6.
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.021>
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food*

- Science and Technology*, 66, 428–435. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
- Apun-Molina, J. P., Santamaria- Miranda, A., Luna-Gonzalez, A., Martinez-Diaz, S. F., & Rojas-Contreras, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8), 887–894. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02172.x>
- Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O., & Muzquiz, J. L. (2007). Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(1), 185–193. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00294.x>
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4), 188–191. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>
- Bash, E. (2015). ACUERDO DE COMPETITIVIDAD DE LA CADENA DE LA PISCICULTURA EN COLOMBIA. *PhD Proposal*. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bentzon-tilia, M., Dourala, N., Nielsen, K. F., Gram, L., & Street, N. (2015). Isolation of TDA-producing *Phaeobacter* strains from sea bass larval rearing units and their probiotic effect against pathogenic *Vibrio* spp. in *Artemia* cultures. *Systematic and Applied Microbiology*, (October), 1–34. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.01.005>
- Bocek, A., Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - Departamento de Acuicultura de Uruguay, & FAO. (2010). Manual básico de Piscicultura en estanques. *FAO Orientaciones Técnicas Para La Pesca Responsable.*, 5(4), 1–52.
- Bocker, A. (2007). Acuicultura, 5. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/60-acuicultura.pdf
- Boyd, C. E., & Massaut, L. (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 20(2), 113–132. [http://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00010-2](http://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00010-2)
- Burr, G., Gatlin, D., & Ricke, S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in Finnish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4), 425–435.

- <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.x>
- Calvo, P. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de Bacillus spp . AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (Solanum tuberosum) PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF Bacillus spp . STRAINS FROM POTATO (Solanum tuberosum) RHIZOSPHERE, 9(1).
- Carmen, J., Ramírez, R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas : Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, (7), 1–16.
- CARRILLO, W. (2013). Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad, 314–326. Retrieved from http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf
- Center, O., & Marine, S. G. (2013). Fish dissection. *Sea Grant Oregon*, 4–5.
- Cervantes, Y. C., & Ciencias, M. E. N. (2014). Colegio de postgraduados.
- Chaves, A. H., Silva, J. F. C. Da, Pinheiro, A. J. R., Valadares Filho, S. D. C., & Campos, O. F. De. (1999). Seleção de isolados de Lactobacillus acidophilus usados como probiótico em bezerros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28(5), 1093–1101. <http://doi.org/10.1590/S1516-35981999000500027>
- Cochrane, K., De Young, C., Soto, D., & Bahri, T. (2012). *Consecuencias del cambio climático para la pesca y la acuicultura Visión de conjunto del estado actual de los conocimientos científicos. FAO Fisheries and Aquaculture.*
- Collado Amores, M. C. (2004). Caracterización de cepas del género bifidobacterium con carácter probiótico. *Tesis Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología*, 1–283.
- Consuelo, L., Leal, S., Constanza, L., & Ramírez, C. (n.d.). Congelación bacteriana : Factores que intervienen en el proceso, 109–113.
- Córdoba, M., Chaves, C., & Arias, M. L. (2009). Identificación, cuantificación y determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias prebióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(2), 179–183.
- Cueto-vigil, M. c, Acuña-Monsalve, Y., & Valenzuela, J. (2010). Evaluación in Vitro Del Potencial Probiótico De Bacterias. *Actual Biol*, 32(93), 129–138.
- Dawood, M. A. O., & Koshio, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243–251.

- <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.033>
- Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - Departamento de Acuicultura de Uruguay. (2010). Manual básico de Piscicultura en estanques, 1–52.
- FAO. (2011). *Desarrollo de la acuicultura. 4. Enfoque ecosistémico a la acuicultura. FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable*. (Vol. 5).
- FAO. (2014). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Fao*. <http://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500
- FAO/ WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>, 1–11. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03873>
- FAO, E., & OMS, E. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO Alimentación Y Nutrición*, 85, 52. Retrieved from <file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf>
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Franco, H., & Pelaez, M. (2007). *Cría Y Producción De Pirarucú En Cautiverio. Proyecto Bioecología del Pirarucu*.
- Gasto, C. D. E. L. (2015). NOMBRE DE PROYECTO: Apoyo al Fomento de Proyectos de Pesca Artesanal y Acuicultura de Recursos Limitados a Nivel Nacional 1, 1–25.
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P., & Ollevier, F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Disease of Aquatic Organisms*, 26(3), 181–187. <http://doi.org/10.3354/dao026181>
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., & Angulo, F. J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1248–1253. <http://doi.org/10.1086/605667>
- Hong, C. E., Kwon, S. Y., & Park, J. M. (2016). Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological Research*, 185, 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.004>
- Jeong, D. W., & Lee, J. H. (2015). Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine

- production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 1078–1084.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.031>
- Ji, K., Jang, N. Y., & Kim, Y. T. (2015). Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(9), 1568–1577.
<http://doi.org/10.4014/jmb.1501.01077>
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, *274*(1), 1–14.
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
- Khan, I., & Kang, S. C. (2016). Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi – A traditional Korean fermented food. *Food Control*, *60*, 88–94. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.010>
- Kim, D.-H., & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, *21*(5), 513–524. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.02.007>
- Labella, A., Gennari, M., Ghidini, V., Trento, I., Manfrin, A., Borrego, J. J., & Lleo, M. M. (2013). High incidence of antibiotic multi-resistant bacteria in coastal areas dedicated to fish farming. *Marine Pollution Bulletin*, *70*(1-2), 197–203.
<http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.037>
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzman-Mendez, B. E., & Lopez-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*(1-4), 193–201.
[http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish and Shellfish Immunology*, *45*(1), 2–12. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>
- Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, *3*(4), 21–29.
<http://doi.org/ISSN:1794-2470>
- Lee, Y. C., Lin, C. Saint, Liu, F. L., Huang, T. C., & Tsai, Y. H. (2014). Degradation of

- histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*, (1), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.003>
- Love, D. C., Rodman, S., Neff, R. A., & Nachman, K. E. (2011). Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environmental Science & Technology*, 45(17), 7232–7240. <http://doi.org/10.1021/es201608q>
- Mancini, M. A. (2002). Introducción a la biología de los peces (pp. 1–19).
- Mansour, S. A., Foda, M. S., & Aly, A. R. (2012). Mosquitocidal activity of two *Bacillus* bacterial endotoxins combined with plant oils and conventional insecticides. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 44–52. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.001>
- Martinez Cruz, P., Ibanez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramirez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol*, 2012, 916845. <http://doi.org/10.5402/2012/916845>
- McIntosh, D., Samocha, T. M., Jones, E. R., Lawrence, A. L., McKee, D. A., Horowitz, S., & Horowitz, A. (2000). The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21(3), 215–227. [http://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00030-8](http://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00030-8)
- Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 180–183. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3), 405–430. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14(4), 213–223. <http://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>
- Muñoz-Atienza, E., Araujo, C., Magadan, S., Hernandez, P. E., Herranz, C., Santos, Y., & Cintas, L. M. (2014). In vitro and in vivo evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. *Fish and Shellfish*

- Immunology*, 41(2), 570–580. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.007>
- Navarrete, P., Espejo, R. T., & Romero, J. (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, 57(3), 550–561. <http://doi.org/10.1007/s00248-008-9448-x>
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1), 2–14. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553–1573. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Nguyen, A. T. V, Nguyen, D. V., Tran, M. T., Nguyen, L. T., Nguyen, A. H., & Phan, T. N. (2015). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers. *Letters in Applied Microbiology*, 60(6), 580–588. <http://doi.org/10.1111/lam.12411>
- Nitzan, T., Rozenberg, P., & Cnaani, A. (2016). Differential expression of amino-acid transporters along the intestine of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the effect of water salinity and time after feeding. *Aquaculture*. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.020>
- NYSDEC. (2013). Fish Dissection, 20–30.
- OMS. (2007). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos, 32. http://doi.org/978_92_4_359463_7
- Perez-Sanchez, T., Ruiz-Zarzuola, I., de Blas, I., & Balcazar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133–146. <http://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Jörg, D., Völker, U., & Hecker, M. (2001). Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5617–5631. <http://doi.org/10.1128/JB.183.19.5617>
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Ooi, E. L., Katagiri, T., & Maita, M. (2015). Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 93–103. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.002>

- Qi, Z., Zhang, X. H., Boon, N., & Bossier, P. (2009). Probiotics in aquaculture of China - Current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 290(1-2), 15–21. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.012>
- Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K., & Vignesh, V. S. (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 268–276. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.018>
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Rodríguez Gutiérrez, M., Rodríguez Cázares, D. G., Monroy García, Y., & Mata Sotres, J. A. (2001). Manual de enfermedades de peces. *Boletín Del Programa Nacional Manual de Enfermedades de Peces*, 3(15), 1–14.
- Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. *Tesis*, 197.
- SAGARPA. (2012). Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable. *Comité Sistema Producto Tilapia de México AC*.
- Sagarpa, & FUNPROVER. (2008). Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad. *Control*, 143.
- Saran, S., Bisht, M. S., Singh, K., & Teotia, U. S. (2012). Analyzing Probiotic Attributes to Assess Comparatively Two Isolates of *Lactobacillus acidophilus* in Prebiotics , Honey and Inulin . ABSTRACT : INTRODUCTION :, 2(1), 26–34.
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., & Supamattaya, K. (2008). Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? *Aquaculture*, 284(1-4), 35–40. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.034>
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J. Y., Kim, S. M., Park, S. II, Yoshikawa, T., & Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 72(4), 755–766. <http://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01215.x>
- Tinh, N. T. N., Linh, N. D., Wood, T. K., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of*

- Applied Microbiology*, 103(1), 194–203. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03217.x>
- Velez Zea, J. M. (2014). Evaluacion de la actividad antimicrobiana de bacterias probioticas extraidas del calostro de cerdas de granjas del Aburra sur, 157. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/45835/>
- Villamil, L., & Angélica, M. (2009). PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN : RESEÑA INTRODUCCIÓN El dramático incremento en la población mundial en los últimos dos siglos , sumado a la sobreexplotación de diferentes pesquerías (FAO , 2006) son factores que ex. *Investigaciones Marinas*, 38(2), 165–187.
- Vizoso Pinto, M. G., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2006). Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, 109(3), 205–214. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029>
- Wang, Y. (2011). Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 17(2). <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00771.x>
- Watanabe, A. L., Viegas, E. M. M., & Gonçalves, L. U. (2010). Levels of yeast and its by-products on pacu juveniles feeding. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(3), 447–453. <http://doi.org/10.1590/S1516-35982010000300001>
- Wu, H. J., Sun, L. Bin, Li, C. B., Li, Z. Z., Zhang, Z., Wen, X. B., ... Li, S. K. (2014). Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus* strains in mud crab (*Scylla paramamosain*). *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2), 156–162. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.027>
- Zhao, Y., Zhang, W., Xu, W., Mai, K., Zhang, Y., & Liufu, Z. (2012). Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(5), 750–755. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.027>