



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación

LUZ ADRIANA GUTIÉRREZ RAMIREZ

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2016

Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Doctor en Biotecnología

Ph.D. Magally Romero Tabarez
Docente Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín

Comité tutorial
MSc Olga Ines Montoya Campuzano, Ph.D. Silvia Andrea Quijano P.
Ph.D. Gloria Cadavid Restrepo

Línea de Investigación:
Producción y Transformación agropecuaria

Grupo de Investigación:
Grupo de investigación en producción, desarrollo y transformación agropecuaria

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Medellín, Colombia

2016

Dedicatoria

A mi Jero, mi vida entera

A Mauro, mi eterno amor

A mi padre, mi inspiración

Agradecimientos

Gracias a Dios, gracias a la vida, por darme la posibilidad de encontrar en mi camino personas que me han dado tanto y me han enriquecido en cada etapa de mi vida.

Olga Montoya mi Maestra, a quien le debo mi proceso académico y el infinito amor por lo que hago.

A mi tutora la profesora Magally Romero, gracias por su apoyo y dirección.

Gracias a Carlos Arturo David, tus aportes y experiencia posibilitaron este proyecto.

Gracias a mis amigos Zoctecnistas: Oswaldo y Fredy y a Doña Blanca, son ustedes excelentes. Gracias a los estudiantes de maestría, Ricardo, Eliana, Vicky y Natalia, su apoyo fue fundamental. Al Vicerrector de la Corporación, Doctor Luis Fernando Garces, por su confianza.

A la Unidad de laboratorios de la Corporación Universitaria Lasallista y en ella a todos los auxiliares, Yamile, Alejandro, Arturo y Luisa, son ustedes absolutamente incondicionales.

Gracias, gracias infinitas a mis padres por enseñarme que siempre se puede ser mejor, a mi esposo y mi hijo, por estar siempre aquí, conmigo.

Gracias por que por fin podemos decir, lo logramos!!

Resumen

El incremento en la demanda por hacer una acuicultura sostenible y amigable con el medio ambiente, ha llevado a que el uso de probióticos sea una actividad ampliamente practicada y aceptada. Los probióticos son, en su gran mayoría, bacterias ácido lácticas y bacilos esporulados con características metabólicas especiales que favorecen la salud intestinal y por ende mejora los parámetros productivos en el animal. En peces, especialmente Tilapia roja, muy poco se ha estudiado sobre sus interacciones intestinales y su microbiota nativa, razón por la cual se hace necesario un tamizaje de algunas bacterias con actividad probiótica que puedan coexistir en ellos.

En la siguiente investigación, se aislaron cepas de *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa* y *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus* con actividad probiótica comprobada, ellos se sometieron a microencapsulación por “*spray dry*”, con el objeto de proteger su viabilidad, incorporándolos en una microcápsula de maltodextrina con inulina, y posteriormente se adicionaron en una dieta para Tilapia, encontrando que los animales alimentados con esta mejoraron considerablemente variables zootécnicas como ganancia de peso, ganancia de longitud, conversión alimentaria y tasa de crecimiento específico, al ser comparado con los animales no suplementados

Palabras clave: bacterias lácticas, bacilos esporulados, microencapsulación, spray dry, dieta, probióticos

Abstract

The increasing demand for environmentally friendly and sustainable aquaculture, has turned the probiotic use in a widely-practiced and accepted activity. Probiotics are mostly lactic acid bacteria and spore forming bacilli, with special metabolic features that enhance intestinal health improving the productive parameters in animals. Fish, especially red Tilapia, has been little studied on their intestinal interactions and its native microbiota; for this reason, it is necessary to carry out screening processes for bacteria with probiotic activity that can coexist in them.

In this research, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa* and *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus* strains with probiotic activity were isolated, they were subjected to microencapsulation through 'spray dry', in order to protect its viability, incorporating them in a microcapsule of maltodextrin with inulin. These microcapsules were supplemented into a diet for Tilapia. Animals fed with the probiotic considerably improved their zootechnical variables when they were compared with animals fed with not supplemented diet.

Key words: lactic acid bacteria, bacilli sporulated, microencapsulation, spray dry, diet, probiotics

Contenido

	Pág.
Lista de imágenes	XIII
Lista de gráficos	XIV
Lista de tablas	XV
Peces y Generalidades	
1.1 Introducción.....	2
1.2 Reseña teórica.....	5
1.2.1 Características del tracto intestinal de los peces.....	7
1.3 Probióticos.....	7
1.3.1 Pruebas para caracterización de probióticos.....	8
1.3.2 Importancia de los probióticos en la industria alimentaria.....	9
1.3.3 Microencapsulación.....	10
1.3.4 Técnica <i>Spraydrying</i> para microencapsular probióticos:.....	10
1.3.5 Métodos de liberación	11
1.4 Objetivos	13
1.4.1 General	13
1.4.2 Específicos	13
1.5 Introducción.....	16
1.6 Objetivo desarrollado	16
1.7 Metodología	16
1.7.1 Aislamiento de Bacterias lácticas y Bacilos esporulados	16
1.7.2 Evaluación del carácter probiótico de los aislados.....	17
1.7.3 Ensayos de actividad probiótica.....	17
1.7.4 Ensayo actividad hemolítica.....	18
1.7.5 Sensibilidad a los antibióticos	18
1.7.6 Pruebas de actividad bactericida	18
1.7.7 Análisis de los extractos por cromatografía de bacterias lácticas.....	19
1.7.8 Curvas de crecimiento.....	19
1.7.9 Identificación de los microorganismos aislados.....	20
1.8 Resultados	21
1.8.1 Aislamiento de bacterias	21
1.8.2 Ensayos de actividad probiótica.....	23
1.8.3 Sensibilidad a los antibióticos	26
1.8.4 Ensayos de actividad bactericida.....	27
1.8.5 Análisis de los extractos por cromatografía de bacterias lácticas.....	28
1.8.6 Curvas de crecimiento para bacterias lácticas	30

1.8.7	Caracterización molecular y bioquímica de los aislados	32
1.9	Discusión	34
1.10	Conclusión	37
2.	Microencapsulación de los aislados probióticos.....	38
2.1	Introducción.....	39
2.2	Objetivo desarrollado	39
2.3	Metodología	39
2.3.1	Activación de las cepas y obtención de la biomasa para encapsular	39
2.3.2	Técnica de secado por aspersión con maltodextrina e inulina:.....	40
2.3.3	Tamaño de las microcapsulas	41
2.4	Resultados	42
2.4.1	Tamaño de las microcapsulas	43
2.4.2	Análisis estadístico	44
2.5	Discusión	48
2.6	Conclusión.....	51
3.	Evaluación de las microcápsulas en un concentrado para Tilapia.....	52
3.1	Introducción.....	53
3.2	Objetivo desarrollado	54
3.3	Metodología	54
3.3.1	Producción de concentrado para tilapia.....	54
3.3.2	Análisis microbiológico de los concentrados	55
3.3.3	Evaluación de la viabilidad de los probióticos sobre el concentrado	57
3.4	Discusión	58
3.5	Conclusiones.....	59
4.	Evaluación de los parámetros zootécnicos de Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp) alimentadas con las dietas adicionadas con microorganismos probióticos microencapsulados	60
4.1	Introducción.....	61
4.2	Objetivo desarrollado	62
4.3	Metodología	62
4.3.1	Localización	62
4.3.2	Material biológico.....	62
4.3.3	Cepas utilizadas y clasificación.....	62
4.3.4	Dietas y alimentación	62
4.3.5	Parámetros zootécnicos	63
4.3.6	Calidad del agua.....	64
4.4	Resultados	65
4.5	Discusión	68
4.6	Conclusiones.....	71
5.	Conclusiones finales y recomendaciones	72
5.1	Conclusiones.....	73
5.2	Recomendaciones	74
6.	Bibliografía.....	77

Lista de imágenes

	Pág.
Imagen 1-1: Aislamiento de intestino de Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp)	21
Imagen 1-2: Aislamiento de bacterias lácticas en medio de cultivo MRS y M17	22
Imagen 1-3: Imágenes de microscopía de luz de aislados de bacterias lácticas	23
Imagen 1-4: Hemólisis a generad por algunos aislados de bacilos esporulados y bacterias lácticas.....	24
Imagen 1-5: Zona de inhibición del extracto de bacterias lácticas 019 frente a <i>S. agalactiae</i>	28
Imagen 1-6: Cromatografía Líquida HPLC para el aislado 008BL.....	29
Imagen 1-7: Cromatografía Líquida HPLC para el aislado 019BL.....	29
Imagen 1-8: Visualización bandas de las cepas amplificadas 18BL, 19BL y 008BL, C -control negativo yMPM el patrón de 1000pb	32
Imagen 2-1: Técnica de sry dry para microencapsular microorganismos probióticos	42
Imagen 2-2: Evaluación de la viabilidad de bacterias lácticas (a) y bacilos esporulados (b).....	43
Imagen 2-3: fotografía electrónica de las microcápsulas obtenidas por sry dry ...	43
Imagen 3-1: concentrado para Tilapia con y sin probióticos	55
Imagen 3-2: Colonias de bacilos esporulados (a) y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (b) encontradas en el concentrado con probiótico.....	56
Imagen 4-1: evaluación del peso y la talla de los animales en los tratamientos	63
Imagen 4-2: tanques de experimentación para los tratamientos, concentrados más probiótico y concentrado sin probioticos	64

Lista de gráficos

Gráfico 1-1: Evaluación de la sensibilidad de los aislados probióticos a siete antibióticos comerciales	27
Gráfico 1-2: Zonas de inhibición producidas por los extractos de probióticos frente a <i>S.agalactiae</i> y <i>A.veronii</i>	27
Gráfico 1-3 Evaluación de la cinética de crecimiento del aislado 19BL	30
Gráfico 1-4: Evaluación de cinética de crecimiento del aislado 08BL.....	31
Gráfico 1-5: cinética de crecimiento del aislado 18BL.....	31
Gráfico 2-1; efectos de las variables para la sobrevivencia a la microencapsulación de bacterias lácticas (a) y bacilos esporulados (b).....	44
Gráfico 2-2: superficie de respuesta para <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	45
Gráfico 2-3: superficie de respuesta esperada para <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus polymyxa</i>	45
Gráfico 2-4 sobrevivencia de <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus polymyxa</i> a sales, pH y tiempo de almacenamiento	47
Gráfico 2-5: sobrevivencia de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> a sales, pH y tiempo de almacenamiento	47
Gráfico 3-1: comportamiento de la población de bacilos esporulados y bacterias lácticas en el concentrado con probióticos durante seis semanas de almacenamiento	57
Gráfico 4-1: dispersión de los datos de peso en los 4 tanques de tratamiento	65
Gráfico 4-2: dispersión de los datos para talla en los 4 tanques	66

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: grado de hemolisis generado por microorganismos (Name et al., 2014)	18
Tabla 1-2: condiciones de amplificación empleadas para la PCR de bacterias lácticas.....	20
Tabla 1-3: Pruebas realizadas a los aislados para caracterización probiótica.....	23
Tabla 1-4: bacilos esporulados frente a los analitos	25
Tabla 1-5: Análisis de comparación de medias de los aislados de bacilos esporulados	25
Tabla 1-6 ANOVA para bacterias lácticas	26
Tabla 1-7: Análisis de comparación de medias de los aislados de bacterias lácticas	26
Tabla 1-8: Géneros de bacterias probióticas seleccionadas por los mejores perfiles	33
Tabla 2-1: experimentos para microencapsulación de probióticos	41
Tabla 2-2: Análisis de varianza para <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus polymyxa</i>	46
Tabla 2-3: Análisis de varianza para <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	46
Tabla 3-1: formulación de la dieta para Tilapia con 45% de proteína y 95% de digestibilidad.....	54
Tabla 3-2: Exigencias formuladas por el ICA para análisis microbiológico de concentrado para peces	55
Tabla 3-3: resultados microbiológicos para concentrado con probióticos	56
Tabla 3-4: resultados microbiológicos para concentrado sin probióticos	56
Tabla 4-1: Distribución de la dieta de acuerdo a la biomasa de Tilapia de cada tanque	63
Tabla 4-2: Análisis de Varianza para Peso	65
Tabla 4-3: Análisis de Varianza para talla.....	65
Tabla 4-4: Comparaciones Múltiples para talla por tratamiento	66
Tabla 4-5: comparaciones múltiples para peso	66
Tabla 4-6: número de peces en cada tanque al inicio y al final del experimento y % de vivos por tanque.....	67
Tabla 4-7: parámetros zootécnicos aplicados a cada población alimentada con y sin probióticos.....	67
Tabla 4-8: promedio de los parámetros ambientales mantenidos en los tanques de tratamiento durante la investigación	67

1. Probióticos y peces: Generalidades

1.1 Introducción

La mayoría de los microorganismos considerados como probióticos pertenecen a las bacterias ácido lácticas, siendo los géneros más representativos: *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium* entre otros. Estos microorganismos producen una serie de metabolitos como ácido láctico, ácido acético, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y bacteriocinas; capaces de inhibir el crecimiento de organismos patógenos, generando en ellos lisis celular. Es por esto que los probióticos han sido considerados de gran valor tecnológico, especialmente por la capacidad de controlar patógenos de origen fúngico y bacteriano en el hombre y en los animales (SNYDMAN, 2008).

Muy poco se conoce sobre la biodiversidad microbiana intestinal de las especies acuícolas, la evaluación del potencial de bacterias con actividad probiótica en peces como Tilapia roja, constituye un punto de partida para la nutrición funcional de ellos mismos, con especies probióticas nativas, las cuales podrán reemplazar o reducir el uso de antibióticos promotores de crecimiento, generando producción limpia y el aumento de absorción alimentaria (Ringo et al., 2010).

Los microorganismos probióticos se han usado comúnmente como suplementos alimenticios en los humanos y en los animales, con el propósito de alterar la microbiota intestinal, aumentando la población microbiana benéfica del tracto gastrointestinal y mejorando el consumo de alimentos y su digestión (Montes Ramírez, 2013).

La investigación en cepas nativas probióticas es un área en desarrollo, que ha fortalecido la bioprospección de microorganismos con actividad industrial y habilidades especiales; la explotación de los microorganismos probióticos aislados y caracterizados de especies específicas; mejoran sustantivamente la producción y conversión alimentaria del animal permitiendo una estrategia de reemplazo al uso indiscriminado de antibióticos promotores de crecimiento que se suministran a los animales de abasto para prevenir las enfermedades; favoreciendo la aparición de cepas bacterianas multiresistentes (Ng, Kim, Romano, Koh, & Yang, 2014).

Debido a que los procesos de fabricación industrial pueden alterar en gran medida las propiedades funcionales de los microorganismos probióticos, se hace necesario implementar estrategias que permitan preservar su viabilidad y funcionalidad, constituyendo este, en uno de los retos para la tecnología alimentaria. Una de las alternativas planteadas es la adición de probióticos en una matriz garantizando que los microorganismos lleguen vivos y en óptimas condiciones a su lugar de acción dentro del organismo vivo.

La microencapsulación, es una de las técnicas para asegurar la viabilidad del probiótico, aun en alimentos que no cumplen con la característica de prebiótico, manteniendo la estabilidad del microorganismo (Fritzen-Freire et al., 2012), hasta su consumo. Actualmente, los suplementos nutricionales consumidos tanto en la alimentación humana como animal son importados y se producen bajo condiciones ambientales y nutricionales ajenas a las nuestras, disminuyendo los resultados que podrían generar si tuvieran un alto nivel de especificidad.

Este proyecto responde a las necesidades biotecnológicas del país, en cuanto a la obtención de los microorganismos eficientes y la producción limpia; sin embargo una de las principales problemáticas en el consumo de probióticos es mantener las cepas vivas durante todo el proceso de producción del concentrado, además de asegurar la viabilidad de estas durante el tiempo de permanencia del alimento en anaquel. Es por esto que, en este proyecto, se propuso una metodología de caracterización y selección de agentes encapsulantes adecuados para la liberación de microorganismos en el intestino de Tilapia, permitiendo que sobrevivan a las condiciones de preparación del concentrado, mejorando, la viabilidad de los microorganismos durante la microencapsulación y la producción del alimento. En esta investigación se pudo comprobar la resistencia de los microorganismos probióticos al proceso de microencapsulación y de esta a la extrusión, liberándose directamente en el intestino de los peces sometidos a los tratamientos, dando como resultado el mejoramiento de algunos parámetros zootécnicos como conversión alimentaria, ganancia de longitud, tasa de crecimiento específica y ganancia de peso.

1.2 Reseña teórica

La acuicultura es uno de los sistemas productivos con mayor rendimiento, aproximadamente 8% anual, con respecto a otro sector productivo alimentario (SOFIA, 2012), representando para muchos países un renglón importante de su economía. La acuicultura continental es quien sustenta el mayor porcentaje de producción anual, siendo la Tilapia uno de los cultivos más importantes.

La **Tilapia roja** (*Oreochromis* sp.), es un cíclido híbrido originario de África e Israel, cuyos hábitos alimenticios son muy amplios, considerando que se alimentan de algas bentónicas fitoplancton, macrofitas, zooplancton, huevos de peces, larvas de peces y detritus (El-Sayed, 2006).

La Tilapia exhibe una tasa de crecimiento máxima a temperaturas que varían entre 25 y 30°C lo cual probablemente ha posibilitado su establecimiento y su comportamiento invasivo en climas tropicales. Sin embargo; difiere de otras especies tanto en su tolerancia a la temperatura del agua como a su salinidad. La Tilapia del Nilo (*O. niloticus*) es la menos tolerantes al frío de las Tilapias cultivadas y prefiere climas tropicales a subtropicales (Mjoun Kamal, Kurt.A, & Brown Michael L., 2010).

La Tilapia generalmente vive en hábitats de agua dulce tales como cursos de agua, humedales, lagos, también en hábitats de estuarios y hábitats marinos, algunas especies e híbridos son altamente eurihalinos (capaces de tolerar un amplio rango de concentraciones de agua salada). La Tilapia azul (*Oreochromis aureus*), Tilapia zillii y Tilapia roja (*Oreochromis* sp) y Tilapia híbrida (*O. mossambicus* y *O. hornorum*) son extremadamente tolerantes en aguas salinas y usadas en acuicultivos de agua dulce. La tolerancia también es evidente en otros híbridos de Tilapia roja, como Tilapia galilee (*Sarotherodon galilaeus*), Tilapia de mentón negro (*S. melanotheron*), Tilapia Mozambique (*O. mossambicus*) y Tilapia zanzibar (*O. hornorum*) (Fitzsimmons, 2007)

Las Tilapias están bien adaptadas a ambientes artificiales de cultivo, ganan peso rápidamente en condiciones óptimas y se reproducen en campo sin necesidad de una infraestructura compleja o un manejo especial (Toledo & García, 2000)

Casi 85 países cultivan Tilapia en alguna escala incluyendo China (un gigante de la acuicultura responsable por la mitad de la producción mundial de Tilapia) y muchos países del sureste Asiático. Entre las especies de Tilapias, la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es la especie más predominantemente cultivada pero al menos otras siete especies y un número de híbridos son también comúnmente cultivados (Gupta and Acosta 2004).

La Tilapia es generalmente producida en granjas de bajos insumos. Los estanques de tierra y los cultivos en jaulas en cuerpos de agua abiertos son los sistemas más comunes. El desarrollo de comercio y máquetin de la Tilapia acoplado con el desarrollo de la industria acuícola es cada vez más intensivo, así es como la industria pesquera

depende cada vez más de los peces cosechados de granjas, en lugar de aquellos capturados en mar (El-Sayed, 2006)

En Colombia, la Tilapia roja *Oreochromis sp* es la especie más explotada de los sistemas de producción acuícolas; el 76% de la producción se da en cautiverio; esta especie es apetecida por su coloración atractiva, la calidad nutricional de su carne y por su facilidad de fileteo (Oviedo P, Brú C, Atencio G, & Pardo C, 2013).

En Colombia se consume aproximadamente **38.393** toneladas métricas anuales de Tilapia las cuales son criadas en estanques y jaulas, según lo reportado por SIPSA (2011); sin embargo, se ha establecido que en estas condiciones se presenta mayor sensibilidad al ataque microbiano en especial por bacterias como *Aeromonas hydrofila*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium columnare* y *Streptococcus sp*, generando importantes pérdidas en la producción (Yi, 1999). Lo anterior, se debe a una producción acelerada y a la cría intensiva que expone a los animales a condiciones estresantes, reflejándose en depresión o inhibición del sistema inmune, promoviendo de esta forma la aparición de enfermedades infecciosas microbianas y grandes pérdidas económicas.

Varios autores (Lai & Yang, 2004)Fitzsimmons, 2007) (El-Sayed 2006), indican que la prevención y control de estas enfermedades han mejorado sustancialmente gracias al uso de agentes antimicrobianos; sin embargo, su utilización continua ha sido cuestionada, debido a la resistencia encontrada en los patógenos, aumentando el número de recidivas e infecciones en el tiempo.

El consumo de aditivos probióticos en la nutrición animal es una estrategia para contrarrestar el crecimiento de microorganismos patógenos y disminuir el consumo de antimicrobianos tanto en humanos como en animales. Las bacterias probióticas controlan los patógenos a través de una variedad de mecanismos metabólicos, entre ellos, la regulación del sistema inmune y la mejora en la microbiota intestinal (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010).

Se ha reportado que en los animales de granja que consumen aditivos probióticos, una vez ingeridos estos microorganismos pueden modular el balance y actividad de la microbiota gastrointestinal, además, de mejorar la homeostasia intestinal (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010)

El uso de probióticos en nutrición, ha sido documentado desde hace ya varias décadas, y recientemente, se ha venido aplicando en la acuicultura (Kesarcodi-Watson, Kaspar, Lategan, & Gibson, 2008; Newaj-Fyzul, Al-Harbi, & Austin, 2014; Pandiyan et al., 2013; Sahu, Swarnakumar, Sivakumar, Thangaradjou, & Kannan, 2008). Aunque, la microbiología intestinal de los peces es un área en exploración, las relaciones ecológicas que se establecen al interior del ducto gastrointestinal son temas inexplorados, sin embargo, el consumo de probióticos por estos animales es una práctica que promueve la producción limpia y el desarrollo de bienestar de ellos, con efectos directos sobre su ecología intestinal (Guo et al., 2009).

1.2.1 Características del tracto intestinal de los peces

El conducto gastrointestinal del pez, básicamente, es un tubo muscular forrado por una membrana mucosa de células epiteliales con variaciones en estructura y función, característica aprovechada por algunos microorganismos altamente específicos para alojarse en compartimentos o sitios concretos del intestino (Pandiyán et al., 2013). Al igual que en los demás monogástricos se establecen comunidades microbianas que pueden depender de factores nutricionales, genéticos y ambientales, sin embargo, los microorganismos presentes en el ambiente inmediato de las especies acuáticas, tienen mayor influencia en la salud, que en el caso de los animales terrestres o humanos (Ramos et al., 2013).

La microbiota intestinal de organismos acuáticos probablemente comprende aquellas de origen nativo junto a niveles artificialmente altos de bacterias transitorias mantenidas por su constante ingestión del agua circundante (Balcázar et al. 2006). En la actualidad, es una práctica aceptada el consumo de bacterias lácticas y bacilos esporulados con actividad probiótica desde los primeros días de vida (Ramos et al., 2013)

1.3 Probióticos

Generalmente, se entiende como probiótico, la capacidad de ciertas bacterias para promover la salud de otros organismos; términos como bacterias amigables, saludables o benéficas son también comúnmente utilizados, sin embargo, por su extensa funcionalidad se han clasificado dentro del grupo de nutraceuticos. Investigadores como (Lilley DM ; Stillwell RH, 1965) describieron el término probiótico, como las sustancias secretadas por los microorganismos capaces de estimular el crecimiento de otros. El reporte de la FAO/WHO (Jiménez, 2010), indica que los probióticos son organismos vivos, los cuales al ser consumidos en cantidades adecuadas confieren al hospedero salud y bienestar.

Actualmente, se encuentran disponibles preparaciones de probióticos, que se han introducido como aditivos alimenticios, en diversas granjas ya se han incorporado directamente en la alimentación de cultivos de peces, camarones y moluscos, determinando que proporcionan salud, bienestar y aumento de parámetros zootécnicos como ganancia en peso y conversión alimentaria, entre otros, en estos animales (Mohapatra, Chakraborty, Kumar, Deboeck, & Mohanta, 2013).

La mayoría de los probióticos propuestos como agentes de control biológico pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* sp, *Lactococcus* sp, *Carnobacterium* sp, *Pediococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*) y *Bacillus* sp entre otros. Estas bacterias utilizan varios mecanismos para generar impactos positivos en los peces; entre los que se citan:

1. Exclusión competitiva de bacterias patógenas (SNYDMAN, 2008), los probióticos tiene la facultad de competir por los sitios de adhesión al epitelio intestinal, favoreciendo

la disminución de microorganismos patógenos presentes en el intestino (Mohapatra et al., 2013)(Martínez Cruz et al. 2012).

(Irianto & Austin, 2002) reportaron que cepas bacterianas asociadas a mucosa intestinal de Turbot (*Scophthalmus maximus*), suprimen el crecimiento del patógeno *V. anguillarum*. En trucha arco iris (Ramos et al., 2013), publicaron 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 forunculosis.(Ng et al., 2014), en estudio realizado con Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), reportaron actividad probiótica de *Citrobacter freundii*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus firmus* contra *Aeromonas hydrophila*(Cai, Li, & Ma, 2004).

2. Fuente de nutrientes y contribución enzimática a la digestión: Cuando se consumen estos microorganismos sintetizan una serie de metabolitos que son considerados nutrientes como: el ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y otros componentes, potencian el crecimiento e inmunidad y confiere resistencia a enfermedades mediante exclusión competitiva. (A. M. Larsen, Mohammed, & Arias, 2014). (Lara-Flores, Olvera-Novoa, Guzmán-Méndez, & López-Madrid, 2003) aseguran que una mezcla de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, mejoran el desempeño y las tasas de crecimiento en la Tilapia *O. niloticus*, hallazgos similares fueron reportados por (Wang, Tian, Yao, & Li, 2008).

3. Potenciar la respuesta inmune contra microorganismos patógenos: Los microorganismos probióticos tienen la propiedad de promover la producción de inmunoglobulinas en el hospedero, situación que favorece la protección contra patógenos, en acuicultura esta protección se realiza especialmente contra los géneros *Aeromonas* sp , *Plesiomonas* sp, representantes de la familia Enterobacteriaceae, *Bacteroides* sp (bacterias anaerobias obligadas), *Fusobacterium* sp y *Eubacterium* sp. (Nayak, 2010) además, de los efectos antivirales que se le conocen.

4. Mejora la calidad del agua: esta característica ha sido asociada a *Bacillus* sp, porque convierte la materia orgánica en productos asimilables por los animales, como aminoácidos, dextrinas y oligosacáridos disponibles. Estas mejoras lo han reportado (Sugita, Hirose, Matsuo, & Deguchi, 1998) en estudios realizados camarones jóvenes, donde el uso de *Bacillus* sp, mejoró la sobrevivencia, las tasas de crecimiento y los parámetros de calidad de agua de la especie

1.3.1 Pruebas para caracterización de probióticos

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe resistir ciertas condiciones entre las que se incluyen tolerancia a pH ácidos, sales biliares del 0,3%, NaCl 2%, resistencia a la acción de enzimas como lisozimas y tripsinas; además, un microorganismo probiótico debe tener efectos bactericidas sobre microorganismos patógenos disminuyendo su crecimiento (Lara-Flores et al., 2003).

La manera más común de seleccionar un probiótico es mediante las pruebas de antagonismo *in vitro*, en el cual los patógenos son expuestos al probiótico o a sus productos extracelulares ya sea en un medio líquido o sólido, (Lara-Flores et al., 2003; Martínez Cruz et al., 2012). Sin embargo, este tipo de ensayos y sus resultados no deben considerarse como pruebas contundentes para predecir el comportamiento o efecto *in vivo* de estos microorganismos (Irianto & Austin, 2002). Es así, como estudios realizados con salmones y truchas muestran lo contrario, la respuesta antagonista que presenta *Pseudomonas fluorescens* (cepa AH2), contra *Aeromonas salmonicida*, no confiere al Salmón del Atlántico protección contra la furunculosis, pero si es muy efectivo para proteger a la trucha arco iris, contra la vibriosis (Sugita et al., 1998). Por lo anterior, se deben tener en cuenta características como el origen, en este caso es preferible usar cepas aisladas del hospedero, seguras y que contengan la habilidad de sobrevivir al tránsito gastrointestinal y en este medio ser capaces de resistir a las sales biliares, al pH bajo y a la actividad de las proteasas. Otro criterio de selección comúnmente, usado es la capacidad del probiótico de colonizar y de adherirse al epitelio intestinal, lo cual reduce o previene la colonización por los patógenos. Finalmente, se desea que el probiótico sea viable bajo condiciones normales de almacenamiento y tecnológicamente adecuado para propósitos industriales, además, de que sea suministrado al hospedero o adicionado al medio (Doron & Snyderman, 2015).

1.3.2 Importancia de los probióticos en la industria alimentaria

Los probióticos tienen innumerables funciones como: promover el balance intestinal, disminuir los microorganismos patógenos, absorber alimentos y proporcionar bienestar animal, lo cual se ve reflejado directamente en el aumento de los parámetros zootécnicos (Kruis 2013, Chaucheyras-Durand & Durand, 2010; Garcia-marengoni, Moura, Tavares, & Oliveira, 2015; Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E. & Cintas, 2013; Pérez, Laurencio, Milián, Rondón, & Arteaga, 2012; Saadatzadeh, Fazeli, Jamalifar, & Dinarvand, 2013)

Los probióticos surgen ante la necesidad sentida que presenta actualmente la industria de pre mezclas y aditivos, con respecto al reemplazo de los antibióticos promotores de crecimiento por agentes naturales. Por lo anterior, se hace necesario la implementación de estrategias que aseguren la viabilidad de los microorganismos dentro de una matriz alimentaria, la cual normalmente no cumple la condición prebiótica que necesita el microorganismo para asegurar su sobrevivencia, de tal manera que lleguen activos y viables , en una concentración aproximada de 1×10^6 UFC/por gramo de alimento al momento de consumirlo (Montes Ramírez, 2013). Una estrategia para solucionar esta problemática y que el producto cuente con las características necesarias es la microencapsulación.

1.3.3 Microencapsulación

Microencapsular es cubrir con material encapsulante sustancias sólidas, gotas líquidas o gases o microorganismos y de esta forma se da lugar a la formación de microcápsulas de tamaños que oscilan de 1-100 μm (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; Gbassi & Vandamme, 2012). Una microcápsula consiste en una membrana semi-permeable, esférica, delgada y fuerte alrededor de un centro sólido/líquido. Las sustancias que se microencapsulan pueden ser vitaminas, minerales, colorantes, prebióticos, probióticos, sabores nutraceúticos, antioxidantes, olores, aceites, enzimas, bacterias, perfumes, drogas e incluso fertilizantes (Parra, 2011). Para microencapsular se requiere normalmente polisacáridos como el agar agar, carragenina, goma arábica, quitosano, dextranos, almidón, maltodextrina, celulosa, alginato de sodio y oligosacáridos, entre otros (Montes Ramírez, 2013).

Algunos oligosacáridos como el jarabe de maíz, sucrosa y maltodextrina se utilizan frecuentemente como agente protector a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos (Riaz & Masud, 2013). Además del agente encapsulante también se emplean sustancias prebióticas como la inulina y los oligofruktanos (Kaur, Chopra, & Saini, 2002), los cuales por sus características mantienen la integridad del microorganismo (Riaz & Masud, 2013).

1.3.4 Técnica *Spraydrying* para microencapsular probióticos:

El secado por spray, atomización o secado por aspersión, es la técnica más utilizada en la industria de alimentos debido a su alta reproducibilidad y economía, (Montes Ramírez, 2013), esta técnica consiste en atomizar una emulsión o suspensión que contenga el compuesto o microorganismos a encapsular y un material polimérico dentro de una cámara con un gas caliente, generalmente aire, el cual promueve la evaporación del agua, logrando que los microorganismos queden atrapados dentro del material encapsulante dando lugar a la formación de micropartículas (Anekella & Orsat, 2013), regularmente se obtienen esferas, pero depende del tipo de material y el proceso. La forma de los encapsulados influye en el mezclado, fluidez y densidad de la partícula (Rodríguez-Barona, Montes, & De J. Ramirez, 2012).

El flujo de alimentación, el flujo del aire, las temperaturas de entrada y salida, son las variables que se deben controlar dentro de los procesos para asegurar la viabilidad de los microorganismos que se microencapsulan, evitando de este modo el daño a las estructuras proteicas y celulares, ocasionado por las altas temperaturas (Goderska & Czarnecki, 2008; Sohail, Turner, Coombes, & Bhandari, 2013; Saadatzaheh et al., 2013; Ré, 1998)

Según Montes (2013) entre las propiedades más importantes de los productos encapsulados mediante secado por aspersión se encuentran las siguientes

Humedad: Debe ser menor al 5% con una actividad de agua (a_w) de 0.15 a 0.30.

Densidad de partícula: Puede variar de 1.2-1.4 g/mL y está influenciada por la presencia de aire en las partículas.

Tamaño de partícula: El tamaño promedio se encuentra entre 5 -150 μm , pero varía en función de la naturaleza del ingrediente activo y el proceso.

En el caso de los probióticos, la microencapsulación ha servido como un agente encargado de garantizar la viabilidad de ellos durante la producción de alimento y controlar su liberación directamente en el intestino (Montes Ramírez, 2013). Sin embargo, para lograr la microencapsulación de probióticos se necesitan materiales encapsulantes que contengan lípidos, proteínas y principalmente carbohidratos tipo polisacáridos u oligosacáridos, para mantener la integridad del microorganismo (Rodríguez-Barona et al., 2012).

En comparación con otros métodos, como liofilización, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta. La mayor eficiencia que se ha reportado de esta técnica, se encuentra entre 96 y 100%, valores superiores en comparación con otros métodos (López, H. y D. Gómez. 2008)

Esta técnica se emplea actualmente para microencapsular microorganismos probióticos asegurando algunas ventajas en su conservación por largos periodos de tiempo, además que es útil pues las microcápsulas controlan la liberación de los microorganismos en el momento y lugar adecuado luego de la ingestión (Sanguansri y Augustin, 2010).

Varios estudios desarrollados con el fin de investigar el rol protector de esta técnica, han demostrado que la microencapsulación de estos probióticos asegura su estabilidad y alta viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos que los contienen (Das *et al.*, 2014) así como durante su liberación en el tracto gastrointestinal (Zanjani *et al.*, 2014; Divya, J.B. y Nampoothiri, K.M., 2015).

Por lo anterior, la utilización industrialmente de probióticos microencapsulados puede ser eficiente, económica y protege la viabilidad de los microorganismos probióticos, entre ellos las bacterias ácido lácticas y bacilos esporulados (Yonekura, Sun, Soukoulis, & Fisk, 2014).

Actualmente, hay variedad de técnicas para microencapsular probióticos, sin embargo, se debe considerar al momento de elegir la técnica empleada, variables importantes como el tamaño de la microcápsula, la conservación de esa microcápsula y la liberación de la misma. El **secado por aspersión (*spray-drying*)** cumple en gran medida estos requerimientos para asegurar la viabilidad del probiótico.

1.3.5 Métodos de liberación

La liberación del contenido de las microcápsulas se puede realizar por hidratación, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. Sin embargo, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la

microcápsula o bien por medio de una membrana que recubra la pared (Saez, Hernández, & Peniche, 2007).

La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad de los componentes de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. Por todo esto, la selección de una matriz o membrana es importante, tiene también especial relevancia, la naturaleza química, morfológica, la temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento de los componentes de la cubierta, ya que pueden disminuir la velocidad de liberación. (Martín Villena, Morales Hernández, Gallardo Lara, & Ruiz Martínez, 2009)

La liberación controlada está definida como un método por el cual agentes o ingredientes están disponibles en sitios y tiempos deseados (Soottitantawat, Yoshii, Furuta, Ohkawara, & Linko, 2003) liberándose a una proporción específica. Esta característica es una funcionalidad clave que puede ser proporcionada por la encapsulación, que a su vez, también proporciona estabilidad al componente atrapado, de tal manera que al momento de liberarlo, éste conserva las mismas propiedades que antes de haber sido encapsulado (Soottitantawat et al., 2003). La liberación del contenido de las microcápsulas está influenciada por la temperatura y el pH; ésta se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Caracterizar cepas de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación

1.4.2 Específicos

- a) Evaluar la actividad probiótica de bacterias lácticas y esporuladas nativas obtenidas del intestino de Tilapia, como posibles candidatos a probióticos (Capítulo I).
- b) Establecer las mejores condiciones de microencapsulación a escala de laboratorio en la obtención de las microcápsulas, que asegure la protección de los microorganismos probióticos (capítulo II).
- c) Evaluar la viabilidad de los probióticos microencapsulados sobre un concentrado para peces, determinando calidad en términos del Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) (capítulo III)
- d) Determinar la desencapsulación del probiótico comparando dos dietas para Tilapia (*Oreochromis* sp), una con probióticos microencapsulados y otra sin probióticos in vivo (capítulo IV).

**I. Aislamiento,
Caracterización de cepas
nativas y Evaluación de
su actividad probiótica**

1.5 Introducción

El grupo de bacterias que se pueden emplear en la alimentación como probióticas, se seleccionan de acuerdo a algunos requisitos que deben cumplir y que han de evaluarse de forma individual para cada cepa. Los efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos, así como otras características deseables para la salud del consumidor, solo pueden ser atribuidos a cada cepa analizada en cada estudio y no se puede generalizar a todas las especies (Snydman, 2008)

Por tanto, los microorganismos potencialmente probióticos deben de ser correctamente identificados a nivel de género y de especie mediante métodos genotípicos, aunque se recomienda también una caracterización fenotípica previa (N. Larsen et al., 2014)}

Para seleccionar una cepa como probiótica se deberían realizar, en primer lugar, estudios *in vitro* apropiados para establecer los posibles beneficios de los probióticos para la salud antes de emprender ensayos *in vivo*. Es conveniente que, según el beneficio previsto para la salud, se lleven a cabo pruebas que revelen la capacidad para tolerar el medio ácido y la presencia de sales biliares, la potencialidad para producir sustancias antimicrobianas y capacidad para adherirse a las células del intestino humano, entre otras (Vanderhoof & Young, 2008).

1.6 Objetivo desarrollado

Evaluar la actividad probiótica de bacterias lácticas y esporuladas nativas obtenidas del intestino de Tilapia, como posibles candidatos a probióticos (Capítulo II)

1.7 Metodología

Se realizó en los laboratorios de Microbiología industrial de la Corporación Universitaria Lasallista. Para la investigación se emplearon 20 peces de la especie Tilapia (*Oreochromis* sp) en estado alevino y juvenil, provenientes todos del mismo estanque de tierra, ubicado en el municipio de Doradal, Antioquia.

En los ensayos de aislamiento se tuvo en cuenta la longitud de los animales; todos los peces evaluados tenían medidas entre 5-12cm. Los peces se sacrificaron de acuerdo a los protocolos para experimentación animal (Sherwin et al., 2003)

1.7.1 Aislamiento de Bacterias lácticas y Bacilos esporulados

Una vez sacrificados los peces, se separó el intestino, este se lavó varias veces con solución salina estéril, con el objeto de disminuir la carga orgánica y microbiológica que presentaba. El intestino se dividió en tres partes: 1/3, 2/3 y 3/3, de cada una de estas, se aislaron microorganismos por medio de diluciones sucesivas hasta 10^{-3} y de esta dilución se inoculó 0,1mL por siembra en superficie en agar MRS (Man Rogosa y Sharpe de Merck) y M17, para aislar Bacterias ácido lácticas.

La dilución 10^{-1} , se calentó durante 10 minutos a 80°C para aislar bacilos esporulados y se inocularon por agotamiento en superficie en agar Plate Count y en agar Mossel (Merck). Los medios de cultivo inoculados se incubaron bajo las siguientes condiciones: Medio MRS a $37^{\circ}\text{C}/72\text{h}$ /anaeróticamente y Agar Mossel y plate count a $37^{\circ}\text{C}/24\text{horas}$. Transcurrido este tiempo se caracterizaron las colonias morfológicamente y los microorganismos por coloración de Gram y coloración de endospora, posteriormente, se purificaban y conservaban en glicerol al 15% v/v a -80°C .

Para la conservación de los aislados se inocularon 1×10^8 UFC/mL en 2mL de glicerol al 15%v/v estos servirían posteriormente, como stocks para cada uno de los ensayos de probióticos, evitando la resiembra periódica, que podría generar inestabilidad genética en los aislados.

1.7.2 Evaluación del carácter probiótico de los aislados

Los criterios establecidos por la FAO y la OMS (AAVV, 2001) para caracterizar aislados bacterianos compatibles con los probióticos, incluyen la identificación, evaluación de la seguridad y caracterización funcional, la capacidad de llegar vivos al intestino, con base a la resistencia del pH ácido (2,5) del estómago, a (0,3% p/v) de sales biliares del intestino, al efecto de algunas enzimas proteolíticas, no ser patógeno ni toxigénico, adaptarse a la microbiota intestinal y producir sustancias antimicrobianas, entre otras. Una vez el microorganismo ha pasado todas estas pruebas se le considera probiótico.

Para los ensayos de actividad probiótica cada aislado fue activado en medios de cultivo selectivos específicos y se iniciaron las pruebas del desempeño probiótico, las cuales se midieron por espectrofotometría a 630nm

1.7.3 Ensayos de actividad probiótica

En microplatos, fueron inoculados 150uL del caldo selectivo para cada aislado a una concentración de 1×10^6 UFC/mL medidos por Mac Farland y 150 μL 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 incluían 37°C y agitación constante durante 4 horas (Wilches, 2012). Las medidas de absorbancia se realizaban al iniciar el ensayo tiempo 0 y al finalizar las cuatro horas, tiempo 1. Transcurrido este tiempo se tabulaban los resultados presentados por el espectrofotómetro en términos de absorbancia.

Para el análisis de los experimentos se utilizó un diseño por bloques completamente aleatorizados y se realizó mediante el programa Stratgraphics centurión XVI con licencia para la Corporación Universitaria Lasallista.

1.7.4 Ensayo actividad hemolítica.

La hemólisis que pueda realizar una cepa determinada, es un factor limitante para caracterizarla como probiótico. Este factor tiene un efecto directo con antígenos somáticos y/o flagelares capaces de destruir los eritrocitos (Linares Rodríguez & Martínez Menéndez, 2005).

Este ensayo se realizó inoculando una colonia de cada uno de los aislados por el método francés en una placa de agar con 5% v/v de sangre de cordero, los cultivos fueron incubados a 37°C durante 48 h.

Las cepas fueron caracterizadas según el grado de hemólisis producido: α -hemólisis, β -hemólisis, γ -hemólisis, de acuerdo al comportamiento descrito en la tabla 1-1:

Tabla 1-1: grado de hemolisis generado por microorganismos (Name et al., 2014)

α-Hemólisis	Se observa clarificación parcial del medio de cultivo alrededor de las colonias. se produce una degradación de los enlaces alfa de la hemoglobina
β-hemólisis	Se observa clarificación total del medio de cultivo alrededor de las colonias. se produce una degradación de los enlaces Beta de la hemoglobina
γ-hemólisis	No se observa clarificación del medio de cultivo alrededor de las colonias. No se produce ninguna degradación de los enlaces alfa y Beta de la hemoglobina

1.7.5 Sensibilidad a los antibióticos

De acuerdo a las exigencias de la FAO y la OMS en 2001 (Liaskovskii & Podgorskii, 2005), este es un requisito de identificación obligatorio para los microorganismos susceptibles de caracterizarse como probióticos. Todos los aislados se sometieron a las pruebas de resistencia a antibióticos; para este ensayo se emplearon ampicilina, cloranfenicol, amoxicilina, penicilina, estreptomycin, eritromicina y tetraciclina.

Se empleó la prueba de antibiograma con las cepas activadas previamente en caldo MRS para Bacterias lácticas y Caldo nutritivo para bacilos esporulados. Posteriormente se inoculaban en agar selectivo de ellos para cada género y se incubaba a 37°C durante 48 h con los discos de antibióticos Becton Dickinson, BBL, luego se determinaba el diámetro de inhibición en milímetros.

1.7.6 Pruebas de actividad bactericida

En esta prueba se emplearon los aislados con las mejores características de probióticos. Para la preparación de los extractos de los microorganismos, se emplearon caldo nutritivo y caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe, Merck), el primero se enriqueció con 0,2% p/v de extracto de levadura, 0,05% p/v de peptona y 0,05% p/v de NaCl, los aislados de bacilos esporulados se incubaron a 37°C durante 48 horas, aeróbicamente. En el segundo medio de cultivo se incubaron los aislados de bacterias ácido lácticas a 37°C

por 48 horas bajo condiciones anaeróbicas. Al cabo de este tiempo, los cultivos se sometieron a centrifugación, a 4°C por 15 minutos a 6000 rpm, con el fin de remover las células y obtener el sobrenadante (Ramírez, Ospina, Jaramillo, & Patiño, 2007)

En el ensayo de difusión en pozos, se emplearon cajas de petri servidas con agar Nutritivo para los extractos obtenidos de los aislados provenientes de los caldos nutritivos enriquecidos, y para los obtenidos en caldo MRS, se utilizó el agar MRS. Se realizaron 4 pozos con una capacidad de 100uL en cada caja de Petri, donde se adicionó igual volumen del extracto previamente obtenido. Una vez adicionados los extractos en cada pozo, se procedió a realizar la doble capa, la cual consistió en mezclar 10mL del medio de cultivo Muller Hinton (0,8%p/v de agar agar) con 1×10^6 UFC-patógeno/mL, esta mezcla se adicionaba encima del medio que contenía los extractos, se dejaba solidificar y se incubaban a 37°C/24 /aeróticamente, estos ensayos fueron realizados para evaluar la actividad bactericida contra *Aeromonas veronii* aislado directamente de lesiones en piel de Tilapia (*Oreochromis* spp) y caracterizada molecularmente y *Streptococcus agalactiae*, proporcionado por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional, sede Medellín. El control empleado para estas pruebas fueron sensidiscos de antibióticos.

Los resultados fueron leídos como el diámetro de inhibición del crecimiento de la bacteria patógena en Muller Hinton, mostrando un halo transparente alrededor del pozo que contenía el extracto de los microorganismos. El diseño estadístico empleado para las pruebas fue diseño por bloques completamente aleatorizado y para los análisis estadísticos se empleó una prueba de comparación de medias con un nivel de confianza del 95%, usando el programa Statgraphics Centurión con licencia para la Corporación Universitaria Lasallista.

1.7.7 Análisis de los extractos por cromatografía de bacterias lácticas

Los análisis HPLC se realizaron en el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Nacional, el equipo empleado fue Agilent Modelo: 1100 series Detector: UV/VIS, 2 µL, Flujo: 0,5 ml/min Fase móvil: Solución de ácido orto-fosfórico 0.05% Columna: SUPELCOGELTH H, ref.:59304-U, 30 cm x 7.8 mm ID, para cuantificar presencia de ácido láctico.

1.7.8 Curvas de crecimiento

Se procedió a realizar una curva de crecimiento a cada uno de los aislados de bacterias ácido lácticas durante 16 horas; esto con el objetivo de evaluar la capacidad de recuperación de los microorganismos después de haber estado en contacto con los analitos (NaCl, Lisozima, Sales biliares, pH ácido y alcalino). Para esto se tomó 150UL de cada uno de los microorganismos que estuvieron 4 horas con cada uno de los analitos y se depositaron en un nuevo plato de elisa, a estos 150UL, se les adicionó 150UL del

medio selectivo para cada microorganismo y se dejaron en incubación durante 16 horas, tabulando la absorbancia cada 2 horas.

1.7.9 Identificación de los microorganismos aislados

A las cepas que presentaron mejores perfiles de crecimiento se les realizó identificación bioquímica por medio del kit comercial api 50CHL (BAL), e identificación bioquímica siguiendo el manual del Bergey (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994; Kuever & Widdel, 2006) para bacterias esporuladas .

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 científico (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 procariotas 5'- GCG GAT GGG TGA GTA ACA C - 3' y 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3' (BAL) (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). Las condiciones de la PCR se siguieron de acuerdo a lo establecido en la tabla 1-2.

Los bacilos esporulados se identificaron bioquímicamente por API50 y pruebas bioquímicas convencionales establecidas en el manual de Bergeys (hidrólisis de almidón, Voges poskauer, catalasa, citrato, NaCl 6,5%, Nirato, arabinosa).

Tabla 1-2: condiciones de amplificación empleadas para la PCR de bacterias lácticas

Tiempo y temperatura	Proceso
2,0 minutos,95°C	Desnaturalización ADN
30,0 segundos,94°C	Desnaturalización ADN
30,0 segundos,52°C	Anillamiento
45,0 segundos,72°C	Elongación
5,0 minutos,72°C	Elongación
Infinito 4,0°C	Refrigeración

1.8 Resultados

1.8.1 Aislamiento de bacterias

Se obtuvieron un total de 200 aislados a partir de las 20 muestras obtenidas de intestinos provenientes de Tilapias (*Oreochromis sp*) en estado alevinos- juvenil. De estos, 190 aislados correspondieron a bacilos esporulados y 10 a Bacterias Ácido Lácticas, imagen 1-1.

Imagen 1-1: Aislamiento de intestino de Tilapia (*Oreochromis sp*)



a. Tilapia en estado juvenil, b. Corte de intestino, aislamiento de bacterias en el segundo tercio: *Bacillus sp* y Bacterias lácticas, c. Colonias de *Bacillus sp*, d. Colonias de *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus*

Para la identificación de las colonias en los respectivos medios de cultivo se procedió a realizar los extendidos y las respectivas coloraciones tanto de Gram como la coloración de endospora, esta última con el objeto de corroborar la presencia de esporas en los aislados provenientes del agar Nutritivo. Una vez se identificó la colonia como bacilo Gram positivo esporulado, se purificó y a las 24 horas, se procedió a la conservación en Glicerol al 15% v/v a -80°C .

Los mismos procedimientos, excepto la coloración de endospora, se aplicaron para los aislados provenientes del medio de cultivo MRS, que se caracterizaron por ser cocos

Gram positivos y bacilos Gram positivos no esporulados, estos se purificaron en agar M17 y MRS, posteriormente se procedió a realizar todos los protocolos de conservación para bacilos esporulados imagen 1-2, 1-3, 1-4 y 1-5.

Imagen 1-2: Aislamiento de bacilos esporulados en medio Plate count

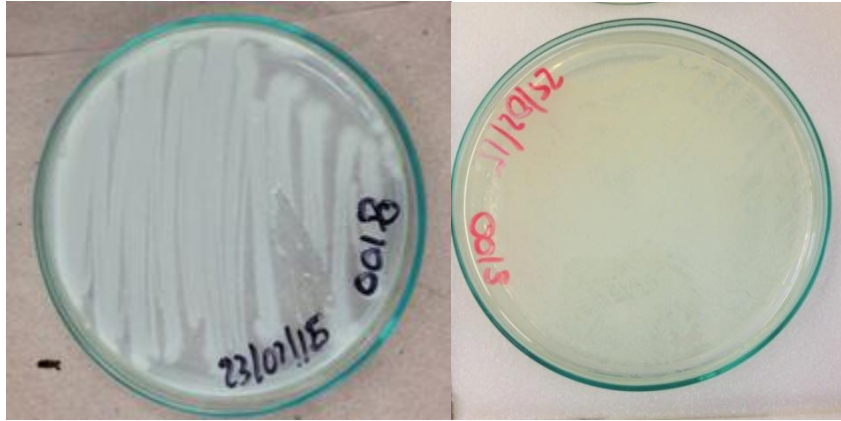


Imagen 1-3: Imágenes de microscopía de luz de aislados de bacilos esporulados (100X)

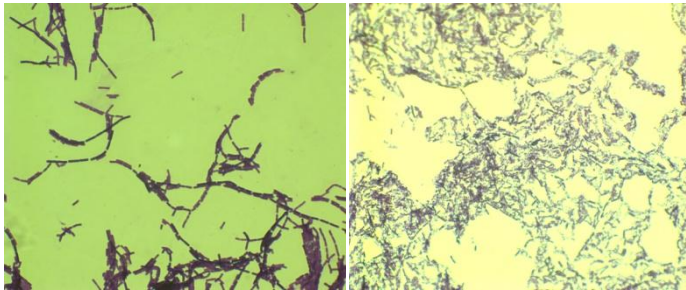


Imagen 1-2: Aislamiento de bacterias lácticas en medio de cultivo MRS y M17

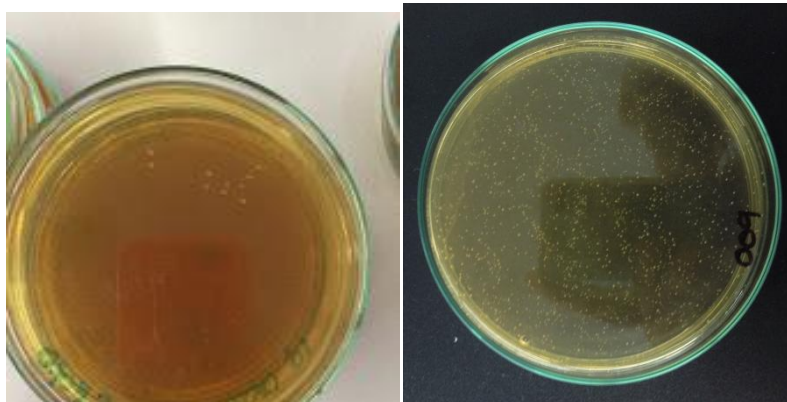
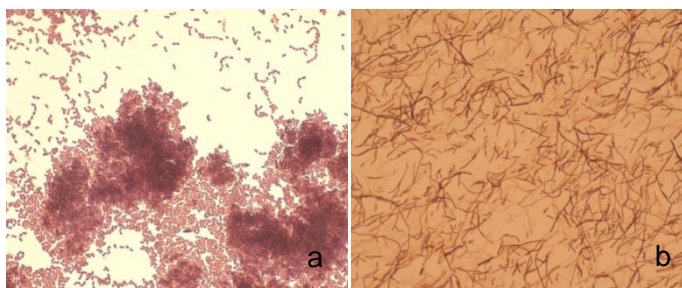


Imagen 1-3: Imágenes de microscopía de luz de aislados de bacterias lácticas

a. Cocos Gram positivos 100x, b. Bacilos Gram positivos 100x

1.8.2 Ensayos de actividad probiótica

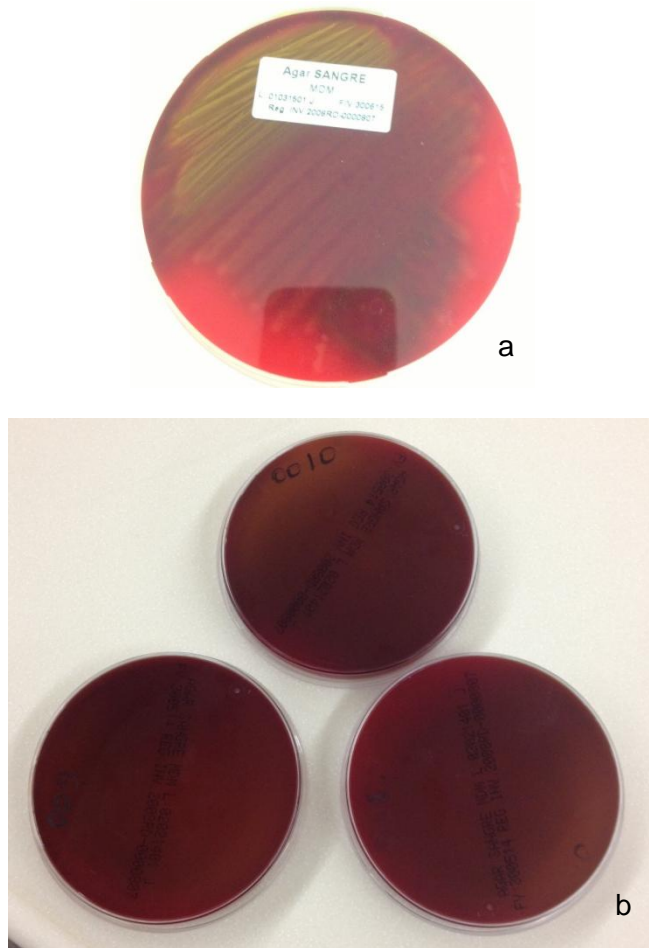
A cada uno de los aislados se le midió la resistencia a los analitos previamente descritos; mediante los valores arrojados por espectrofometría más la evaluación de hemólisis de los aislados. Los aislados que fueron susceptibles a los efectos de los analitos se descartaron, e igualmente los que presentaron hemólisis β y α imagen 1-6. La tabla 1-3 resumen las pruebas realizadas a todos los aislados, tanto de bacilos esporulados como de bacterias ácido lácticas.

Tabla 1-3: Pruebas realizadas a los aislados para caracterización probiótica

Aislados bacterianos	pH 2,5	pH 8,5	Sales biliares 0,3%p/v	NaCl 2%	Lisozima 0,5UI	Antibióticos	Hemólisis
16B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
15B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
19B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
07B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
10B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
6AB	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
14B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
4B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
13B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
18B	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
019BL	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
018BL	R	R	R	R	R	S	No hemolítica
008BL	R	R	R	R	R	S	No hemolítica

*R: Resistente, *S: sensible

Imagen 1-4: Hemólisis a generada por algunos aislados de bacilos esporulados y bacterias lácticas



a. Hemólisis a obtenida en agar sangre: Aislado 001 de bacilos esporulados, b. Hemólisis a obtenida en agar sangre: Aislado 0010 de bacilos esporulados

Después de realizar todos los ensayos de resistencia y de hemólisis se seleccionaron 12 aislados del género *Bacillus* sp y 3 aislados de bacterias ácido lácticas, todos ellos mostraron los mejores perfiles de resistencia en la evaluación por espectrofotometría.

Los aislados correspondientes a bacilos esporulados se denominaron así: 16, 15, 17, 19, 07B, 10, 6A, 14, 6B, 4, 13, 18; y las bacterias lácticas como 019BL, 018BL, 008BL.

Cada uno de los grupos bacterianos se analizó de forma independiente, debido a que las condiciones de crecimiento de ellos son completamente diferentes. Por lo que se realizó un análisis de varianza, determinando si hubo o no diferencias en el crecimiento de los aislados después de las 4 horas que estuvieron en contacto con los analitos dentro del espectrofotómetro y un análisis de comparación de medias para determinar cuál de ellos presentaba los mejores perfiles de resistencia. Los resultados se observan en las tablas 1-4 y 1-5.

Tabla 1-4: 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	2,49816	16	0,156135	4,06	0,0001
Residuo	1,99743	52	0,0384121		
Total (Corr.)	4,49559	68			

Tal cual como se observa en la tabla 1-5, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de crecimiento de cada uno de los aislados de bacilos esporulados frente a los analitos, $p < 0,05$.

Tabla 1-5: Análisis de comparación de medias de los aislados de bacilos esporulados

<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
6 ^a	0,505	0,0575771	XX
13	0,54625	0,0575771	X
6B	0,547667	0,0575771	X
18	0,739167	0,0575771	X

En la tabla 1-6, se puede observar que los aislados 13, 6B y 18, presentaron más heterogeneidad en la respuesta frente a los analitos, además presentaron diferencias entre las medias al compararse con los demás aislados.

En la tabla 1-7, se puede apreciar el análisis de varianza para bacterias ácido lácticas, donde sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de los aislados cuando fueron sometidos al efecto de los analitos, $p < 0,05$.

Tabla 1-6 ANOVA para bacterias lácticas

<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 1-7: Análisis de comparación de medias de los aislados de bacterias lácticas

<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

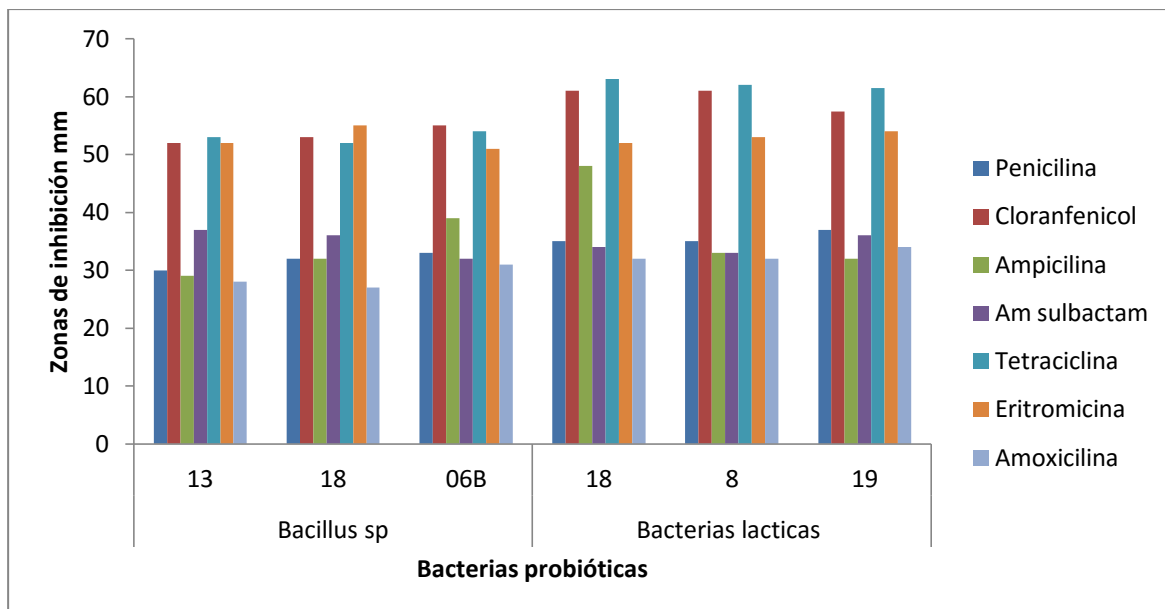
Los resultados de las pruebas de comparación de medias, tabla 1-8, confirman que los tres aislados presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Los aislados que presentaron diferencias significativas en ambos grupos, bacterias ácido lácticas y bacilos esporulados, fueron seleccionados para la realización de los estudios posteriores.

1.8.3 Sensibilidad a los antibióticos

Esta evaluación se realizó con 7 antibióticos comerciales diferentes, midiendo las zonas de inhibición alrededor del antibiótico, un halo superior a 2mm es indicativo de que el antibiótico es efectivo frente al microorganismo en estudio.

Como en todas las pruebas, los halos fueron superiores a 2mm, se puede afirmar que estas bacterias probióticas son sensibles a los antibióticos. Los antibióticos que presentaron la inhibición más alta, mayor a 5 mm, fueron el cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina; estos resultados se deben, probablemente, a que son antibióticos de amplio espectro con efecto directo en síntesis proteica, gráfico 1-1.

Gráfico 1-1: Evaluación de la sensibilidad de los aislados probióticos a siete antibióticos comerciales

1.8.4 Ensayos de actividad bactericida

Con los seis aislados seleccionados por presentar los mejores perfiles probióticos, se llevaron a cabo los ensayos de inhibición frente a dos patógenos en peces, *Aeromonas veronii*, aislada de una lesión de Tilapia (en este estudio) y *Streptococcus agalactiae* facilitado por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional, sede Medellín. Estos microorganismos fueron seleccionados por que generan infecciones en Tilapia, .

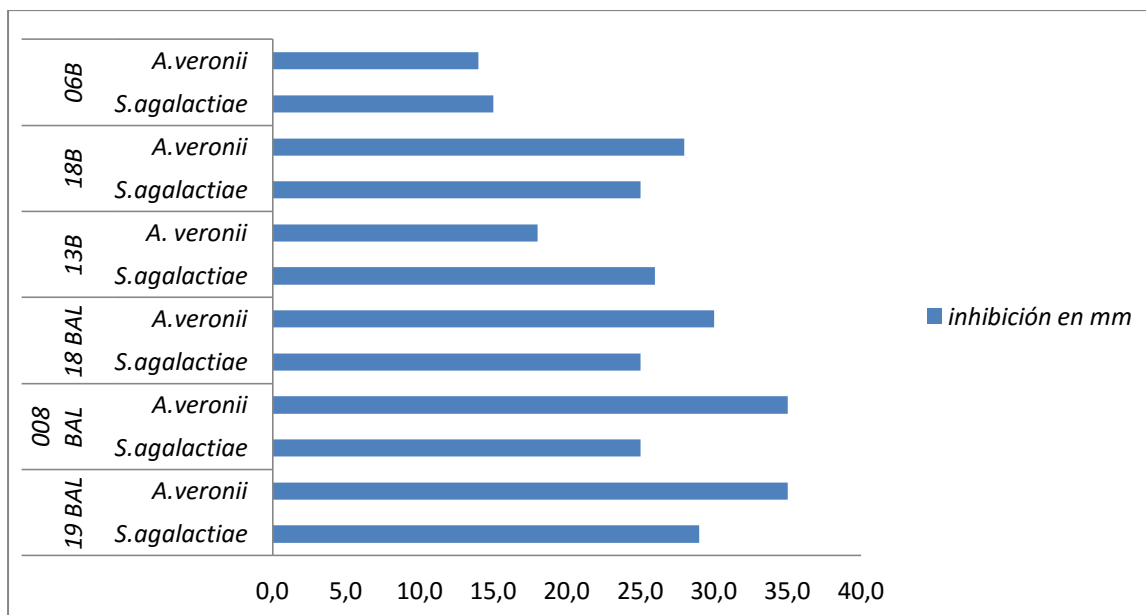
Gráfico 1-2: Zonas de inhibición producidas por los extractos de probióticos frente a *S.agalactiae* y *A.veronii*

Imagen 1-5: Zona de inhibición del extracto de bacterias lácticas 019 frente a *S. agalactiae*

En los resultados encontrados se observó que la bacteria más sensible al efecto de los extractos tanto los de bacilos esporulados como los de bacterias lácticas fue *A. veronii* con halos de inhibición hasta de 35mm. Siendo los extractos de bacterias lácticas los que presentaron la mejor acción sobre los dos aislados del estudio, tanto para *A. veronii* como para *S.agalactiae*.

Los extractos presentaron un comportamiento diferente cuando el ensayo se realizó frente a *Streptococcus agalactiae*, la inhibición fue menor a las encontradas frente a *A.veronii*, excepto las encontradas en el aislado 13 de bacilos esporulados que mostró mayor efecto sobre este patógeno. En la imagen 1-7 se puede observar el comportamiento antibacteriano del extracto de bacterias lácticas frente a *S. agalactiae*. El extracto que presentó la actividad bactericida más baja fue el extracto del aislado 6B. Los resultados se observan en el gráfico 1-2.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza, mostraron que tanto el valor P para el control de *A. veronni* como para el *S.agalactiae*, fue mayor de 0.05 ($P>0.05$), lo cual significa que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad bactericida de los extractos de bacterias lácticas y de bacilos esporulados, frente a cada uno de los patógenos estudiados, con un nivel de confianza del 95%.

1.8.5 Análisis de los extractos por cromatografía de bacterias lácticas

Para los análisis de cromatografía HPLC, se decidió enviar a evaluación los extractos de las bacterias lácticas 019BL y 008BL, por presentar los mejores perfiles bactericidas frente a los dos patógenos antes mencionados.

Los análisis HPLC se realizaron en el equipo Agilent Modelo: 1100 series Detector: UV/VIS, 2 μ L, Flujo: 0,5 ml/min Fase móvil: Solución de ácido orto-fosfórico 0.05% Columna: SUPELCOGELTH H, ref.:59304-U, 30 cm x 7.8 mm ID.

Por cromatografía líquida HPLC, se comprobó la presencia de ácido láctico en los dos aislados de bacterias lácticas: 019BL y 008BL, confirmando el carácter fermentador de estos dos los resultados se observan en la imagen 1-6 y 1-7.

Imagen 1-6: Cromatografía Líquida HPLC para el aislado 008BL

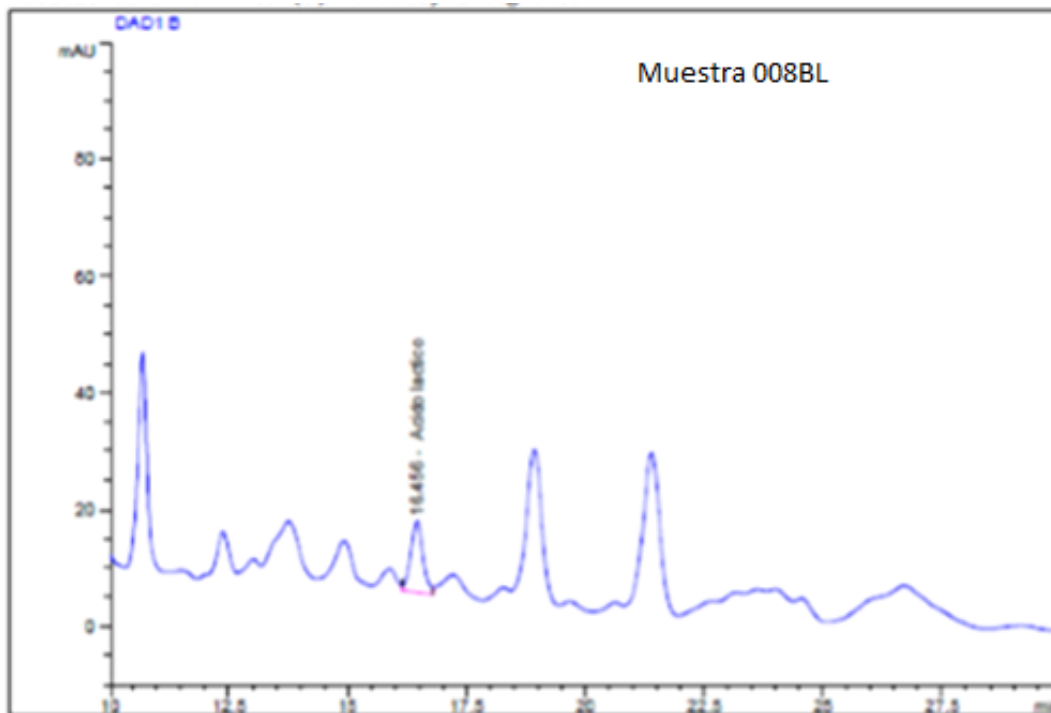
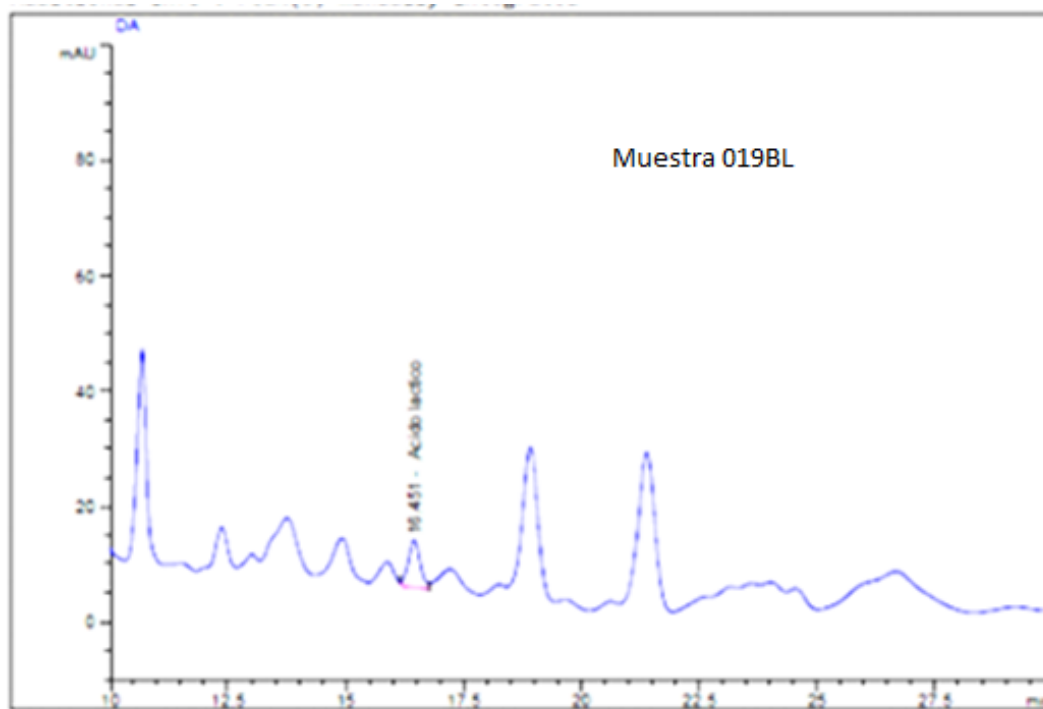


Imagen 1-7: Cromatografía Líquida HPLC para el aislado 019BL



1.8.6 Curvas de crecimiento para bacterias lácticas

Como no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados de bacterias lácticas, se procedió a realizar una curva de crecimiento a cada una de ellas durante 16 horas y se graficaron los resultados de la absorbancia vs tiempo.

En las gráficas 3-4, 3-5 y 3-6, se puede observar la capacidad de recuperación que tiene cada uno de los aislados de bacterias lácticas posteriormente al contacto con los analitos, el aislado 19BL muestra las curvas de recuperación más pronunciadas durante las 16 horas, evidenciando la capacidad de respuesta del aislado al efecto de las sales, NaCl 2%, pH 2,5, pH 8,5 y lisozima 5UI, situación que no ocurrió en el aislado 008BL y 18BL, donde se observa que los aislados no se recuperan al efecto del pH alcalino.

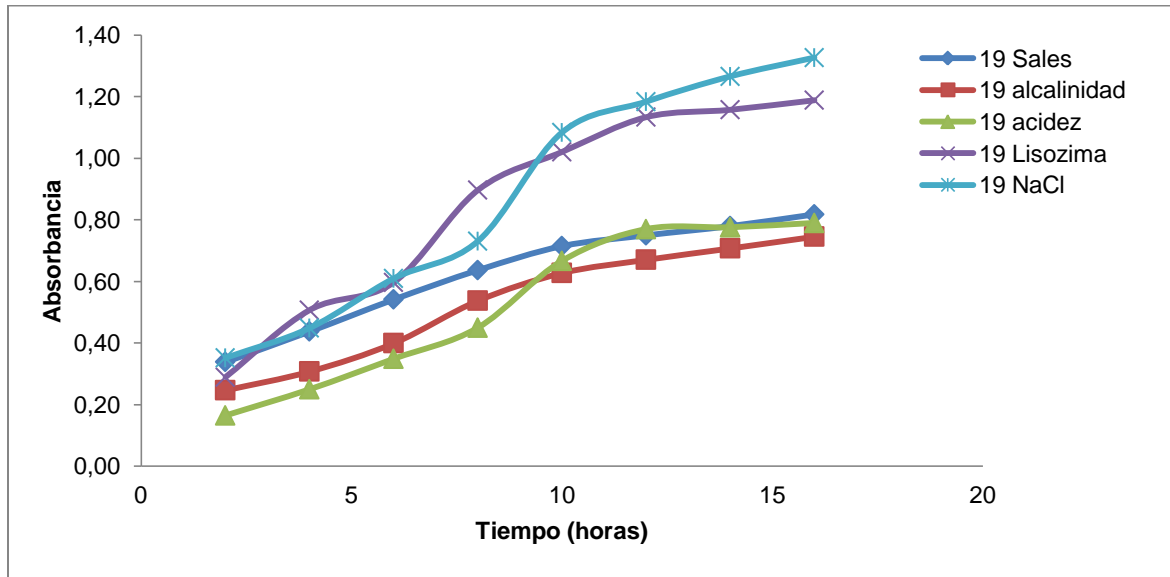


Gráfico 1-3 Evaluación de la cinética de crecimiento del aislado 19BL

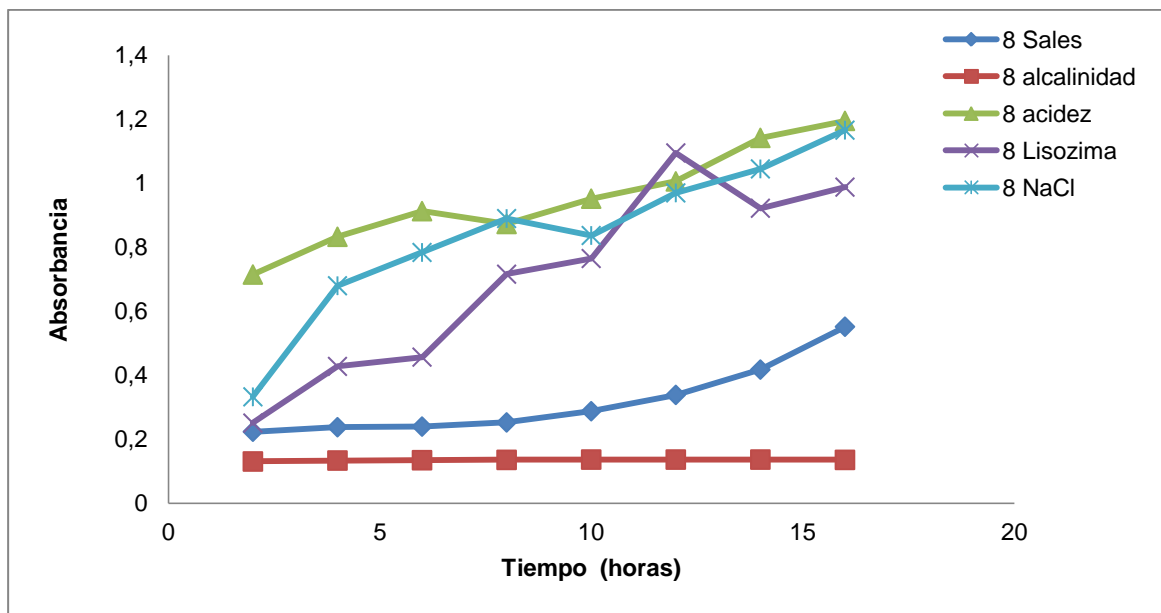


Gráfico 1-4: Evaluación de cinética de crecimiento del aislado 08BL

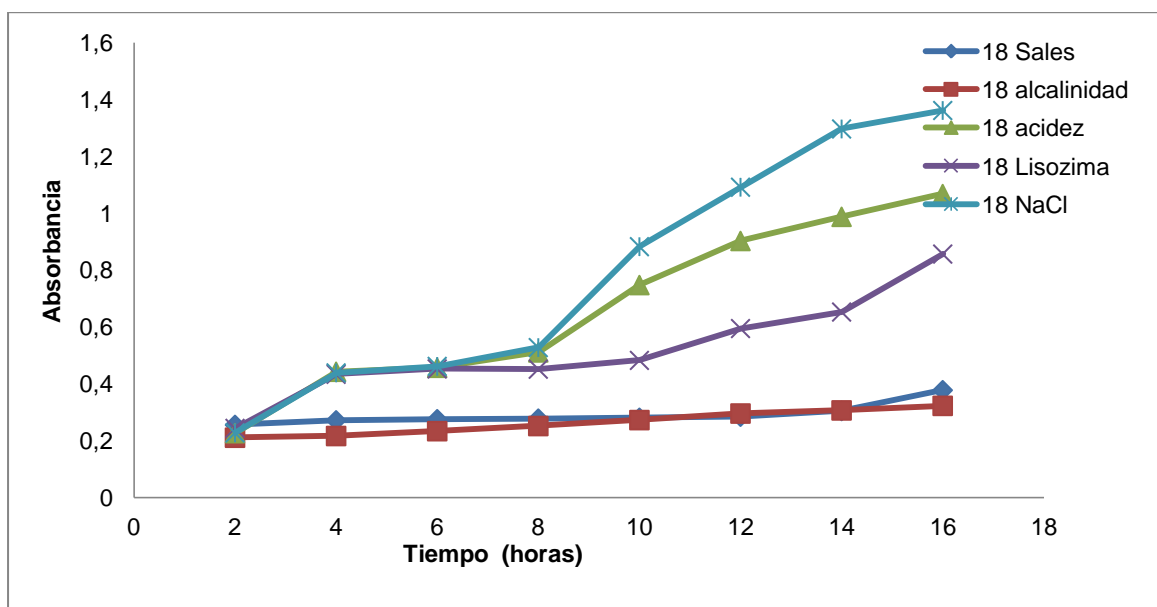


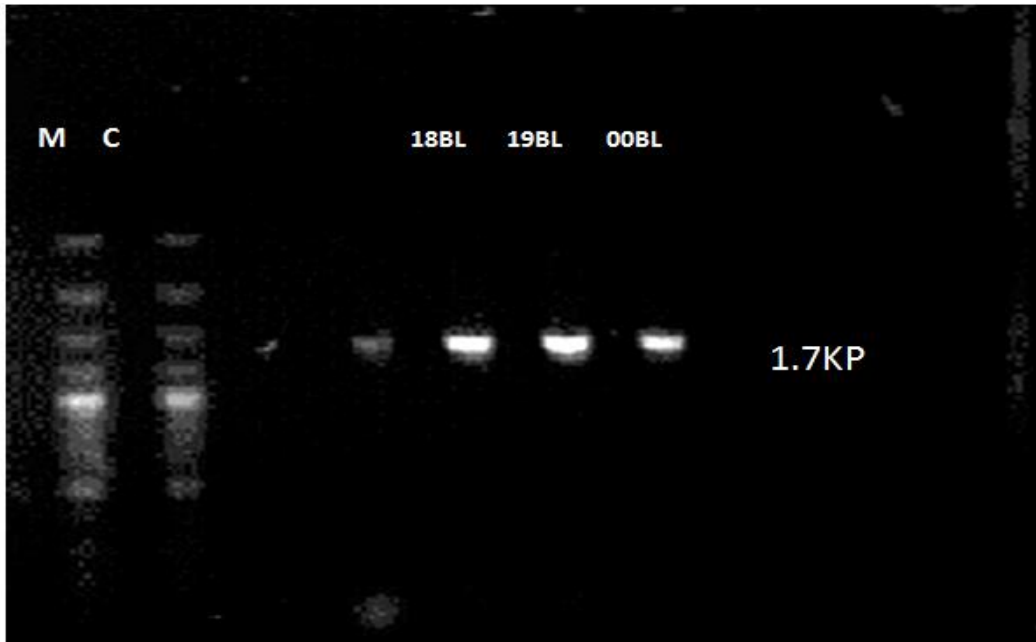
Gráfico 1-5: cinética de crecimiento del aislado 18BL

De acuerdo a todos los resultados obtenidos tanto de bacilos esporulados como de bacterias lácticas, se pudo decidir con cuales aislados se continuaban los ensayos del proyecto: los aislados de bacilos esporulados 13 y 18 y de bacterias lácticas el aislado 19.

1.8.7 Caracterización molecular y bioquímica de los aislados

Se realizaron las PCR utilizando el ADN genómico extraído de cada uno de los aislados de bacterias láctica, obteniendo bandas bien definidas de 1.7kb correspondientes al tamaño del gen 16S ribosomal, sin inespecificidades y sin degradación (imagen 1-8). Las muestras amplificadas fueron secuenciadas, y editadas con la ayuda del programa Bioedit y de Blast, usando las secuencias R y F para construir el ensamble de los fragmentos de cada aislado. Los análisis de secuenciación de las bases nitrogenadas concluyeron que los aislados de bacterias lácticas fueron identificados así: aislado 18BL, *Lactococcus lactis*; el aislado 008BL como *Lactococcus lactis* y el aislado 19BL como *Lactobacillus delbruecki* sub *bulgaricus*.

Imagen 1-8: Visualización bandas de las cepas amplificadas 18BL, 19BL y 008BL, C -control negativo yMPM el patrón de 1000pb



Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con etvioison

De acuerdo a los análisis realizados a los aislados de bacilos esporulados tanto por pruebas bioquímicas como por API, comprobaron que los aislados del genero *Bacillus* correspondieron, 018B a *Bacillus megaterium*, 006B a *Bacillus sphaericus* y 013B a *Bacillus polymyxa*; los resultados se presenta en la tabla 1-9.

Tabla 1-8: Géneros de bacterias probióticas seleccionadas por los mejores perfiles

Microorganismo	Pruebas bioquímicas	Identificación molecular
0018	<i>Bacillus megaterium</i>	
006B	<i>Bacillus sphaericus</i>	
0013	<i>Bacillus polymyxa</i>	
008 BAL	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
0018 BAL	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
0019 BAL	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Lactobacillus delbruecki sub bulgaricus</i>

1.9 Discusión

Los resultados encontrados en esta investigación, confirman lo reportado por otros investigadores (Martinez Cruz, Ibanez, Monroy Hermosillo, & Ramirez Saad, 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; las bacterias lácticas requieren temperaturas mas de mesofilia para sobrevivir.

Una característica importante de todos los bacilos esporulados caracterizados en esta investigación como probióticos, entre ellos *Bacillus megaterium* (018), *Bacillus polymyxa* (013) y *Bacillus sphaericus* (06B), es que todos presentaron los mejores perfiles de desempeño en todas las pruebas. Además de presentar actividad bactericida comprobada contra *S.agalactiae* y *A.veronii*, estos resultados se ratifican con los encontrados por Larsen, Mohammed y Arias (2014) quienes obtuvieron de intestinos de peces 33 aislados de bacilos esporulados, todos con actividad probiótica, encontrando que los bacilos que sobresalieron por su actividad contra bacterias patógenas, susceptibilidad antibiótica, formación de biopelículas y producción enzimática fueron *B. amyloliquefaciens*, *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens*, *B. subtilis subsp. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. polymixa* y *B. megaterium*,

Investigaciones realizadas por Kaynar & Beyatli, (2009) reportaron 30 linajes del género *Bacillus* sp aislado de intestinos de peces en Turquía, identificados como *B. pasteurii*, *B. badius*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. lentus*, y *B. Pumilus*, estos resultados son concordantes con los de esta investigación donde el mayor número de aislados encontrados fue de bacilos esporulados en comparación con la población de bacterias lácticas aisladas.

Vary et al., (2007) encontró que el *Bacillus megaterium*, uno de los aislados identificados como probióticos en la investigación, presenta características importantes; produce penicilina amidasa, amilasas, exoenzimas, deshidrogenasas de aminoácidos y presenta resistencia a las sales, de hecho se considera un microorganismo halófilo, puede tolerar 15% de sales. Este microorganismo presenta efecto antimicrobiano frente a *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio harveyi* y varias cepas de hongos (Vary et al., 2007).

Estos datos confirman la actividad bactericida de este microorganismo tal cual como se observa en los resultados de esta investigación donde el aislado 0018B mostró actividad frente a *A.veronii* patógeno gram negativo. (Nakayama, Lu, & Nomura, 2009)

Kajimura y col (1996) y Naghmouchi y col (2013) estudiaron el *Bacillus polymyxa* y reportaron la capacidad de generar amilasas y antibióticos como polymyxinas; además de generar actividad bactericida contra *Escherichia coli*; (Kajimura & Kaneda, 1996) (Naghmouchi, Baah, Cudennec, & Drider, 2013), cabe anotar que el *Bacillus sphaericus* ha sido ampliamente estudiado por la capacidad de producir biopesticidas y bacteriocinas (Cetinkaya, Osmanağaoğlu, & Cökmüş, 2003; Poopathi & Abidha, 2009).

En esta investigación se aislaron y caracterizaron tres cepas de bacterias ácido lácticas identificadas como *Lactococcus lactis* correspondientes a los aislados 008BL y 0018BL y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus* correspondientes al aislado 019BL, estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas por Ramos y col (2013) en las cuales evidenciaron que los géneros *Lactococcus* sp y *Carnobacterium* sp son habitantes normales del tracto gastrointestinal de algunos peces (Ramos et al., 2013), de hecho el estudio revela los innumerables efectos que genera la presencia de ellos en los peces, como contribución nutricional, protección contra patógenos, producción de componentes antimicrobiales y competencia por los sitios de unión a la mucosa; procesos fundamentales para la modulación de las interacciones.

Estudios realizados por Zhang y col (2013) también confirman la existencia de bacterias ácido lácticas, *Leuconostoc lactis*, del intestino de pargo negro de mar, al igual que en esta investigación sometieron al microorganismo a pHs ácidos y alcalinos, sales biliares y enzimas proteolíticas, presentado resistencia a estos factores además de inhibir el crecimiento de patógenos, presentando susceptibilidad a antibióticos y respuestas positiva a los ensayos de coagregación, caracterizándose entonces como microorganismo probiótico (Zhang, Liu, & Dai, 2013) (Ramírez, Ospina, Jaramillo, & Patiño, 2007). Estos ensayos corroboran los realizados en este estudio donde los aislados de bacterias lácticas soportaron todas las pruebas para probióticos, destacándose el aislado 019BL *Lactobacillus delbrueckii* con los mejores índices de recuperación después de estar en contacto con las pruebas de desempeño (Kruis 2013).

Asimismo, en investigaciones realizadas por Kumar y col (2014) aislaron de intestinos de trucha común (*Salmo trutta*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) diferentes géneros y especies de bacterias lácticas: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CLFP 100, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CLFP 102, *Lactobacillus curvatus* CLFP 150, *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196, *Lactobacillus sakei* CLFP 202, y *Carnobacterium maltaromaticum* CLFP 228. Estas especies exhibieron actividad contra diversos patógenos incluyendo *Aeromonas salmonicida*, *Aeromona hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* (Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M., & Ganguli, 2014)(Das et al., 2014; Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., & Johri, 2012). De forma similar en esta investigación se encontró que los extractos de los seis aislados probióticos presentaron actividad antimicrobiana contra *A. veronii* y *S. agalactiae*; sin embargo, el *Lactobacillus delbrueckii* (019BL) tuvo el mejor perfil de inhibición con halos de 35mm.

Estudios realizados por Kumar y colaboradores (2012) (Kumar et al., 2012), mostraron el poder inhibitorio de una bacteria ácido láctica como *Lactobacillus plantarum*, frente a *A. veronii*, *S. aeruginosa* y *E.coli*, resultado comparado con el de esta investigación donde las bacterias lácticas exhibieron su potencial bactericida frente *A.veronii*. De hecho investigadores como Hatje y colaboradores (2014), también confirmaron el control que ejercen las bacterias lácticas cuando se sometieron conjuntamente con *A.veronii* en las líneas celulares CaCo2, disminuyendo notablemente la adhesión de estos microorganismos a las líneas celulares y generando lisis en ellas(Hatje, Neuman, & Katouli, 2014).

Muñoz y colaboradores en (2013) (Muñoz et al., 2013), realizaron ensayos con bacterias ácido lácticas contra bacterias Gram negativas y Gram positivas patógenas de peces, encontrando un amplio espectro de inhibición; determinando que la actividad de estas bacterias se debía probablemente a la producción de bacteriocinas, y esta sería la razón de los resultados encontrados sobre la inhibición de *A. veronii* y *S. agalactiae*. En los resultados de análisis HPLC realizados a los extractos evaluados de *Lactobacillus delbrueckii* (0019BL) y *Lactococcus lactis* (008BL) se estableció la presencia de ácido láctico, y se determinó que posiblemente el efecto inhibitorio del extracto de bacterias lácticas se debía a la producción del mismo.

Los resultados encontrados en esta investigación mostraron que tanto los extractos de bacterias lácticas como el de *Bacillus sp* controlaron el crecimiento de *S. agalactiae*, con una leve disminución en el diámetro de las zonas de inhibición por parte del extracto de bacterias lácticas, resultados similares fueron mostrados en estudios realizados por (Serna C, Liliana, Valencia H, Leidy Johana, & Campos G, 2015), en donde la actividad antimicrobiana de *Weisella confusa*, bacteria ácido láctica, inhibió patógenos *in vitro* causantes de mastitis como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, un hallazgo importante, no solo por ejercer un control natural sobre mastitis, sino también por el efecto positivo de estos directamente en acuacultivos.

1.10 Conclusión

Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación evidenciaron que en el intestino de *Tilapia* coexisten comunidades de microorganismos, especialmente del genero *Bacillus* sp y proporciones más pequeñas de bacterias lácticas que son susceptibles a caracterizarse como probióticos. Entre otras razones porque controlan de forma efectiva el crecimiento de patógenos como *A.veronii* y *S.agalactiae*. Estos resultados soportan la importancia de seleccionar microorganismos con alto nivel de especificidad, para reintroducirlos posteriormente a la nutrición del animal.

2. Microencapsulación de los aislados probióticos

2.1 Introducción

La encapsulación fue desarrollada entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register con el objeto de aplicar comercialmente un tinte, utilizando la gelatina como material encapsulante. La tecnología de microencapsulación es una tecnología emergente, una vía efectiva que protege los probióticos dentro del alimento, aun este sin ser un buen vehículo probiótico y los conduce viables hasta el lugar apropiado, tracto gastrointestinal, mejorando de esta forma la eficacia del producto a muy bajo costo (Kent & Doherty, 2014). El empleo de microcápsulas es ampliamente utilizado para liberar controladamente sabores, colores, aromas, enzimas, perfumes, drogas, fertilizantes y microorganismos entre otros (Parra, 2011).

El primer microorganismo microencapsulado fue una cepa de *Lactococcus lactis*, una bacteria ácido láctica, la cual fue encapsulada en alginato de calcio; posteriormente la técnica se ha mejorado a través del secado por aspersión, generando niveles de viabilidad de los microorganismos hasta del 96% (Yáñez et al., 2002).

2.2 Objetivo desarrollado

Establecer las mejores condiciones de microencapsulación a escala de laboratorio en la obtención de las microcápsulas, que asegure la protección de los microorganismos probióticos

2.3 Metodología

2.3.1 Activación de las cepas y obtención de la biomasa para encapsular

Los aislados probióticos 0019BL, 0018B y 0013B, correspondientes a *L. delbrueckii* sub *bulgaricus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus polymyxa*, previamente purificados y caracterizados, se conservaron en glicerol al 15% v/v y se almacenaron a -80°C de acuerdo a los protocolos descritos en el capítulo anterior.

Para la activación se tomaron las cepas almacenadas a -80°C y se inocularon directamente en los medios de cultivo sólido, Plate Count y MRS por la técnica de agotamiento en superficie, incubándolas a 37°C por 48 horas en condiciones anaeróbicas para bacterias lácticas y en condiciones aeróbicas 37°C por 24 horas para bacilos esporulados. Luego del periodo de incubación se recuperaban con el asa, y se llevaban a un volumen de 100mL de agua destilada estéril, homogeneizándose hasta alcanzar un conteo final de células de 3×10^9 UFC/mL según el patrón Mc. Farland 10. Este protocolo se realizó para cada una de las cepas bacterianas.

2.3.2 Técnica de secado por aspersión con maltodextrina e inulina:

Una vez se tenían los volúmenes y las concentraciones de cada microorganismo estas se mezclaban en partes iguales y la solución final se ajustaba de acuerdo a la cantidad de maltodextrina requerida para cada experimento.

Un total de 17 muestras se encapsularon, para determinar cuáles variables generaban el mejor índice de sobrevivencia de los probióticos microencapsulados. Las suspensiones de este material se realizaron con maltodextrina y el prebiótico (inulina) de acuerdo al protocolo descrito por Ying et al.(2012) (Ying, Sun, Sanguansri, Weerakkody, & Augustin, 2012). Las concentraciones de maltodextrina fueron de 15 a 35% p/v y una relación de prebiótico: suspensión de células de 1:1 (p/v) con una concentración final de microorganismos de 3×10^9 UFC/mL. Dicha preparación fue homogeneizada a 4000 rpm durante 10 minutos, y mantenida en agitación constante a temperatura ambiente durante la alimentación del equipo, en el que se empleó un intervalo de temperatura de entrada de aire entre 90-140°C, un porcentaje de aspiración entre el 50% y 90%, flujo de aire 450-565 L/h y flujo de alimentación 6mL/minuto. El material microencapsulado fue colectado, sellado y almacenado a temperatura ambiente. En la tabla 4-1 se encuentran las condiciones que se siguieron durante el experimento. Para evitar contaminación sobre el equipo, se inicia aspirando agua a T° de 145°C durante 3 minutos.

se aplicó el diseño experimental "Diseño Central Compuesto en 3 bloques completamente aleatorizado". En todos los experimentos se evaluó sobrevivencia de los microorganismos en términos de UFC/g. Una vez tabulados los resultados, se determinaba por Superficie de Respuesta, las mejores condiciones para la microencapsulación, los datos se corrieron en Statgraphics centurión XVI y se determinaron las variables que más se ajustaban a mantener la viabilidad de los microorganismos en las microcápsulas.

Para los experimentos se fijaron 3 variables independientes: Temperatura de entrada (X1), Porcentaje de aspiración (X2) y Concentración de Maltodextrina (X3). La Variable dependiente: Viabilidad celular de las bacterias probióticas (Y). Tabla 2-1

Número de experimentos: $2^K + 2(K) + C_p = 2^3 + 2(3) + 3 = 17$; K = número de variables independientes, C_p = punto central del diseño.

Tabla 2-1: experimentos para microencapsulación de probióticos

Experimento	X1	X2	X3	Experimento	temperatura	Aspiración %	maltodextrina %
1	-1	-1	-1	1	90	0,8	30
2	+1	-1	-1	2	110	0,65	23
3	-1	+1	-1	3	76	0,65	23
4	+1	+1	-1	4	110	0,65	23
5	-1	-1	+1	5	144	0,65	23
6	+1	-1	+1	6	110	0,65	23
7	-1	+1	+1	7	90	0,5	15
8	+1	+1	+1	8	130	0,5	15
9	- α	0	0	9	110	0,65	35
10	+ α	0	0	10	130	0,8	30
11	0	- α	0	11	130	0,8	15
12	0	+ α	0	12	90	0,5	30
13	0	0	- α	13	90	0,8	15
14	0	0	+ α	14	110	0,65	10
15	0	0	0	15	130	0,5	30
16	0	0	0	16	110	0,4	23
17	0	0	0	17	110	0,9	23

De acuerdo a los resultados encontrados por superficie de respuesta esperada, se ajustaban las variables en el spray dry y se encapsulaba nuevamente de acuerdo al protocolo anterior, las microcápsulas obtenidas se sometían a sales biliares 0,3%p/v, pH 3, NaCl 2% p/v a temperatura ambiente 23°C durante 4 horas, así mismo se evaluó la viabilidad a 30 días de almacenamiento a 23°C.

2.3.3 Tamaño de las microcapsulas

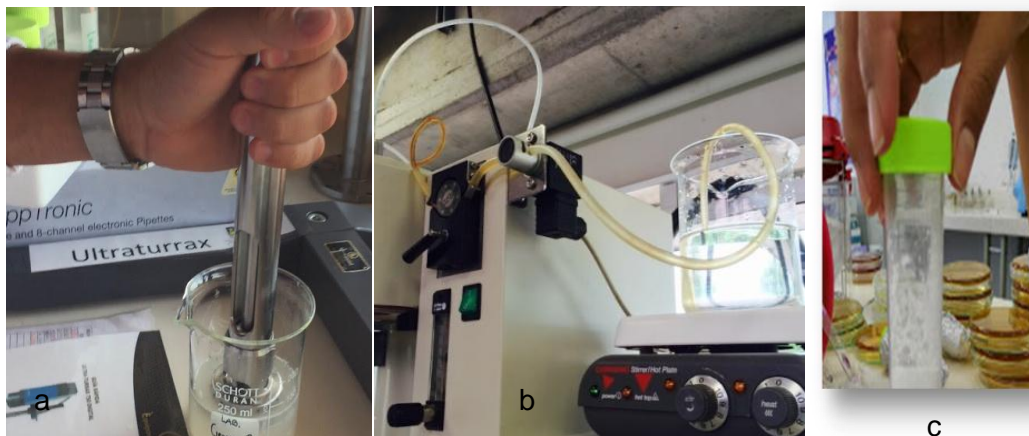
La caracterización del tamaño de las microcapsulas obtenidas por spray dry se realizó por microfotografía electrónica; si bien este ensayo no estaba dentro de los objetivos del proyecto, se realizó para determinar el tamaño de partícula obtenida por la técnica en mención.

2.4 Resultados

Al realizar el secado por aspersión para microencapsular los microorganismos a diferentes concentraciones de maltodextrina, se determinó que para un volumen de 100mL de la solución, se recupera en promedio 12g de material encapsulado (Imagen 2-1)

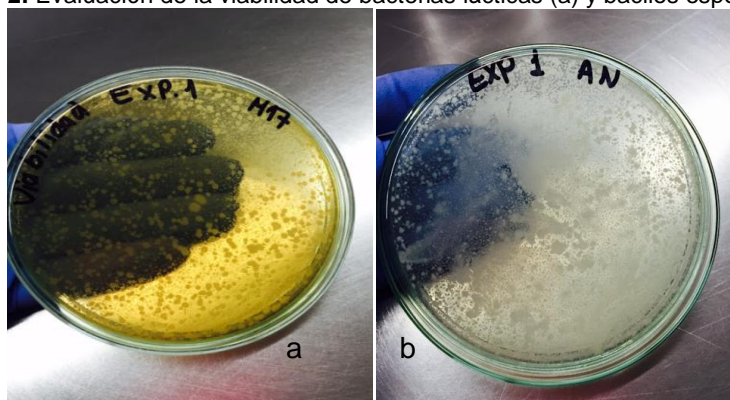
Para la evaluación de sobrevivencia de los microorganismos a la microencapsulación, se realizaron diluciones sucesivas hasta 10^{-3} , encontrando que tanto el *L. delbrueckii* como los bacilos esporulados sobrevivieron a esta técnica, recuperando en promedio $2,86 \times 10^6$ UFC/g de *L. delbrueckii* sub *bulgaricus* a 90 °C; mientras que a 130°C no se obtuvo ninguna colonia. En el caso, de los bacilos esporulados se recuperaron en promedio $3,05 \times 10^6$ UFC/g, con rangos desde $1,28 \times 10^6$ UFC/g a $4,48 \times 10^6$ UFC/g tanto a temperaturas de 90°C como de 130°C. Lo anterior significa que los microorganismos utilizados en los experimentos soportaron el secado por aspersión, además, que las microcápsulas son lábiles a la hidratación (imagen 2-2).

Imagen 2-1: Técnica de spray dry para microencapsular microorganismos probióticos



a. Preparación de la solución con maltodextrina. b. solución de maltodextrina y **microorganismos** en el spray dry. c. producto microencapsualdo obtenido

Imagen 2-2: Evaluación de la viabilidad de bacterias lácticas (a) y bacilos esporulados (b)

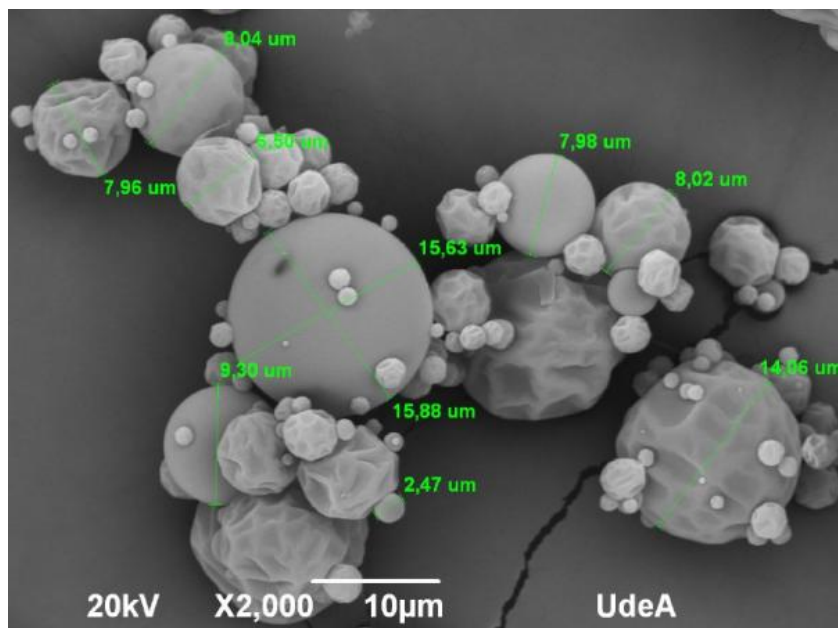


A cada una de las colonias recuperadas se les realizó la coloración de Gram y una identificación bioquímica, para corroborar que efectivamente correspondían a los microorganismos empleados en la investigación.

2.4.1 Tamaño de las microcapsulas

En la imagen 2-3, se pueden apreciar las microcápsulas obtenidas por Spray dry por microscopía electrónica, el tamaño promedio de la microcapsula es de $15\mu\text{m}$, el tamaño de la microcapsula proporciona la cubierta necesaria para el mantenimiento y estabilidad de los microorganismos.

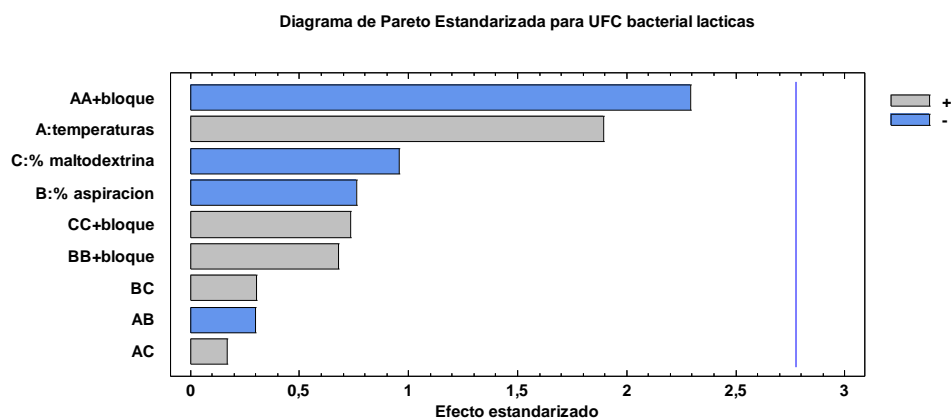
Imagen 2-3: fotografía electrónica de las microcápsulas obtenidas por spray dry



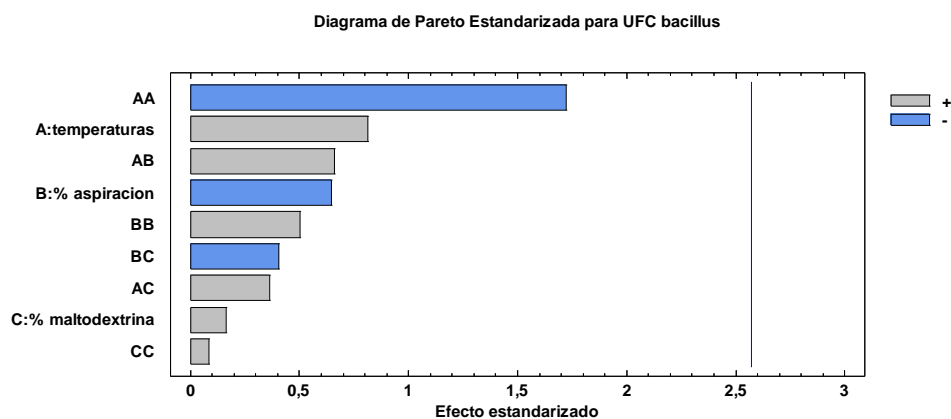
2.4.2 Análisis estadístico

Con respecto a los análisis estadísticos mostraron la superficie de respuesta para las especies de microorganismos evaluados, evidenciado que el efecto más importante para permitir la sobrevivencia de las bacterias es la temperatura, siendo más significativo en las bacterias lácticas que en los bacilos Gráfico 2-1 (a) y (b). Es de anotar que tanto el porcentaje de maltodextrina como el de aspiración no fueron variables tan importantes para la viabilidad de estas bacterias.

Gráfico 2-1; efectos de las variables para la sobrevivencia a la microencapsulacion de bacterias lácticas (a) y bacilos esporulados (b)



a



b

En el gráfico 2-2 se observa que cuando se emplearon temperaturas de 90-110°C se recuperaba mayor cantidad de bacterias lácticas, lo cual significa que estas condiciones favorecen la viabilidad del *Lactobacillus delbrueckii* en el proceso microencapsulación, sin embargo, a altas temperaturas 130°C no se obtuvo ninguna colonia.

Tabla 2-2: Análisis de varianza para *Bacillus megaterium* y *Bacillus polymyxa*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperaturas	1,25893E13	1	1,25893E13	32,69	0,0001
% aspiración	1,24928E11	1	1,24928E11	0,32	0,5787
% maltodextrina	3,40035E9	1	3,40035E9	0,01	0,9266
Residuo	5,00601E12	13	3,85078E11		
Total (corregido)	1,77236E13	16			

Así mismo, los resultados obtenidos para análisis de varianza de *Lactobacillus delbrueckii*, demostraron que hubo diferencias estadísticas significativas $P < 0,05$ entre las UFC obtenidas. La variable determinante fue la temperatura que tuvo un efecto en la cantidad de UFC recuperadas $P < 0,05$ seguido del % de aspiración; mientras que el % de maltodextrina presentaron un $P > 0,05$. Los resultados se observan en la tabla 2-4

Tabla 2-3: Análisis de varianza para *Lactobacillus delbrueckii*

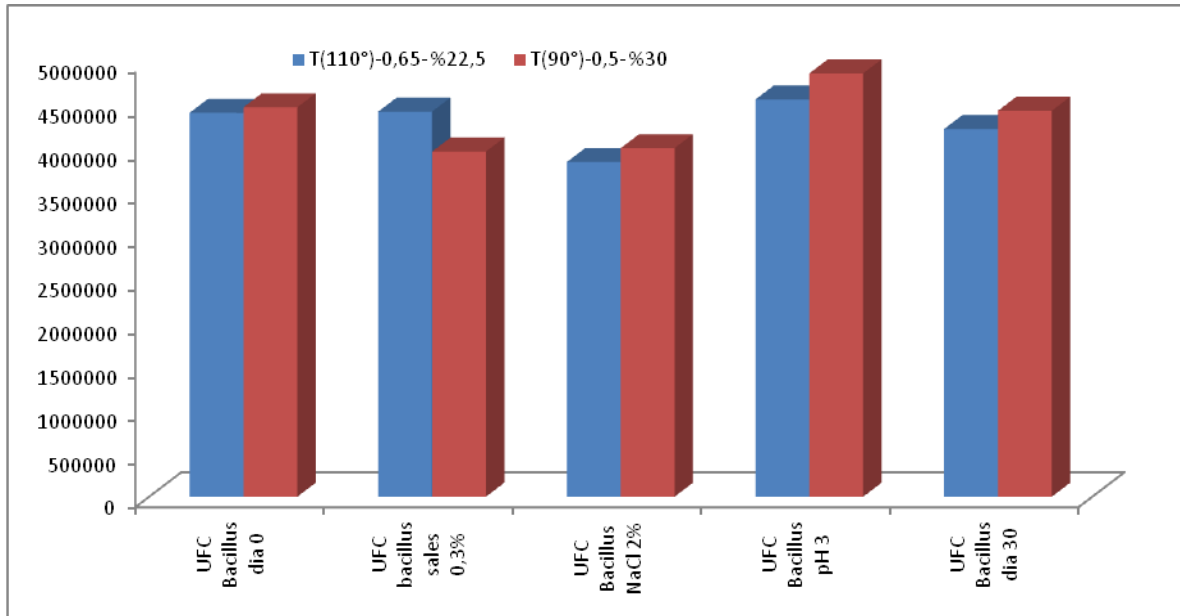
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Temperaturas	8,75277E12	1	8,75277E12	8,79	0,0109
% aspiración	6,73839E12	1	6,73839E12	6,77	0,0219
% maltodextrina	7,9735E11	1	7,9735E11	0,80	0,3870
Residuo	1,29386E13	13	9,95279E11		
Total (corregido)	2,92271E13	16			

Sin embargo, para confirmar que no había diferencias estadísticamente significativas entre las UFC recuperadas de ambos grupos de bacterias, se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias entre ambas, encontrando que $P > 0,05$, de tal forma que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de bacterias al recuperar las UFC de microorganismos encapsulados.

Las microcápsulas obtenidas de los experimentos que arrojaron los mejores recuentos de UFC tanto para bacilos como para bacterias lácticas fueron sometidas a diferentes condiciones de stress. Los resultados se observan en los Gráficos 2 -4 y 2-5.

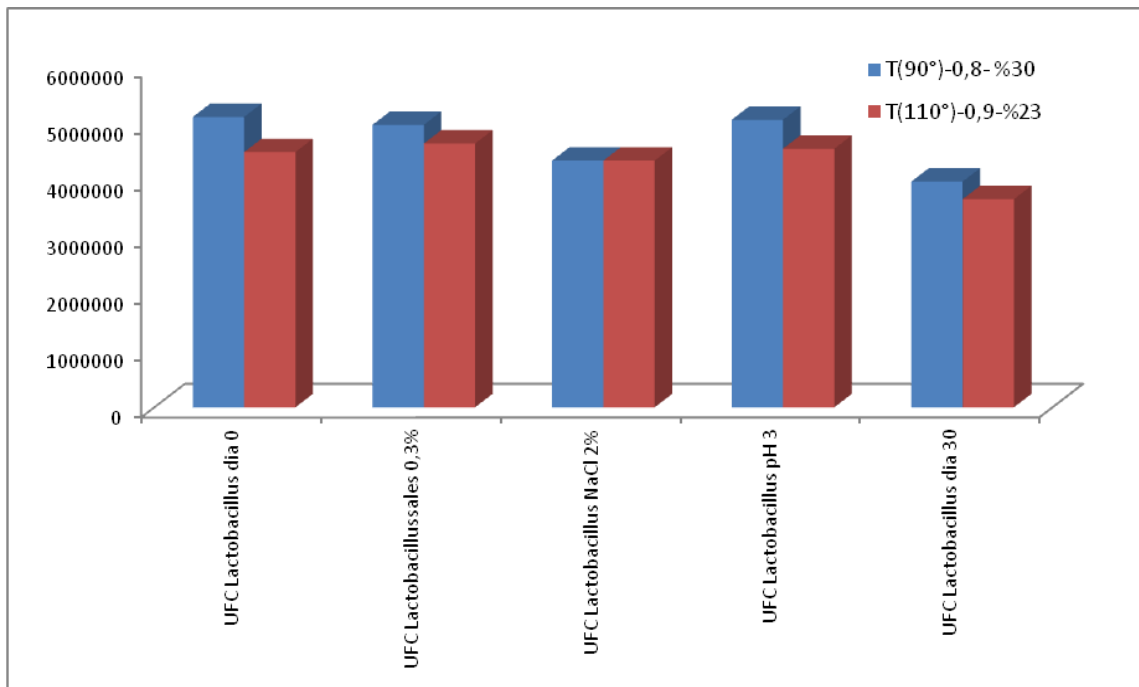
El gráfico 2-4 muestra los resultados obtenidos para bacilos esporulados encontrando recuentos de UFC tanto a 110°C, 65% de aspiración y 22,5% de maltodextrina como a 90°C-50% y 30%, de hecho el número de recuentos en ambas condiciones son muy similares.

Grafico 2-4 sobrevivencia de *Bacillus megaterium* y *Bacillus polymyxa* a sales, pH y tiempo de almacenamiento



En el gráfico 2-5 se observa que los recuentos más altos de UFC para *Lactobacillus delbrueckii* se da bajo las condiciones de 90°C de temperatura, 80% de aspiración y 30% p/v de maltodextrina, estos microorganismos mostraron viabilidad bajo todas las condiciones aplicadas, además, permanecen viables después del día 30 de almacenamiento.

Grafico 2-5: sobrevivencia de *Lactobacillus delbrueckii* a sales, pH y tiempo de almacenamiento



2.5 Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, la microencapsulación es una técnica que permite la viabilidad de los microorganismos probióticos, resultados similares fueron reportados en investigaciones pioneras hechas por Anal y col (2007) que emplearon la técnica de spray dry para conservar viables microorganismos probióticos en diferentes alimentos quesos, postres y leches bajo diferentes condiciones de almacenamiento (Anal & Singh, 2007). En nuestra investigación se puede observar la viabilidad, aun el día 30 de almacenamiento, lo cual significa que esta técnica es una alternativa para mantener la integridad de estos microorganismos.

Los análisis de superficie de respuesta esperada mostraron que la temperatura de entrada fue el factor determinante en la sobrevivencia de los microorganismos, mientras que la concentración de maltodextrina y el porcentaje de aspiración no fueron factores que incidieran tanto en la viabilidad de ellos. Temperaturas de 90°C-110°C con concentraciones de maltodextrina de 23%p/v-35% p/v mostraron los mejores resultados en la viabilidad de los probióticos. Esto concuerda con lo reportado por Abd –Talib et al (2013) que identificaron que temperaturas de entrada de 110°C y 13,5%p/v de material encapsulante proporcionaron las mejores condiciones para el secado por aspersión de un conjugado de levaduras más bacterias probióticas (Abd-Talib, Hamidah Mohd-Setapar, Kamal Khamis, Nian-Yian, & Aziz, 2013).

Ensayos realizados por Altamirano et al (2012) descubrieron que al microencapsular *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*, estos soportaron el efecto de la matriz seca y sin características probióticas además se desencapsularon mejorando la salud de los consumidores (Altamirano-Fortoul, Moreno-Terrazas, Quezada-Gallo, & Rosell, 2012). Estos datos ratifican que los probióticos microencapsulados son una alternativa para incorporarlos en diversidad de alimentos.

La efectividad de los materiales empleados para la microencapsulación depende no solo de la forma de la capsula, sino también de la resistencia, de la viabilidad en el tiempo y la biocompatibilidad con las moléculas que se encapsulen, además es importante el costo de los ingredientes para lograr la vida del producto (Riaz & Masud, 2013), de acuerdo a las características halladas en esta investigación, las microcápsulas obtenidas de maltodextrina e inulina fueron resistentes, favorables y compatibles con los probióticos microencapsulados, esto lo demuestra la viabilidad de los microorganismos.

Los recuentos de UFC/g de material encapsulado estuvieron todos por el orden de 10^6 , teniendo en cuenta que se partió con un número inicial de células del orden de 10^9 , el proceso disminuye un promedio de células de 1×10^3 las cuales probablemente se ven afectadas por las variables del proceso. Investigadores como (Riveros, Ferrer, & Bórquez, 2009) encontraron una disminución igual de células como las de esta

investigación, partiendo de recuentos iniciales de 1×10^{12} *Lactobacillus acidophilus* y al final se reportaron 1×10^9 UFC, resultados similares fueron reportados por Sohail y col (2013) quienes microencapsularon *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) y *Lactobacillus acidophilus* NCFM (LNCFM) con maltodextrina, cuando evaluaron la reducción en números de UFC encontraron una reducción de 1×10^3 (Sohail et al., 2013).

Estudios realizados por Rodriguez et al en 2012 demostraron que el porcentaje de viabilidad más alto de los microorganismos encapsulados, se mantuvieron cuando las suspensiones de maltodextrina al 25%p/v fueron mantenidas con inulina (Rodriguez-Barona et al., 2012), en esta investigación la inulina se mantuvo como un elemento constante en todos los procesos por el factor protector que le proporciona este elemento prebiótico a la viabilidad de los microorganismos; de hecho (Montes Ramírez, 2013) reportan que aun a las 14 semanas de almacenamiento se presenta viabilidad de lactobacilos cuando se emplea inulina, mientras que en los ensayos que no contenían no se presentó viabilidad.

Yonekura et al (2014) evaluaron otros materiales encapsulantes como alginato de sodio, quitosan e hidroxil propil metil celulosa para microencapsular probióticos y encontraron células viables a los 35 días de almacenamiento a 25°C (Yonekura et al., 2014), en este trabajo donde se presentó sobrevivencia de los microorganismos a 30 días y 23°C. Estudios realizados por A.C Oliveira (2007) encontraron microorganismos viables de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*, aun cuando las microcápsulas se almacenaron a temperaturas de 7°C durante 30 días (A. C. Oliveira et al., 2007).

En otras investigaciones se han encapsulado *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*, las cápsulas mostraron gran tolerancia a pH 2, 3.5, 5 y 6.5 en periodos de 6 horas de incubación (Jiménez-Pranteda et al., 2012), estos resultados se corroboran con los nuestros donde las microcápsulas se sometieron a pH 3 durante 4 horas, sales biliares 0,3% y NaCl del 2%p/v y se observó que las bacterias se desencapsulaban y sobrevivían al efecto de estos factores, esto es debido probablemente a la caracterización probiótica que tiene estos microorganismos. En investigaciones recientes realizadas por Ranadheera y col en (2015) reportaron el empleo de una mezcla probiótica de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 y *Propionibacterium jensenii* 702; los cuales fueron resuspendidos y reconstituidos en 20% p/v de leche de cabra para ser microencapsulados y almacenados a 4°C y 30°C por 24 semanas, observando que los tres probióticos fueron viables durante todo el tiempo de estudio (Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2015), estos resultados ratifican los encontrados en esta investigación

Los géneros de bacterias probióticas del estudio: bacilos esporulados y lactobacilos, presentan diferencias morfológicas marcadas, de hecho los bacilos esporulados mostraron una fuerte tolerancia a diferentes temperaturas, aún a temperaturas de 130°C se pudieron obtener recuentos hasta de $1,9 \times 10^6$ UFC/g, mientras con las bacterias ácido lácticas, se observó mayor sensibilidad, esto probablemente se debió a la presencia de la endospora en los *Bacillus* sp que les genera un nivel de resistencia más alta, resultados

similares fueron reportados por Zink y col en (2011) quienes tuvieron en cuenta la capacidad de esporulación de estos microorganismos, como parámetro de elección para microencapsular (Zink, Benetti, Douillet, Margulies, & Scholey, 2011).

Las microcápsulas presentaron tamaños que oscilaron entre 10 μ m y 15 μ m, con una variedad de estructuras, desde circulares a formas irregulares; estos datos concuerdan con los hallados por Parra (2011) donde observaron microcápsulas de tamaños y formas diferentes que van desde esféricas hasta irregulares (Parra, 2011).

2.6 Conclusión

Las condiciones de sobrevivencia por spray dry para los bacilos esporulados fueron de 110°C, 65% de aspiración y 22,5% de maltodextrina como a 90°C-50% y 30% y para bacterias lácticas 90°C, 80% de aspiración y 30% p/v de maltodextrina. Las microcápsulas obtenidas con maltodextrina e inulina para microencapsular *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa* y *Lactobacillus delbrueckii* por la técnica spray dry se preservaron a condiciones ambientales y mantuvieron los microorganismos viables durante 30 días, así mismo, se comprobó que las cápsulas fueron vulnerables a la hidratación, a pH 3, NaCl 2% y sales biliares 0,3%.

3.Evaluación de las microcápsulas en un concentrado para Tilapia

3.1 Introducción

Uno de los principales desafíos de la microencapsulación es la resistencia que pueden enfrentar las microcápsulas a sobrevivir y viables sobre un alimento. Para los microorganismos probióticos sobrevivir en matrices alimentarias es todo un desafío, de hecho la mayoría de los alimentos no son sustratos fértiles para la permanencia y viabilidad de un probiótico, ya sea porque no cumplen la connotación de alimento prebióticos o porque durante sus proceso de manufacturación pasan por temperaturas altas o por procesos de extrusión, como es el caso de la mayoría de concentrados. El proceso de extrusión de alimentos es una forma de cocción rápida, continua y homogénea. Mediante este proceso mecánico de inducción de energía térmica y mecánica, se aplica al alimento procesado alta presión y temperatura (en el intervalo de 100-180°C), durante un breve espacio de tiempo. Como resultado, se producen una serie de cambios en la forma, estructura y composición del producto.

Debido a la intensa ruptura y mezclado estructural que provoca este proceso, se facilitan reacciones que, de otro modo, estarían limitadas por las características difusionales de los productos y reactivos implicados. Este tipo de técnicas, se emplea generalmente para el procesamiento de cereales y proteínas destinados a la alimentación humana y animal. Asimismo, se trata de un proceso que opera de forma continua, de gran versatilidad y alto rendimiento productivo (Wagner, Mount, & Giles, 2014).

3.2 Objetivo desarrollado

Evaluar la viabilidad de los probióticos microencapsulados sobre un concentrado para peces, determinando calidad en términos del Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL)

3.3 Metodología

3.3.1 Producción de concentrado para tilapia

Para la realización de este objetivo, la universidad de los Llanos prestó sus servicios para la producción de dos baches de alimentos para levante de peces cada uno de 4kg. Se diseñaron y formularon dos dietas isoproteicas e isocalóricas (42% de proteína bruta PB, 95% de digestibilidad y Energía 4765.8 Kcal/Kg), respectivamente según recomendaciones de la NRC, (Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, 2011); a una de ellas se le incluyó el 1% de microorganismos microencapsulados, correspondientes a 40g (tabla 5-1). Los concentrados fueron clasificados: con probiótico y sin probiótico, imagen 5-1.

Tabla 3-1: formulación de la dieta para Tilapia con 45% de proteína y 95% de digestibilidad

Ingrediente	Cantidad (%)	
	D1	D2
Torta de soya	23	23
Torta de palmiste	12	12
Harina de pescado	45	45
Salvado de trigo	11	11
Maíz amarillo	5	5
Alfacelulosa	1	-
¹ Probióticos microencapsulados	-	1
Aceite pez	1	1
Premezcla Rovimix Tilapia ²	2	2

¹Probióticos microencapsulados 40g [3×10^6 *Bacillus* sp] [2×10^6 *L. delbueckii*]/g
Concentración final para 4Kg [$1,2 \times 10^5$ microorganismos/g]

² Premezcla Rovimix Tilapias @ Lab. DSM Nutritional Products Colombia 3.0 (Vit A 7.5×10^5 KUI, Vit D3 3.7×10^5 KUI, Vit E 10.8×10^3 mg, Vit K3 1.66×10^3 mg Vit B1 1.83×10^3 mg, Vit B2 2.9×10^3 , Vit B6 1.8×10^3 mg, Vit B12 3.3 mg, Ac. Ascórbico 4.1×10^4 mg, Niacina 7.5×10^3 mg, Acido pantotenico 8.3×10^3 mg, Acido Fólico 1.6×10^5 mg, Biotina 2.5×10^3 mg, Cobre 2.8×10^4 mg, Hierro 2.5×10^3 mg, Manganeseo 0.167 mg, Yodo 2.1×10^4 mg, Zinc 6.6×10^4 , Selenio 9.1×10^4 mg, Magnesio 9.1×10^4 mg, Inositol F.G 5.8×10^4 mg, Luctanox E 25 g, vehículo c.b.p 1.0 kg.3. % de proteína de la dieta 42% formulado, proteína digestible 36,2 % - Energía Kcal/Kg Calculada 4765,8; energía digestible 3586,9 Kcal/Kg – Lípidos 6,7%.

Imagen 3-1: concentrado para Tilapia con y sin probióticos

3.3.2 Análisis microbiológico de los concentrados

Los alimentos para animales se definen como mezclas de nutrientes elaborados en forma tal que responden a requerimientos de cada especie, edad y tipo de explotación, bien sea suministrado como única fuente de alimento o como suplementos o complementos de otras fuentes nutricionales. Por lo tanto, se debe tener en cuenta los criterios microbiológicos para poder ser administrados como alimento animal, establecidos por el ICA. De acuerdo estas normas (<http://www.ica.gov.co/>) las normas para alimentos concentrados para la especie piscícola están definidas en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Exigencias formuladas por el ICA para análisis microbiológico de concentrado para peces

Especie piscícola	
Parámetros microbiológicos	UFC/g
Recuentos de mesófilos	10×10^4
Recuentos de coliformes	10×10^2
Recuentos de sulfitoeductores	10×10
Recuento de hongos	50×10^2
Salmonella en 25g	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausente

Con base a las exigencias descrita en la norma, se realizaron análisis microbiológicos a cada uno de los concentrados producidos, además, del recuento de UFC/g de microorganismos probióticos para comprobarles la viabilidad después del proceso de extruido. Tabla 3-3; e imagen 3-2.

Tabla 3-3: resultados microbiológicos para concentrado con probióticos

Concentrado con probióticos	
Parámetros microbiológicos	UFC/g
Recuentos de mesófilos	10×10^2
Recuentos de coliformes	10×10^1
Recuentos de sulfitoeductores	
Recuento de hongos	2×10^1
Salmonella en 25g	0
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4×10^4
<i>Bacillus sp</i>	6×10^5

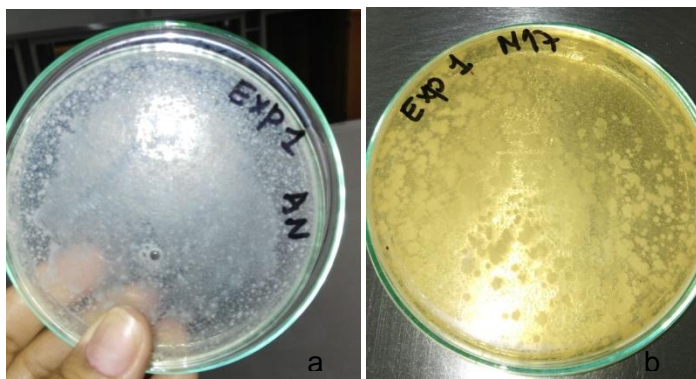
Imagen 3-2: Colonias de bacilos esporulados (a) y *Lactobacillus delbrueckii* (b) encontradas en el concentrado con probiótico

Tabla 3-4: resultados microbiológicos para concentrado sin probióticos

Concentrado sin probióticos	
Parámetros microbiológicos	UFC/g
Recuentos de mesófilos	10×10^2
Recuentos de coliformes	10×10^1
Recuentos de sulfitoeductores	
Recuento de hongos	4×10^1
Salmonella en 25g	0
<i>Escherichia coli</i>	0

Las formulaciones de concentrados como alimento para Tilapia, cumplieron con los criterios microbiológicos emitidos por el ICA, los resultados de los análisis microbiológicos demostraron

que la calidad estaba acorde con las exigencias de un buen concentrado, los resultados se mostraron en la tabla 3-3 y 3-4.

3.3.3 Evaluación de la viabilidad de los probióticos sobre el concentrado

Con el fin de determinar la sobrevivencia de la población probiótica encapsulada durante el tiempo que estuvo almacenado el concentrado, se hicieron evaluaciones semanales, durante las 6 semanas que duró el experimento *in vivo*. En el gráfico 5-1, se puede apreciar que la población de *Lactobacillus delbrueckii*, se mantuvo constante, aunque, tuvo un recuento más bajo que el de los bacilos esporulados, todos del orden de 10^4 . Mientras el *Bacillus megaterium* y el *Bacillus polymyxa* tuvieron recuentos del orden de 10^5 , sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos ($P > 0,05$).

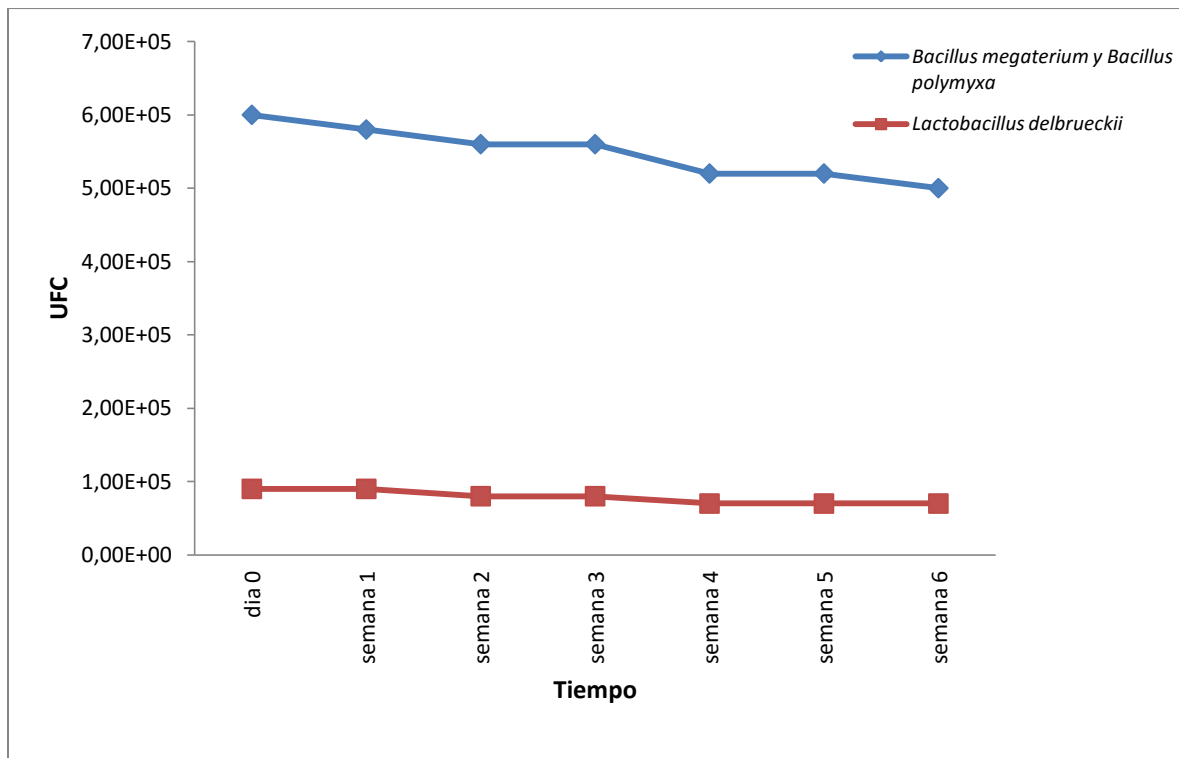


Grafico 3-1: comportamiento de la población de bacilos esporulados y bacterias lácticas en el concentrado con probióticos durante seis semanas de almacenamiento

3.4 Discusión

El concentrado extruido es una forma de cocción rápida, continua y homogénea, en donde a un alimento procesado se le aplica energía térmica y mecánica, a presión y temperatura alta (100°C -180°C) en espacios de tiempo corto, como resultado, se producen una serie de cambios en la forma, estructura y composición del producto (Wagner et al., 2014). Estas condiciones normalmente son condiciones hostiles para supervivencia de los microorganismos en su estado natural; sin embargo, es posible que las microcápsulas de maltodextrina e inulina haya favorecido la viabilidad de los microorganismos y por lo tanto les haya proporcionado resistencia mecánica evitando la muerte de toda la población bacteriana (Rokka & Rantamäki, 2010).

Otra condición que favorece la viabilidad de los microorganismos es la presencia de esporas del *Bacillus megaterium* y del *Bacillus polymyxa*, situación que le permite la resistencia a condiciones extremas, de hecho estos resultados son evidenciados en los recuentos encontrados sobre el concentrado, donde se observa recuentos promedios en los *Bacillus* de 6×10^5 UFC/g mientras que el recuento para *Lactobacillus delbrueckii* fue de 5×10^4 , estos datos se observan en el gráfico 5-1. Con base a los anterior, existen investigaciones como las de A.C Oliveira y col (2007) quienes microencapsularon *Bifidobacterium lactis* (BI 01) y *Lactobacillus acidophilus* (LAC 4) en un complejo de caseína y pectina, observando que los microorganismos toleraron temperaturas altas 80°C/10 minutos, sin embargo, cuando fueron adicionados a jugos de frutas, se desencapsularon en el medio acuoso, esta situación se vio reflejada en esta investigación, donde los microorganismos sobrevivieron a una matriz seca con un bajo A_w , como el concentrado; pero cuando se sometían a hidratación para realizar el conteo microbiológico las microcápsulas se fragilizaban (A.C. Oliveira et al., 2007).

Otra investigación que corrobora la permanencia de las bacterias microencapsuladas en un alimento son las investigaciones realizadas por Kent y Doherty (2014) quienes fueron pioneros en la microencapsulación de consorcios bacterianos en matrices alimentarias secas como la leche de fórmula, ellos encontraron que el consorcio de bacterias encapsuladas permanecieron vivas durante todo el tiempo en leche de fórmula (Kent & Doherty, 2014), resultados similares fueron encontrados en esta investigación, ya que la viabilidad del probiótico en un medio seco como el concentrado presentó recuentos muy similares durante las 6 semanas de evaluación, concluyendo que las microcápsulas de maltodextrina mas inulina tuvieron un efecto protector alto sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos.

3.5 Conclusiones

Los microorganismos probióticos microencapsulados *Bacillus polymixa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus* soportaron las condiciones del extruido obtenido en la formulación del alimentos para Tilapia (*Oreochromis sp*) en levante, además que el concentrado cumplió con las condiciones de calidad exigidos por el ICA, manteniendo la viabilidad de los microorganismos probióticos durante las seis semanas de evaluación microbiológica.

**4. Evaluación de los parámetros zootécnicos
de Tilapia (*Oreochromis* sp) alimentadas
con las dietas adicionadas con
microorganismos probióticos
microencapsulados**

4.1 Introducción

De la Microencapsulación a la liberación: los innumerables beneficios que proporcionan los probióticos ha conducido a una rápida expansión de su uso en variados productos saludables. Los efectos benéficos de estos microorganismos dependen en gran medida de la habilidad para llegar al sitio de acción, normalmente deben de llegar a la zona distal del intestino, con capacidad de tolerar la acidez y la hipertonicidad generada por las sales biliares.

Después de la ingestión de un probiótico microencapsulado, en la mayoría de los organismos monogástricos, pasará rápidamente después de la ingestión por el esófago, tomando alrededor de 10-14 segundos y alcanzará el estómago, este es el punto más importante donde se mide la viabilidad de los microorganismos debido a la cantidad de ácidos, los valores reportados de pH pueden variar de 1-2,5, adicionalmente a los ácidos el estómago también contiene enzimas proteolíticas, a las cuales también se verían vulnerables los probióticos. Después de este paso por el estómago las microcápsulas entran al intestino delgado y justo aquí es donde deben llevar las microcápsulas con los microorganismos vivos, o en su defecto los microorganismos que se han desencapsulado desde el estómago por la acción de sales biliares, ácidos y por supuesto la hidratación (Ariful, Yun, Choi, & Cho, 2010).

El intestino delgado no es similar al resto del tracto digestivo, es el nicho de una gran cantidad de microorganismos nativos, los cuales generan diferentes metabolitos necesarios para la integridad del intestino y justo este lugar va hacer el punto de liberación para la población probiótica microencapsulada que intervendrá en procesos como competencia por sitios de adhesión con otros microorganismos, producción de metabolitos, ácidos y péptidos antimicrobianos, inmunoestimulación y producción de enzimas entre otras (Cook et al., 2012)

En los peces como la Tilapia el sistema digestivo se inicia en la boca, que presenta en su interior dientes mandibulares (pueden ser unicúspides, bicúspides y tricúspides según las diferentes especies) y continúa con el esófago y el estómago. El intestino es en forma de tubo que se adelgaza después del píloro diferenciándose en dos partes: una anterior corta, que corresponde al duodeno, y una posterior más larga aunque de menor diámetro. El intestino es siete veces más largo que la longitud total del cuerpo, característica que predomina en las especies herbívoras. Presenta dos glándulas importantes asociadas con el tracto digestivo: el hígado, que es un órgano grande y de estructura alargada y el páncreas, en forma de pequeños fragmentos redondos y difícil de observar por estar incluidos en la grasa que rodea a los ciegos pilóricos (Bott, 2014).

El concentrado contiene las microcápsulas con los microorganismos dentro, se espera entonces que la liberación ocurra en el intestino de la Tilapia y que se observe un efecto directo en el aumento de variables zootécnicas como ganancia de peso, ganancia de longitud, conversión alimentaria y tasa de crecimiento específica de los animales alimentados con estos.

4.2 Objetivo desarrollado

Determinar la desencapsulación del probiótico comparando dos dietas para Tilapia (*Oreochromis sp*), una con probióticos microencapsulados y otra sin probióticos in vivo.

4.3 Metodología

4.3.1 Localización

Los ensayos se realizaron en la unidad de recirculación para acuicultura de la Corporación Universitaria Lasallista.

4.3.2 Material biológico

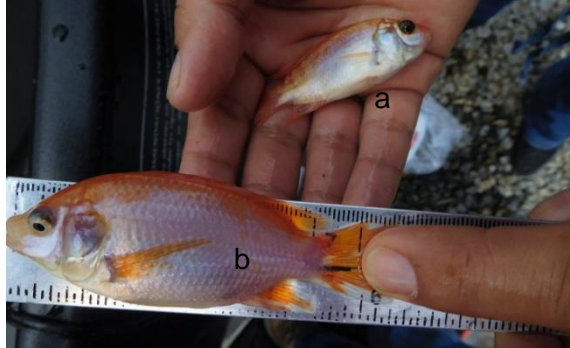
Se utilizaron 631 alevinos de Tilapia roja (*Oreochromis spp*) con un peso inicial promedio de 0,45 gr/pez, los cuales fueron dispuestos en cuatro tanques con un volumen efectivo de 700 L.

4.3.3 Cepas utilizadas y clasificación

Microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa* y *Lactobacillus delbueckii*, fueron incluidos en una dieta garantizando una concentración final de $1,2 \times 10^5$ UFC/g; los microorganismos fueron aislados del intestino de la especie objeto, purificados y caracterizados por pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares; previamente fueron microencapsulados mediante spray-dry.

4.3.4 Dietas y alimentación

Para el ensayo de alimentación se formularon dos dietas isoproteicas e isocalóricas (42% de PB, 95% de digestibilidad y Energía 4765.8 Kcal/Kg), respectivamente según recomendaciones de la NRC, (Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, 2011); a una de ellas se le incluyó el 1% en microorganismos. La cantidad de ración se suministró cuatro veces al día y fue calculada con base en la biomasa a una tasa de alimentación del 10% mantenida durante el periodo experimental y se ajustó a los 20 días de iniciado el experimento, en la tabla 6-1 se encuentra el ajuste de cada dieta. Para la evaluación de peso y talla se tomaron de cada tanque 50 alevinos aleatoriamente y se registraban las medidas con un ictiómetro y una balanza digital con una sensibilidad de 0,1gr; estos registros se hicieron al inicio del experimento, al día 20 y al día 40 del ensayo. En la imagen 4-1 se aprecia cómo se tomaban las medidas para las variables zootécnicas.

Imagen 4-1: evaluación del peso y la talla de los animales en los tratamientos

a. Tilapia de 40 días sin probióticos. b. Tilapia de 40 días con probióticos

Tabla 4-1: Distribución de la dieta de acuerdo a la biomasa de Tilapia de cada tanque

Primer pesaje día 0	Segundo pesaje día 20
Peso biomasa total = 328 g Peso x individuo = 0,45 g $328 \text{ gr} \times 10\% = 32,8 \text{ gr} / 4 = 8,2 \text{ g}$ alimento 10g alimento/tanque	Tanque B3 con probióticos Total peces tanque B3 = 156 Peso biomasa total = 268 gr Peso x individuo $= 268/156 = 1,17 \text{ gr} \times \text{pez}$ $1,17 \times 156 = 268 \times 10\% = 26,78 \text{ gr}$ de alimento para el tanque B3
	Tanque B4 sin probióticos Total peces tanque B4 = 174 Peso biomasa total = 252 gr Peso x individuo = $252/174 = 1,45 \text{ gr} \times \text{pez}$ $1,45 \times 174 = 252 \times 10\% = 25,2 \text{ gr}$ de alimento para el tanque B4
	Tanque B5 sin probióticos Total peces tanque B5 = 134 Peso biomasa total = 126 gr Peso x individuo = $126/134 = 0,94 \text{ gr} \times \text{pez}$ $0,94 \times 134 = 126 \times 10\% = 12,6 \text{ gr}$ de alimento para el tanque B5
	Tanque B6 con probióticos Total peces tanque B6 = 139 Peso biomasa total = 170 gr Peso x individuo = $170/139 = 1,22 \text{ gr} \times \text{pez}$ $1,22 \times 139 = 170 \times 10\% = 17 \text{ gr}$ de alimento para el tanque B6

El diseño experimental fue por bloque completamente aleatorizado, las variables medidas fueron peso y talla y se especificaron 2 variables respuestas y 2 factores experimentales.

4.3.5 Parámetros zootécnicos

Con los valores de peso y talla se calculó: ganancia de peso (GP) del periodo con la fórmula $GP = PF - PI$, donde PF es peso final; PI es peso inicial; ganancia de talla (GT), con la fórmula $GT = TF - TI$, donde TF es talla final y TI es talla inicial; se calculó además la tasa específica de crecimiento (TEC), con la fórmula $TCE(\%) = (\ln(Pf) - \ln(Pi)) / t \times 100$;

donde: Pf y Pi son el peso final e inicial, t es el tiempo y Ln es el logaritmo natural de los pesos (W. E. Ricker, 1979)(William Edwin Ricker, 2010); el porcentaje de sobrevivencia (%S) al final del periodo con la fórmula $\%S = \frac{\text{No final de peces}}{\text{No inicial de peces}} \times 100$ y la Conversión Alimenticia (CA), obtenida de la relación entre el alimento consumido y la biomasa al final del periodo experimental.

4.3.6 Calidad del agua

Las unidades experimentales están unidas a un sistema de recirculación que mantuvo las condiciones de calidad de agua dentro de los rangos de confort para la especie durante el tiempo experimental, los parámetros fisicoquímicos registrados semanalmente fueron: oxígeno disuelto (OD mg/L valor 114,2), temperatura (T°C 26°C), conductividad (0,4us), pH (7,1), amonio (1,19 mg/L), los cuales fueron tomados con la Sonda EcoSense YSI y dureza (46 mg/L CaCO₃) y alcalinidad (40 mg/L CaCO₃), con el kit FF1A Hach. Los tratamientos fueron Concentrado más probiótico (tanques B3 y B6) y concentrado sin Probióticos (tanques B4 y B5).

Imagen 4-2: tanques de experimentación para los tratamientos, concentrados más probiótico y concentrado sin probióticos



4.4 Resultados

Los resultados de análisis de varianza para peso y talla se muestran en las tablas 4-2 y 4-3, estos evidencian que hubo diferencias estadísticamente significativas $P < 0,05$ en ambos tratamientos

Tabla 4-2: Análisis de Varianza para Peso

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1589,4	5	317,879	603,93	0,0000
Residuo	310,02	589	0,52635		
Total (Corr.)	1899,42	594			

Tabla 4-3: Análisis de Varianza para talla

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3896,11	5	779,222	1386,07	0,0000
Residuo	331,124	589	0,562179		
Total (Corr.)	4227,23	594			

Los resultados de dispersión de los datos se graficaron y son mostrados en los gráficos 4-1 y 4-2, mostrando que los peces de los tanques B3 y B6 correspondientes a los alimentados con probióticos tenían pesos y tallas más altas que los que no estuvieron alimentados con ellos, como fueron los de los tanque B4 y B5.

Gráfico 4-1: dispersión de los datos de peso en los 4 tanques de tratamiento

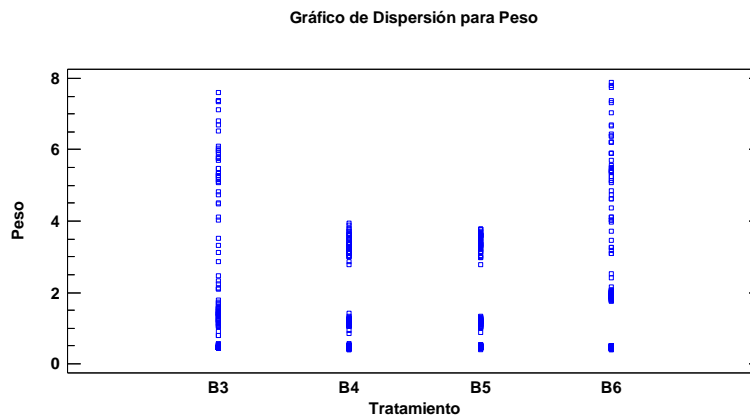
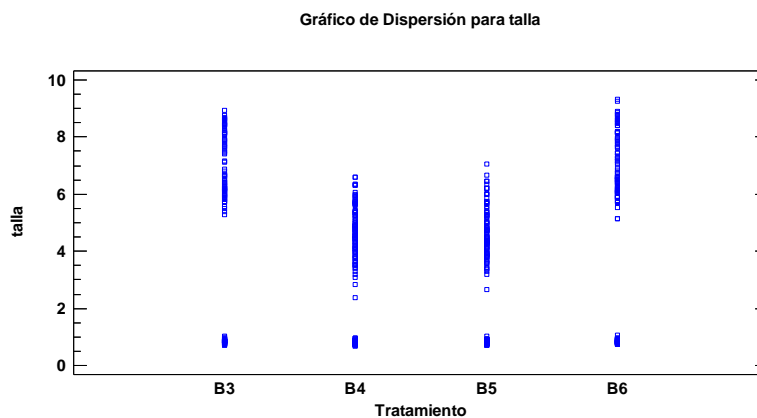


Grafico 4-2: dispersión de los datos para talla en los 4 tanques

Para determinar que tanta homogeneidad presentaban los peces, se realizó un análisis de comparaciones múltiples por tratamiento, tanto para talla (tabla 4-4) como para peso (tabla 4-5). En la talla se encontró homogeneidad en los tanques B3 y B6 que correspondían a los animales alimentados con concentrado con probióticos y entre los B4 y B5 correspondientes a los peces alimentados sin los probióticos. En la tabla 6-5 se observa homología entre los tanques B4 y B5

Tabla 4-4: Comparaciones Múltiples para talla por tratamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B5	150	3,38284	0,081906	X
B4	150	3,40087	0,081906	X
B3	145	4,95759	0,0833077	X
B6	150	4,966	0,081906	X

Tabla 4-5: comparaciones múltiples para peso

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B4	150	1,65264	0,0695963	X
B5	150	1,68164	0,0695963	X
B3	145	2,24154	0,0707873	X
B6	150	2,52777	0,0695963	X

Los resultados encontrados muestran que el porcentaje de viabilidad en los tanques B3 y B6 fue de 90,24% y 88,27% respectivamente, mientras que en el tanque B4 el % de viables fueron de 82,60% y el B5 de 91,3%. Estos resultados muestran que el nivel de mortalidad en los tanques fue bajo y los animales estuvieron en condiciones favorables durante todo el tiempo de tratamiento. El % total de mortalidad fue de 12,21%.

Tabla 4-6: número de peces en cada tanque al inicio y al final del experimento y % de vivos por tanque

Muestras	B3	B4	B5	B6	Total
Día 0	164	184	138	145	631
Día 20	156	174	134	139	603
Día 40	148	152	126	128	554
Muertos	16	32	12	17	77
% vivos	90,24	82,60	91,3	88,27	87,79

Los resultados de los parámetros zootécnicos mostrados en la tabla 4-7, evidencian que los peces que fueron alimentados con la dieta más el probiótico mostraron GP, GL, TCE y CA más altas que los peces con la dieta sin Probióticos, es decir que se observa una sinergia positiva del probiótico sobre los parámetros medidos.

Tabla 4-7: parámetros zootécnicos aplicados a cada población alimentada con y sin probióticos

Tanques				Ganancia de peso g	Ganancia de longitud cm	Tasa específica de crecimiento	Conversión alimentaria
Peso final	Peso inicial	Talla final	Talla inicial	GP (B3)	GL(B3)	(TCE B3)	B3
7,6	0,45	8,95	0,71	0,18	0,21	3,07	0,7
Peso final	Peso inicial	Talla final	Talla inicial	GP(B4)	GL(B4)	(TCE B4)	B4
3,95	0,4	6,59	0,69	0,09	0,15	2,49	1,3
Peso final	Peso inicial	Talla final	Talla inicial	GP(B5)	GL(B5)	(TCE B5)	B5
3,76	0,41	7,05	0,7	0,08	0,16	2,41	1,1
Peso final	Peso inicial	Talla final	Talla inicial	GP(B6)	GL(B6)	(TCE B6)	B6
7,88	0,39	9,31	0,7	0,19	0,22	3,26	0,6

Los análisis fisicoquímicos del agua (tabla 4-8) mostraron estabilidad en todas las variables, condición que favoreció el bienestar animal.

Tabla 4-8: promedio de los parámetros ambientales mantenidos en los tanques de tratamiento durante la investigación

TANQUE	PARAMETROS									
	DO% O2	Do mg/	pH	NH4	NO3	Tº	SPC	SAL	FNU	TSJ
B3	114,9	9,71	7,4	2,1	5,14	2,3	646	0,28	0,4	0
B4	112	9,46	7,2	1,19	4,23	2,4	642	0,28	0,3	0
B5	109,5	9,29	7,18	1,19	4,24	2,7	530	0,27	1,8	0
B6	113,2	9,54	7,14	1,18	4,27	2,8	582	0,27	2,4	0

4.5 Discusión

En la actualidad existe un creciente interés en mejorar la salud de humanos y animales, el consumo de probióticos favorece estas demandas, además de generar un efecto importante en el ecosistema intestinal, mejorando las funciones productivas de los animales. La actividad microbiana asegura la toma de energía intestinal, promueve el desarrollo gástrico y estimula la proliferación y diferenciación del epitelio celular, manteniendo a su vez la tolerancia de la mucosa, brindándole funciones de protección contra patógenos (Guarner & Malagelada, 2003).

Al igual que el presente estudio, la gran mayoría de probióticos usados en acuicultura pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus sp*, aunque también se registran otros organismos como bacterias fotosintéticas y levaduras (Vázquez, González, & Murado, 2005)(Gatlin et al., 2006) y a su vez también se indica los beneficios de suplementar con probióticos las dietas para peces y camarones, por ejemplo mejora el valor nutricional de la dieta, contribuye a la digestión con aporte enzimático y la promoción de factores de crecimiento (Zhou, Tian, Wang, & Li, 2010). El trabajo de Ng y col ((Ng et al., 2014) indica que el uso de *Bacillus sp*, mejoró las tasas de crecimiento de juveniles de *Oreochromis sp*. En el presente estudio se logró constatar por los resultados de los parámetros zootécnicos analizados que la inclusión de probióticos de las cepas *Bacillus megaterium*, *B.polymyxa* y *L. delbueckii*, favorecen el crecimiento que se vio manifestado en una mayor TCE, GP, GT y una excelente CA; similares resultados son mostrados para la especie *Carassius auratus*, incluyendo cepas de *Bacillus sp* y *Lactobacillus* aisladas del tracto digestivo del pez ángel *Pterophyllum scalare*, e indican que el uso de cepas aisladas de peces confieren mayores beneficios en su biometría que probióticos comerciales aislados del ser humano u otros mamíferos (Jiménez-Rojas, Alméciga-Díaz, & Herazo-Duarte, 2012). Wang y Xu, en (2006) (Yanbo & Zirong, 2006) en un experimento con la especie *Cyprinus carpio*, observaron que el uso de *Bacillus sp* y bacterias fotosintéticas aisladas de los estanques de la misma especie, presentaron mejor CA que las dietas que no incluían el probiótico y recomiendan las mezclas de probióticos nativos, en vista de que producen los mejores resultados; probablemente esto explique los hallazgos del presente estudio, en vista del uso de cepas extraídas del mismo pez y usadas en mezcla, además probablemente la desencapsulación de la población probiótica pudo haberse dado a nivel intestinal. Estudios realizados por Casula en 2002 (Casula & Cutting, 2002) encontró que al adicionar esporas de *Bacillus megaterium* a ratas de laboratorio, muchas de ellas eran capaces de germinar en el tubo digestivo y generar un número importante de células en el yeyuno e ileón, este estudio sugirió que las esporas pueden colonizar el intestino delgado, encontrando una aumento en todas las variables, este estudio soporta los encontrados en esta investigación en las cuales se observó que los peces alimentados con la dieta más el probiótico mejoró notablemente con respecto a la población control, estos hallazgos también fueron reportados por Del'Duca y col en 2013 (Del'Duca A, Evangelista Cesar D, Galuppo Diniz C, 2013), Mandhi en 2012 (Mahdhi et al., 2012) también probaron el efecto de los bacilos

esporulados en la disminución de infecciones en peces encontrando que *Bacillus* sp, disminuían el estrés marino.

Los resultados encontrados en los análisis estadísticos evidenciaron que los animales de los tanques B3 y B6, alimentados con el concentrado más el probiótico fueron estadísticamente diferentes de los demás tratamientos $P < 0.05$, estos resultados también se evidenciaron en la ganancia en peso y ganancia en longitud. La tasa de crecimiento específica fue también otro parámetro importante, esta variable establece el crecimiento de los animales durante el tiempo de tratamiento. La TCE para los animales de los tanques B3 y B6, oscilaron entre 3,07-3,26, contrastando con los de los animales de los tanques B4 y B5 que presentaron tasas de 2,49 y 2,41. Es probable que esta mejora en los parámetros se deba al consumo de los probióticos en la dieta pues los animales han estado durante todo el tiempo en las mismas condiciones. Estudios realizados por Flores y col (Flores, Briones, & Novoa, 2002), encontraron que al adicionarle probiótico al agua de los peces, el tratamiento con probiótico presentó la mayor ganancia de peso con diferencias estadísticas con los demás tratamientos ($P < 0.05$), además de presentar la tasa específica de crecimiento más alta, con diferencias significativas $P < 0,05$ con respecto a las otras dietas. En esta investigación también se determinó que la conversión alimentaria más baja la tenían los animales con probióticos, los de los tanques B3 (0,7) y B6 (0,6), estos datos indican que los animales necesitan 0,7kg de concentrado para ganar 1kg de carne. En peces como Tilapia, conversiones alimentarias indican una alta absorción de nutrientes; resultados similares fueron presentados por Zhou y colaboradores en 2010 (Zhou et al., 2010) en donde observaron que el menor consumo de alimento se presentó en la dieta con probiótico, presentando diferencias significativas con los demás tratamientos ($P < 0.05$), ratificando los resultados encontrados por Flores y colaboradores (Flores et al., 2002). En cuanto al aprovechamiento del alimento el tratamiento con probiótico presentó la menor tasa de conversión alimenticia (TCA) con respecto a los demás tratamientos.

Los resultados estadísticos de esta investigación mostraron que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con y sin probióticos, demostrando con un $P < 0,05$ que hubo diferencias significativas entre las variables respuestas peso y talla, soportando estos resultados el estudio de los parámetros zootécnicos. Los animales alimentados con los probióticos microencapsulados en el concentrado, mejoró notablemente estos parámetros en la población experimental, estos resultados se compararon con los obtenidos por El-Haroun y colaboradores (2006), ellos demostraron que al suplementar una dieta de *Oreochromis niloticus* con un probiótico comercial (Biogen®) todas las variables zootécnicas aumentaron con respecto a la población control, demostrando el aumento en la producción.

Otra característica importante observada durante el tiempo de investigación fue la disminución en la tasa de mortalidad de los animales alimentados con concentrado más probiótico. La tasa de sobrevivencia promedio en los animales alimentados con los probióticos fue de 89,72% y en los no alimentados con ellos fue de 86,95%. La reducción de la tasa de mortalidad está directamente ligada al bienestar animal, que puede ser

producida por los microorganismos probióticos además de los factores ambientales que fueron mantenidos estables durante el tiempo de investigación, sin reportarse procesos infecciosos producidos por microorganismos patógenos durante todo el tiempo de estudio.

Apun y colaboradores (2009) suplementaron una dieta de peces con bacilos esporulados y lactobacilos, y observaron el mejor crecimiento y sobrevivencia sugiriendo que las bacterias son aditivos que estimulan el crecimiento en el cultivo de Tilapia. Newaj y colaboradores (Newaj-Fyzul et al., 2014) también corroboraron esta teoría microencapsulando dos especies de bacterias lácticas y luego alimentando una población de peces (*Oreochromis niloticus*).

Investigaciones realizadas por Ayyat y colaboradores (2014) y Wang y col (2008) (Wang et al., 2008) reportaron que al alimentar Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) con microorganismos probióticos como *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, y *Saccharomyces cerevisiae* todos los animales suplementados con la dieta probiótica mostraron eliminación de *Aeromona hydrofila*, mejoraron la tasa de crecimiento, el consumo y la conversión alimentaria $P < 0,05$, estos datos se retornan directamente en ganancia en peso y en productividad.

García y colaboradores (2015) evaluaron los efectos de un conjugado probiótico de *Bacillus toyoi* y *Bacillus subtilis* en juveniles de Tilapia del Nilo, encontrando, que esta suplementación alteró el perfil hematológico, especialmente hemoglobina, hematocrito, glucosa y niveles de neutrófilos, estas variables no se midieron en la investigación sin embargo se vieron reflejadas en el bienestar de los peces alimentados con ellos, en tanto se sugiere medir estas variables para futuras investigaciones.

Investigaciones similares a esta han sido realizadas por Kent y colaboradores (2014) para optimizar mediante la microencapsulación de microorganismos probióticos el carácter funcional de estas bacterias en leches de fórmula, encontrando que mediante la técnica de spray dry los probióticos permanecen vivos por periodos de tiempo superiores a seis meses, promoviendo los factores de protección intestinal a los neonatos e infantes. Estos resultados soportan la importancia de la realización de este trabajo, la industria de premezclas y aditivos para concentrados de animales, pueden incorporar directamente en la dieta estos microorganismos encapsulados asegurando viabilidad y liberación en el tracto intestinal del organismo.

4.6 Conclusiones

El estudio permite asegurar que bajo las condiciones experimentales los peces que consumieron la dieta con probióticos tuvieron mejor desempeño en los parámetros zootécnicos analizados.

Aunque dentro del estudio no se contrastó con cepas comerciales, se puede afirmar que el uso de cepas nativas, favorece el crecimiento de los peces.

5. Conclusiones finales y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En el intestino de Tilapia (*Oreochromis* sp) se encuentran bacterias probióticas que fueron aisladas e identificadas como *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus*. Estas bacterias mostraron los mejores perfiles de desempeño probiótico al compararse con los demás aislados evaluados.

El consorcio de microorganismos probióticos *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus* fueron tolerantes a las condiciones de microencapsulación. Entre ellos los bacilos esporulados soportaron temperaturas hasta de 130°C, mientras que el aislado láctico soportó temperaturas más bajas.

Los probióticos encapsulados sobrevivieron a las temperaturas de extrusión necesarias para la manufactura del concentrado para Tilapia, mostrando un perfil de resistencia alto frente a temperaturas hasta de 80°C.

Los animales alimentados con la dieta con probióticos tuvieron mejores perfiles zootécnicos, aumentaron el % de sobrevivencia y presentaron mejores ganancias de peso y talla que los no alimentados con probióticos, lo cual sugiere que estos microorganismos tienen un efecto positivo en la producción acuícola.

Los microorganismos empleados en esta investigación *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbrueckii* fueron especies específicas, toleraron la microencapsulación y el extruido, mejoraron los parámetros zootécnicos de Tilapia (*Oreochromis* sp) y permanecieron viables en el concentrado durante todo el tiempo de tratamiento.

| !

5.2 Recomendaciones

En procesos asociados a la microencapsulación es necesario iniciar con una población microbiana abundante, superior a 10^{10} para que en el momento de la microencapsulación, la población recuperada, sea del orden de 10^7 .

Para futuros trabajos se recomienda evaluar la adhesión de los microorganismos probióticos en el intestino de Tilapia además de la evaluación de crestas intestinales que promuevan la absorción intestinal, es importante también el uso de probióticos comerciales como control para los ensayos de animales, para compararse con los microorganismos nativos.

Es importante realizar ensayos en modelos animales donde se puedan evaluar el lugar de la desencapsulación de los probióticos, esto abre un panorama de procesos controlados para el desarrollo de más estrategias en caminadas al bienestar animal.

6. Bibliografía

- AAVV. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Fao & Who*, (October), 1–34. Retrieved from
- Abd-Talib, N., Hamidah Mohd-Setapar, S., Kamal Khamis, A., Nian-Yian, L., & Aziz, R. (2013). Survival of encapsulated probiotics through spray drying and non-refrigerated storage for animal feeds application. *Agricultural Sciences*, *04*(05), 78–83.
- Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, *29*(1), 166–174.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, *18*(5), 240–251.
- Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 17–24.
- Apún-Molina, J. P., Santamaría- Miranda, A., Luna-González, A., Martínez-Díaz, 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*(2000), 887–894.
- Ariful, M. I., Yun, C. H., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Ayyat, M. S., Labib, H. M., & Mahmoud, H. K. (2014). A Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Aquaculture*, *26*(3), 208–215.
- Bott, R. (2014). No Title No Title. *Igarss 2014*, *2674610*(1), 1–5.
- Cai, W. Q., Li, S. F., & Ma, J. Y. (2004). Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. *Aquaculture*, *229*(1-4), 79–87.
- Casula, G., & Cutting, S. M. (2002). *Bacillus* Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(5), 2344–2352.
- Cetinkaya, S., Osmanağaoğlu, O., & Cökmüş, C. (2003). Bacteriocin diversity in *Bacillus sphaericus*. *Folia Microbiologica*, *48*(2), 157–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12800496>

- Chaucheyras-Durand, F., & Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1(1), 3–9.
- Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67.
- Das, B. K., Nidhi, R. G. N., Roy, P., Muduli, A. K., Swain, P., Mishra, S. S., & Jayasankar, P. (2014). Original Research Article Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens, 3(5), 795–809.
- Del'Duca A, Evangelista Cesar D, Galuppo Diniz C, C. A. P. (2013). Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescentin situ hybridization technique. *Aquaculture*, 388, 115–121.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and Safety of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl 2), S129–S134.
- El-Haroun, E. R., Goda, a. M. a S., & Kabir Chowdhury, M. a. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473–1480.
- El-Sayed, A.-F. M. (2006). *Tilapia culture*. *Aquaculture* (Vol. 106).
- Fitzsimmons, K. (2007). Tilapia aquaculture in Mexico. *Tilapia Aquaculture in the Americas*, (Table 1), 171–183.
- Flores, M. L., Briones, L. E., & Novoa, M. a O. (2002). Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Avances En Nutrición Acu Memorias Del Simposium Internacional de Nutrición Acu*, 6, 314–335. R
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306–312.
- Garcia-marengoni, N., Moura, M. C. De, Tavares, N., & Oliveira, E. De. (2015). Short Communication Use of probiotics *Bacillus cereus* var . *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages, 43(3), 601–606.
- Gatlin, D. M., Li, P., Wang, X., Burr, G. S., Castille, F., & Lawrence, a L. (2006). Potential Application of Prebiotics in Aquaculture. *Aquaculture*, 371–376.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163. <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>
- Goderska, K., & Czarnecki, Z. (2008). Influence of microencapsulation and spray drying

- on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2), 135–140.
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 360(9356), 512–519.
- Guo, J.-J., Liu, K.-F., Cheng, S.-H., Chang, C.-I., Lay, J.-J., Hsu, Y.-O., ... Chen, T.-I. (2009). Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research* (Vol. 40).
- Hatje, E., Neuman, C., & Katouli, M. (2014). Interaction of *Aeromonas* strains with lactic acid bacteria via Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 681–6.
- Holt, J. H., Krieg, N. R., Sneath, P. H. a., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 13(6), 560.
- Irianto, a., & Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6), 333–342.
- Jiménez. (2010). *Fuentes De Bacterias Para La Colonización Del Intestino Del Neonato : Aplicación Para El*.
- Jiménez-Pranteda, M. L., Poncelet, D., Náder-Macías, M. E., Arcos, A., Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., & Ramos-Cormenzana, A. (2012). Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2), 179–184.
- Jiménez-Rojas, J. E., Alméciga-Díaz, P. A., & Herazo-Duarte, D. M. (2012). Desempeño de juveniles del pez ángel *Pterophyllum scalare* alimentados con el oligoqueto *Enchytraeus buchholzi*. *Universitas Scientiarum*.
- Kajimura, Y., & Kaneda, M. (1996). Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 49(2), 129–35.
- Kaur, I. P., Chopra, K., & Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1–9.
- Kaynar, P., & Beyatli, Y. (2009). Determination of poly-??-hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. isolated from the intestines of various fishes. *Fisheries Science*, 75(2), 439–443.
- Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*, 64, 567–576.
- 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.

- Kruis, W. (2013). Probiotics. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 31(3-4), 385–7.
- Kuever, J. F. A. R., & Widdel, F. (2006). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria.* (pp. 922–1143).
- Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., & Johri, B. N. (2012). Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A5F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Basic Microbiology*, 52(6), 670–678.
- Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2014). Characterization and Optimization of an Anti- *Aeromonas* Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* Isolated from Hukuti Maas an Indigenous Fermented Fish Product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 935–947.
- Lai, Q., & Yang, Y. (2004). Tilapia Culture in Mainland China. In *6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, ISTA* (Vol. 6, pp. 18–29).
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. a., Guzmán-Méndez, B. E., & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1-4), 193–201.
- Larsen, A. M., Mohammed, H. H., & Arias, C. R. (2014). Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(6), 1396–1404.
- Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, E. N., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, M. D., Nielsen, B., ... Jespersen, L. (2014). Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1105–1118. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5343-6>
- Liaskovskii, T. M., & Podgorskii, V. S. (2005). [Assessment of probiotics according to the international organizations (FAO/WHO)]. *Mikrobiologichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993)*, 67(6), 104–112.
- Lilley DM ; Stillwell RH. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747–748.
- Linares Rodríguez, J. F., & Martínez Menéndez, J. L. (2005). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*.
- Luis Balcázar, J., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., & Ruiz-Zarzuela, I. (2006). Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18(2), 65–70.
- Mahdhi, A., Esteban, M. Á., Hmila, Z., Bekir, K., Kamoun, F., Bakhrouf, A., & Krifi, B. (2012). Survival and retention of the probiotic properties of *Bacillus* sp. strains under marine stress starvation conditions and their potential use as a probiotic in *Artemia* culture. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1151–1159.

- Martín Villena, M., Morales Hernández, M., Gallardo Lara, V., & Ruiz Martínez, M. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular. *ARS Pharmaceutica*, 50(0004- 2927), 43–50.
- Martinez Cruz, P., Ibanez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramirez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol*, 2012, 916845.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. a., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13.
- Mjoun Kamal, Kurt.A, & Brown Michael L. (2010). Tilapia: Environmental Biology and Nutritional Requirements. *Fs963-02*, (1975), 7.
- 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.
- Montes Ramírez, L. M. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469).
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14(4), 213–223.
- Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, 13(1), 15. Retrieved from
- Naghmouchi, K., Baah, J., Cudennec, B., & Drider, D. (2013). Required characteristics of *Paenibacillus polymyxa* JB-0501 as potential probiotic. *Archives of Microbiology*, 195(8), 537–543.
- Nakayama, T., Lu, H., & Nomura, N. (2009). Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 679–684.
- Name, L., Name, F., Training, O., Training, P., Darin, C., Training, R. O., ... Co-investigator, N. (2014). *Brock biology of microorganisms. Igarss 2014*.
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11.
- Ng, W.-K., Kim, Y.-C., Romano, N., Koh, C.-B., & Yang, S.-Y. (2014). Effects of Dietary Probiotics on the Growth and Feeding Efficiency of Red Hybrid Tilapia, *Oreochromis* sp., and Subsequent Resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Applied Aquaculture*, 26(1), 22–31.
- Oliveira, a C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and L.

- acidophilus (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 673–81.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. *Drying Technology*, 25(10), 1687–1693.
- Oviedo P, M., Brú C, S., Atencio G, V., & Pardo C, S. (2013). Potencialidad de la región costera de córdoba -colombia- para el cultivo de tilapia nilótica. *Revista MVZ Cordoba*, 18(3), 3781–3789.
- Pandiyar, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 5(1), 55–59.
- Parra, R. / U. N. del C. (2011). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Open Journal Systems*, 37055.
- Pérez, M., Laurencio, M., Milián, G., Rondón, A. J., & Arteaga, F. (2012). Evaluación de una mezcla probiótica en la alimentación de gallinas ponedoras en una unidad de producción comercial Evaluation of a probiotic mixture on laying hens feeding in a commercial farm, 35(3), 311–320.
- Poopathi, S., & Abidha, S. (2009). A Medium for the Production of Biopesticides (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) in Mosquito Control. *Journal of Economic Entomology*, 102(4), 1423–1430.
- Ramírez, L. A. G., Ospina, A. J. G., Jaramillo, L. M. A., & Patiño, B. T. (2007). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. (Spanish). *Evaluation of the Fasibility of a Probiotic Vine Native of Lactobacillus Casei in Creamcheese. (English)*, 4(2), 37–42.
- Ramos, M. a., Weber, B., Gonçalves, J. F., Santos, G. a., Rema, P., & Ozório, R. O. a. (2013). Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 166(2), 302–307.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. a., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. *Small Ruminant Research*, 123(1), 155–159.
- Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16(6), 1195–1236.
- Riaz, Q. U. A., & Masud, T. (2013). Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(3), 231–44.
- Ricker, W. E. (1979). *Growth Rates and Models. Fish Physiology* (Vol. VIII).
- Ricker, W. E. (2010). *Computation and interpretation of biological statistics of fish*

- populations. *Bull. Fish. Resources Can* (Vol. 191).
- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., ... Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: A review. *Aquaculture Research*, 41(4), 451–467.
- Riveros, B., Ferrer, J., & Bórquez, R. (2009). Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*, 27(1), 123–132.
- Rodriguez-Barona, S., Montes, L. M., & De J. Ramirez, D. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersion en presencia de prebiótico. *Vitae*, 19(1), S186–S188.
- Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1–12.
- Saadatzadeh, A., Fazeli, M. R., Jamalifar, H., & Dinarvand, R. (2013). Probiotic properties of lyophilized cell free extract of *Lactobacillus casei*. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(3), 131–137.
- Saez, V., Hernández, J. R., & Peniche, C. (2007). Las Microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotechnol Aplicada*, 24, 98–107.
- Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., & Kannan, L. (2008). Probiotics in aquaculture: Importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 299–308.
- Serna C, Liliana, Valencia H, Leidy Johana, & Campos G, R. (2015). Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 9(1), 97–104.
- Sherwin, C. M., Christiansen, S. B., Duncan, I. J., Erhard, H. W., Lay, D. C., Mench, J. A., ... Carol Petherick, J. (2003). Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 81, pp. 291–305).
- Snydman, D. R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46 Suppl 2(Suppl 2), S104–S111
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., & Bhandari, B. (2013). The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2763–2769. <http://doi.org/10.1007/s11947-012-0938-y>
- Soottitantawat, a, Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by Spray Drying: Influence of Emulsion Size on the retention of volatile compounds. *Food Engineering and Physical Properties*, 68(7), 2256–2262.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., & Deguchi, Y. (1998). Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*, 165(3-4), 269–280.
- Toledo, J. S., & García, M. C. (2000). Nutrición y Alimentación de Tilapia Cultivada en

- América Latina y el Caribe. *Avances En Nutrición Acuícola IV. Memorias Del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18. 1998*, (537), 83–137.
- Vanderhoof, J. A., & Young, R. (2008). Probiotics in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 68(10), 67–72.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W. D., & Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium* - from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 957–967.
- Vázquez, J. a., González, M. P., & Murado, M. a. (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245(1-4), 149–161.
- Wagner, J. R., Mount, E. M., & Giles, H. F. (2014). *Extrusion. Extrusion*.
- Wang, Y. B., Tian, Z. Q., Yao, J. T., & Li, W. F. (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277(3-4), 203–207.
- Yanbo, W., & Zirong, X. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3-4), 283–292.
- Yáñez, J. F., Salazar, J. a M., Chaires, L. M., Jiménez, J. H., Márquez, M. R., & Ramos, E. G. R. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance Y Perspectiva*, 21, 313–319.
- Yi, Y. (1999). Modeling growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a cage-cum-pond integrated culture system. *Aquacultural Engineering*, 21, 113–133.
- Ying, D., Sun, J., Sanguansri, L., Weerakkody, R., & Augustin, M. A. (2012). Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 597–602.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 205–214.
- Zhang, W., Liu, M., & Dai, X. (2013). Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 685–691.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 501–509.
- Zink, I. C., Benetti, D. D., Douillet, P. A., Margulies, D., & Scholey, V. P. (2011). Improvement of water chemistry with *Bacillus* probiotics inclusion during simulated transport of yellowfin tuna yolk sac larvae. *North American Journal of Aquaculture*, 73(1), 42–48.

A. Productos derivados de la investigación

1. Libro: Editorial Lasallista 2016

Los microorganismos en la agroindustria: fundamentos y aplicaciones

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez

2. Revista Producción más limpia (A2). 2013. 8(1)

“Probióticos: una alternativa de producción limpia y de reemplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal”

Gutiérrez L.A., Montoya O.I, Vélez J.M.

3. Revista Alimentos hoy C

Vol 23, No 36 (2015)

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

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez, Carlos Arturo David, Ricardo García Naranjo,

4. Revista Alimentos hoy C

Vol 23, No 36 (2015)

Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez, Natalia De Araújo U, Orlando Simón Ruiz Villadiego, Olga Inés Montoya Campuzano

5. Revista Archivos de Zootecnia (A1) Universidad de Cordoba

Caracterización de bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas con actividad probiótica del tracto gastrointestinal de tilapia roja (*Oreochromis sp*)

Aceptado

*Luz Adriana Gutiérrez Ramírez; García Naranjo R. ² David Ruales C.A-³

¹cPhD, MSc Biotecnología, Docente Tc Corporación Universitaria Lasallista. Correo lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co

cMSc Microbiología Corporación Universitaria Lasallista ³MSc Acuicultura, Docente Tc Corporación Universitaria Lasallista

6. Revista Salud Animal (A1) La Habana Cuba

Efecto de la inclusión en la dieta de microorganismos probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de Tilapia roja (*Oreochromis sp*).

Aceptado

Luz Adriana Gutiérrez R¹. Carlos Arturo David R¹. Olga Inés Montoya C². Eliana Betancur³ Docentes de la Corporación Universitaria Lasallista. Grupo de Investigación en Producción, Desarrollo y Transformación Agropecuaria (GIPDTA). Carrera 51 118 sur 57 Caldas correo: lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co - Antioquia – Colombia

7. Journal of agriculture and animal sciences

Sometido

Suplementación funcional en acuicultura: desde la microencapsulación del probiótico hasta su liberación en el tracto gastrointestinal

¹Luz Adriana Gutiérrez - ²Magally Romero-³Silvia Andrea Quijano

*cPhD, MSc Biotecnología, Docente Tc Corporación Universitaria Lasallista. Correo lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co

²PhD Profesora Universidad Nacional de Colombia

³PhD Profesora ITM

8. Revista Biotecnología en el sector agropecuario A1

Sometido

Evaluación de la sobrevivencia a la microencapsulación por spray dry del *Lactobacillus delbrueckii sub bulgaricus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus polymyxa*

Luz Adriana Gutiérrez R., Natalia de Araujo, Blanca Cardona

9. Revista VITAE (A2)

Sometido

Actividad bactericida in vitro de *Bacillus megaterium* y *Lactococcus lactis* contra *Aeromonas veronii* y *Streptococcus agalactiae*

*Luz Adriana Gutiérrez Ramírez; David Ruales C.A.-² Magally Romero³

Presentaciones en Congresos

Modalidad Oral

ENICIP 2015

