



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Respuesta morfométrica intestinal en tilapia roja (*Oreochromis sp.*) alimentada con pellets enriquecidos con probióticos y prebióticos

Gibson Jonny Cornejo Dueñas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia
Año 2017

Respuesta morfométrica intestinal en tilapia roja (*Oreochromis sp.*) alimentada con pellets enriquecidos con probióticos y prebióticos

Gibson Jonny Cornejo Dueñas

Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar por el título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D., José Ader Gómez Peñaranda

Línea de Investigación:

Producción Animal Tropical

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Valle del Cauca, Colombia

Año 2017

Dedicatoria

Dedico esta tesis A. DIOS, quien inspiró mi espíritu para la conclusión de este proyecto de vida.

A mis padres quienes me dieron la vida, educación, apoyo y consejos.

A mi esposa, y a mis dos hijas, quienes han sido motivo para la culminación de esta investigación.

A mis maestros y amigos, quienes con su apoyo contribuyeron a la realización de este trabajo.

Reflexión

Muchos de los fracasos vitales son de gente que no se dieron cuenta lo cerca que estaban del éxito cuando se rindieron.

Thomas A. Edison.

Agradecimientos

Le agradezco a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira por darme la oportunidad de consolidar mis conocimientos.

A la Universidad Técnica De Manabí y especialmente al señor Rector por el apoyo brindado para alcanzar esta meta.

A Ibeth Yajaira Coronel Ortiz encargada del laboratorio de fisiología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

A mis profesores porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, compañeros de estudio, de trabajo y amigos.

Y por último al profesor, orientador y amigo director de tesis, Dr. José Ader Gómez Peñaranda por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis saberes y conocimientos con éxito.

Para todos: Muchas gracias y que Dios los bendiga

Resumen

Un factor relevante en la producción piscícola es el bienestar animal, una alternativa es el uso de prebióticos y probióticos para mejorar la resistencia a las enfermedades, regulan la microbiota intestinal y además busca lograr una mejor absorción de los nutrientes, disminuir la mortalidad y los altos costos de la alimentación, entre otros. Por todo ello, para conocer la actuación de estos compuestos, es recomendable evaluar las variaciones morfométricas microscópicas a nivel de intestino (altura, ancho y población de las vellosidades), en alevinos y juveniles de tilapia roja *Oreochromis sp.* Con el fin de explicar la respuesta fisiológica al enriquecer el alimento concentrado con prebióticos y probióticos en la alimentación. En la investigación se usaron 600 alevines y 600 juveniles de tilapia roja, y se aplicaron 4 tratamientos en cada etapa con 3 repeticiones cada una de 50 individuos, el Tratamiento Control (T1): Alimentación solo con concentrado comercial, T2: Alimentación con concentrado comercial más prebiótico comercial Oregostim®, T3: Alimentación con concentrado comercial más probiótico comercial Biossa®, T4: Alimentación con concentrado comercial más probiótico comercial Biomos®. Se tomaron 10 muestras por réplica y se conservaron en formol al 10%, para los cortes histológicos se empleó la técnica de inclusión en parafina, y tinción de hematoxilina & eosina. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa Motic Images Plus 2.0, obteniendo las mediciones de alto, ancho y densidad de vellosidades intestinales a 10x. La variable altura de vellosidades en alevines y juveniles con el T2, T3 y T4 alcanzaron las mayores longitudes, esto demostró que la inclusión de estos compuestos, generan cambios significativos ($P < 0,05$) en las vellosidades intestinales respecto al T1; En cuanto a la variable densidad de vellosidades en alevines, T2, T3 y T4 no aumentan el número de vellosidades por cm^2 respecto al control. En juveniles, al encontrarse diferencias, se pudo demostrar que T2 y T3 aumentaron el número de vellosidades por cm^2 , lo que mejora la capacidad de absorción de nutrientes en cada segmento de intestino. En la variable ancho de vellosidad en alevines, se encontró que T2, T3 y T4 no tienen incidencia en aumento o disminución del ancho de las vellosidades; en juveniles los resultados difieren ya que T3 y T4 tuvieron incidencia en la anchura de las vellosidades al aumentar su grosor. Lo que permite concluir que el comportamiento en la morfometría cuando se enriquece el alimento con probióticos y prebiótico varía dependiendo de la fase en que se encuentre el pez.

Palabras claves: Morfometría, Vellosidades, Intestino, Alevines, Juveniles.

Abstract

A relevant factor in fish production is animal welfare, an alternative is the use of prebiotics and probiotics to improve resistance to diseases, regulate the intestinal microbiota and also seeks to achieve better absorption of nutrients, decrease mortality and high Costs of food, among others. Therefore, in order to know the performance of these compounds, it is advisable to evaluate the microscopic morphometric variations at intestine level (height, width and villus population), in juvenile red tilapia juveniles *Oreochromis sp.* And thus explain the physiological response by enriching the feed concentrate with prebiotics and probiotics in feed. In the research 600 fry and 600 juveniles of red tilapia were used, and 4 treatments were applied in each stage with 3 replicates each of the 50 individuals, Control Treatment (T1): Feed only with commercial concentrate, T2: Feed with concentrate Commercial plus commercial prebiotic Oregostim®, T3: Feeding with commercial concentrate plus commercial probiotic Biosa®. T4: Feeding with commercial concentrate plus Biomos® commercial probiotic. Ten samples were taken per replicate and preserved in 10% formaldehyde, for the histological sections the paraffin inclusion technique was used, and hematoxylin & eosin stain. The obtained images were processed in the program Motic Images Plus 2.0, obtaining the measurements of high, width and density of intestinal villi to 10x. The variable height of villi and juveniles with T2, T3 and T4 reached the highest lengths, this showed that the inclusion of these compounds, generate significant changes ($P < 0.05$) in the intestinal villi with respect to T1; As for the variable villus density in fingerlings, T2, T3 and T4 do not increase the number of villi per cm^2 with respect to the control. In juveniles, when differences were found, it was demonstrated that T2 and T3 increased the number of villi per cm^2 , which improves the nutrient absorption capacity in each intestine segment. In the variable villus width, it was found that T2, T3 and T4 did not have an incidence in increase or decrease of villus width; in juveniles the results differ as T3 and T4 had an incidence in the width of the villi when increasing its thickness. This leads us to conclude that morphometry behavior when probiotics and prebiotics are enriched depends on the stage of the fish.

Key words: Morphometry, Villus, Intestine, Fry, Juveniles.

Contenido

1. Introducción	1
2. Marco Teórico.....	4
2.1 Importancia de la piscicultura en Colombia.....	4
2.2 La Especie	6
2.3 Distribución, Hábitat y Taxonomía.....	7
2.4 Sistema Digestivo de la Tilapia	9
2.5 Alimentación.....	11
2.5.1 Alimentación en Alevines y Juveniles	12
2.6 Prebióticos y Probióticos	13
2.6.1 Empleo de prebióticos y probióticos en acuicultura	15
2.6.2 Prebióticos y probióticos comerciales	21
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo General	27
4.2 Objetivo Específicos.....	27
5. Materiales y Métodos.....	28
5.1 Descripción general de la instalación.....	28
5.2 Parámetros de agua.....	28
5.3 Diseño experimental.....	29
5.3.1 Material biológico	29
5.3.2 Periodo experimental	30
5.4 Adición del prebiótico y probióticos al alimento	30
5.5 Pruebas histológicas	31
5.5.1 Técnica de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E)	31
5.6 Evaluación morfológica microscópica de vellosidades intestinales	32
5.7 Análisis estadístico.....	33
6. Resultados.....	34
6.1 Análisis morfológico de vellosidades intestinales en alevines	35
6.2 Análisis morfológico de vellosidades intestinales en juveniles.....	39
7. Discusión.....	42
8. Conclusiones.....	44
9. Bibliografía	45

Lista de Figuras

Figura 1. Producción Pesquera en Colombia 1985-2010	5
Figura 2. Placa de Intestino de la Tilapia.....	35
Figura 3. Relación altura de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Alevines..	37
Figura 4. Relación Ancho de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Alevines.	38
Figura 5. Densidad de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Alevines.....	38
Figura 6. Relación Altura de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Juveniles	40
Figura 7. Relación Ancho de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Juveniles	41
Figura 8. Densidad de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Juveniles	41

Lista de Tablas

Tabla 1. ANDEVA para datos de medidas morfométricas en Alevines	36
Tabla 2. Resultados morfométricos de las vellosidades intestinales-obtenidos con los diferentes tratamientos.....	37
Tabla 3. ANDEVA para datos de medidas morfométricas en Juveniles	39
Tabla 4. Resultados morfométricos de las vellosidades intestinales obtenidos con los diferentes tratamientos.....	40

1.Introducción

Uno de los factores relevantes en la producción animal es la alimentación, esta representa entre el 50 y el 70% de los costos de producción. A este respecto, la producción piscícola no es la excepción, aun peor, los costos son los más elevados respecto a otras producciones pecuarias. El alto costo se debe en gran medida, a que las especies piscícolas necesitan para su nutrición, alimentos con elevados niveles proteicos, y la mayoría de las fuentes proteicas con que se fabrican estos alimentos son costosas, por lo que buscar alternativas que permitan maximizar el aprovechamiento de la proteína del alimento en términos nutritivos, sería una buena opción para mejorar la gestión de la alimentación.

Una alternativa es el uso de prebióticos, los cuales son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero, y probióticos, que son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino los cuales sirven para mejorar crecimiento como también la resistencia a enfermedades (Cota-Rubio E., Hurtado-Ayala L., Pérez-Morales E., 2008).

La utilización de prebióticos y probióticos en la producción de peces, busca lograr una mejor absorción de los nutrientes, disminuir la mortalidad y mejorar la resistencia a las enfermedades, entre otros. El uso de prebióticos y probióticos en el alimento ha demostrado tener un impacto significativo en la salud del pez, además del resultado económico en su producción; reduciendo el riesgo de enfermedades y la necesidad de medicamentos y/o aditivos tales como hormonas y antibióticos (Cota Gastélum, 2011).

La biotecnología moderna en acuicultura ha desarrollado productos que regulan la flora bacteriana intestinal a través de diversos microorganismos llamados probióticos (denominados así por su acción opuesta a la de los antibióticos), creando barreras biológicas para evitar la infección de peces y camarones, que ocasiona altas mortalidades en piscinas y estanques (Cota Gastélum, 2011).

En el mercado son conocidos los productos como Oregostim®, BioMos®, y Biosa® desarrollados por casas comerciales extranjeras, empleados en las producciones pecuarias a nivel industrial, y que cuentan con investigaciones que soportan su eficacia en la gran mayoría de las especies animales, pero muy pocos estudios en peces.

A este respecto, en Colombia son pocos los estudios científicos realizados que midan la influencia de los probióticos y prebióticos en la absorción de nutrientes procedentes de la alimentación en especies piscícolas, y solo se han evaluado los parámetros de crecimiento y aprovechamiento nutritivo dejando a un lado la importancia de la respuesta fisiológica del sistema digestivo (Gatesoupe, 1999; Villamil Diaz & Martinez Silva, 2009)

Además, la piscicultura de tilapia es la más extendida en el mundo, pues debido a su adaptabilidad se producen en todos los continentes. En Colombia, la tilapia roja es la especie piscícola más explotada de forma intensiva y extensiva representando un 51,77% en comparación a las otras especies nativas y foráneas (Incoder & Minagricultura, 2011).

Por todo ello, es necesario evaluar las variaciones morfométricas a nivel de intestino (altura de las vellosidades intestinales, ancho de las vellosidades, número de vellosidades (densidad por campo) y así complementar el estudio científico

sobre la respuesta fisiológica al enriquecer el alimento concentrado con prebióticos y probióticos en la alimentación de Tilapia roja *Oreochromis sp.*

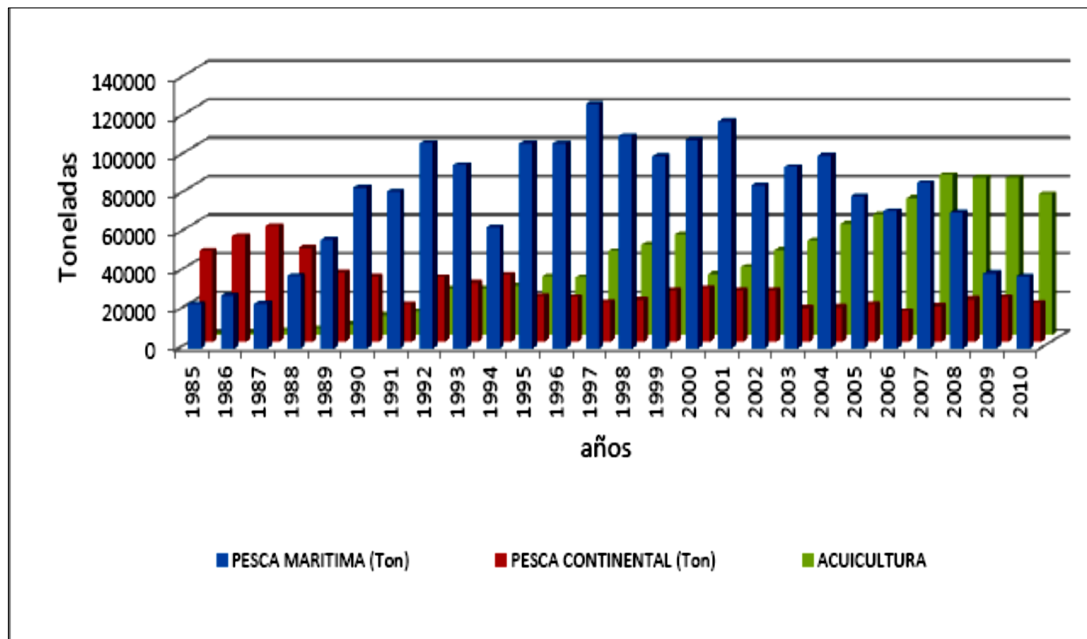
2. Marco Teórico

2.1 Importancia de la piscicultura en Colombia

Colombia cuenta con tres espacios pesqueros muy amplios y diferentes que son el Océano Pacífico, el Mar Caribe y las áreas continentales. En la Figura 1, se muestra la producción nacional en los últimos 25 años, se observa que la pesca ha disminuido, especialmente en aguas dulces, mientras que la acuicultura se ha incrementado. La producción pesquera total para 2010 fue 128.742 toneladas, de las cuales, la acuicultura aportó el 55.09% (Incoder & Minagricultura, 2011).

La producción pesquera total del país ha tenido valores promedio de 160.000 toneladas anuales en los últimos 20 años; A principios de los 90's las capturas de la pesca industrial representaban un 55%, la pesca artesanal un 25% y la acuicultura un 20%, sin embargo para el año 2014 se presentó un incremento en la acuicultura y disminución en la pesca industrial y artesanal así 29% la pesca industrial, 20% la artesanal y un 51% la acuicultura (AUNAP, 2014).

La producción de la acuicultura nacional en el 2011 fue de 82.733 toneladas, de las cuales más de la mitad correspondió a las tilapias roja y plateada, casi un 20% a las cachamas blanca y negra, cerca de un 7% a trucha, 10% a camarón, y el resto a otras especies nativas y exóticas (AUNAP, 2014).

Figura 1. Producción Pesquera en Colombia 1985-2010

Fuente: Incoder & Minagricultura, (2011).

La tendencia de crecimiento de la acuicultura en el periodo 1985 a 2010 es muy alta representando el 20.44% anual promedio y pasa de 572 toneladas en 1985 a cerca de 73.000 en 2010 mostrando menor crecimiento que otros países de Latinoamérica, supera la tasa media del crecimiento del resto del sector agropecuario y del conjunto total de la economía nacional. (Incoder & Minagricultura, 2011) (Figura 1).

En el caso del consumo aparente de los productos de la acuicultura y la pesca en Colombia, se observa que en los últimos veinte años se ha incrementado el consumo per cápita de estos productos, al pasar de 2,5 kilos en la década de los años 80's a 4.3 kilos en los 90's y 6.4 kilos en la actual década (AUNAP, 2014).

La piscicultura es muy seguramente una de las actividades pecuarias que más aporta a la seguridad alimentaria, pues a pesar de las complejidades que pueda tener de índole ambiental o pesquero, en las riberas de los ríos y en los

litorales colombianos, existe una amplia población que depende del sustento diario de la comercialización del pescado mediante la pesca de pequeña escala o artesanal (AUNAP, 2014).

Tradicionalmente la producción piscícola ha sido destinada al mercado nacional, pero a partir del 2008 las exportaciones se han ido incrementado considerablemente. La cantidad de acuicultores en el país se calcula en alrededor de 29.400, de los cuales, más del 99% son piscicultores y el 90% son Acuicultores de Recursos Limitados – AREL.

La actividad aporta cerca del 0,7% del PIB nacional y la superficie dedicada a la piscicultura se calcula en 2.130 hectáreas. La producción nacional en el año 2011 fue la siguiente: Tilapias roja y plateada: 48.400 toneladas métricas, Cachamas blanca y negra: 15.900 toneladas métricas, Trucha: 5.600 toneladas métricas de las cuales, el 50% se comercializa en el mercado nacional y el otro 50% se exporta principalmente a la Unión Europea (AUNAP, 2014).

2.2 La Especie

Las Tilapias son peces originarios de África y el Cercano Oriente, en donde se inicia la investigación a comienzos del siglo XIX, aprovechando sus características y adaptabilidad se consideraron ideales para la piscicultura rural, especialmente en el Congo Belga (actualmente Zaire); a partir de 1924 se intensifica su cultivo en Kenia, sin embargo fue en el Extremo Oriente, en Malasia en donde se obtuvieron los mejores resultados y se iniciara su progresivo cultivo en el ámbito mundial.

Las Tilapias han sido introducidas en forma acelerada hacia otros países tropicales y subtropicales en todo el mundo, cultivándose en 85 países, y el 98% de toda la producción se realiza fuera del ambiente normal de las tilapias, recibiendo el sobrenombre de las gallinas acuáticas, ante la aparente facilidad de

su cultivo soportado en la rusticidad para su manejo, alta adaptabilidad a diferentes condiciones del medio, en algunos casos aún las más extremas, fácil reproducción, alta resistencia a enfermedades, alta productividad, generalmente herbívoras aunque aceptan todo tipo de alimentos tanto naturales como artificiales, incluyendo los producidos por intermedio de la fertilización orgánica o química lo que las convierte en peces omnívoros (Castillo Campo, 2006)

La tilapia se ha introducido en todo el mundo y se cría de manera generalizada en los trópicos y las zonas subtropicales. Este pez presenta muchos atributos adecuados para su domesticación y cría. Entre ellos se incluyen la buena calidad y el sabor de su carne, una gran tolerancia a distintos entornos, su resistencia a muchas enfermedades habituales de los peces y la relativa facilidad de reproducción que presenta en cautividad (Estevez, 1990).

2.3 Distribución, Hábitat y Taxonomía

Los cíclidos se clasifican en el Orden Perciformes y habitan las aguas dulces y salobres de África, el Medio Oriente, las zonas costeras de la India, América Central, del Sur y el Caribe, incluyendo a Cuba. Sin embargo, las verdaderas tilapias son nativas de África y el Medio Oriente. En estos momentos, debido a su introducción por el hombre, está representada en la zona tropical y subtropical de todo el mundo, incluyendo Asia y Oceanía.

Los cíclidos son bien conocidos como peces de acuario por su gran capacidad de adaptación a los nuevos ambientes. También muestran un comportamiento reproductivo especializado, muy relacionado con su compleja biología evolutiva. Una característica distintiva de los géneros que integran el grupo de las tilapias es su característica reproductiva, que se refiere al tipo de cuidado que los progenitores brindan a sus crías.

En los géneros *Sarotherodon* y *Oreochromis*, los padres incuban los huevos en la boca y una vez nacidos, cuidan a la descendencia por un tiempo adicional (incubadores bucales); las que pertenecen al género *Tilapia*, la incubación se realiza sobre un sustrato fijo en el fondo, o construyendo un "nido" sobre ellos (Toledo & Garcia, 2000).

Dentro de áreas originales de distribución, las tilapias han colonizado hábitats muy diversos; arroyos permanentes y temporales, ríos anchos y profundos, lagos profundos, lagos pantanosos, lagunas de agua dulce, salobres o saladas. Las tilapias cultivadas habitan por lo general en aguas lenticas (poca corriente), permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas donde se alimentan y reproducen (Toledo & Garcia, 2000)

De acuerdo a la clasificación de Berg, modificada por (Trewavas, 1983), las tilapias se clasifican de la siguiente manera:

Phyllum	Chordata
Subphylum	Craneata
Superclase	Gnathostomata
Serie	Pisces
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciforme
Suborden	Percoidei
Familia	Cichlidae
Género	1) <i>Tilapia</i>
Especie	a) <i>rendalli</i> b) <i>zillii</i>
Género	2) <i>Oreochromis</i>
Especie	a) <i>aureus</i> b) <i>niloticus</i>

c) *mossambicus*

d) *urolepis homnorum*

La tilapia roja (*Oreochromis sp.*) es el resultado del cruzamiento de las siguientes especies (Toledo Perez & Garcia Capote, 2000):

Oreochromis mossambica (Tilapia Mozambique)

Oreochromis aureus (Tilapia Dorada)

Oreochromis homnorum (Tilapia Mojarra)

Oreochromis niloticus (Tilapia del Nilo)

La tilapia roja, pez que taxonómicamente no responde a un nombre científico, es el producto del cruce de cuatro especies de tilapia: tres de ellas de origen africano y una cuarta israelita; el cruce selectivo permitió la obtención de un pez cuya coloración fenotípica puede ir desde el rojo cereza hasta el albino, pasando por el animal con manchas negras o completamente negro (Villarruel Castillo, Angel Armas, & Céspedes, 2011).

2.4 Sistema Digestivo de la Tilapia

El aparato digestivo comienza en la boca, continuando con la faringe, la cual está perforada lateralmente por los arcos branquiales. La faringe se continúa en el esófago, que es muy elástico y disponiendo de células secretoras de una sustancia mucilaginosa que favorece el avance del bolo alimenticio hacia el estómago. Es característica una diferenciación en tamaño del intestino, dependiendo de la alimentación de los peces, es corto en los de los peces depredadores carnívoros y largos los de los herbívoros (Villarruel Castillo *et al.*, 2011).

Órganos tales como el hígado o el páncreas forman parte del aparato digestivo, teniendo funciones de favorecimiento de la digestión, por ejemplo, la

adición de bilis e incluso de generación de reservas como es el caso de formación de glucógeno (Brown, 2000).

El tamaño del intestino es relevante, ya que permite un ajuste a diferentes tipos de dietas, ofreciendo la posibilidad de una mejor adaptación a las condiciones ecológicas. Esto es cierto tanto para la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* como para la tilapia roja *Oreochromis sp.*, debido a que todas las especies de cíclidos poseen intestinos largos (Pineda S. *et al.*, 2012).

El mismo Pineda S. *et al.*, (2012), sugirieron que la longitud del intestino varía de una manera continua como una función de la dieta, hecho observado en los cíclidos del lago Tanganica, en donde existe un intercambio entre la maximización de los nutrientes y la absorción de la energía y la mayor longitud del tejido intestinal.

En la pared intestinal se encuentran estructuras llamadas vellosidades intestinales, las cuales aumentan la superficie de absorción del mismo (Rodríguez & Beltrán Amaris, 2012)

Las vellosidades intestinales según Herrería Roman, (2013) son proyecciones digitiformes o evaginaciones, y cuya superficie está tapizada por una sola hilera de células epiteliales de diversos tipos; que afectan la mucosa intestinal y amplifican la superficie de absorción unas 5-6 veces. Para Ferrufino, Taxa, & Angeles (1996), las vellosidades son responsables del área de superficie de la mucosa intestinal.

Según Rodríguez & Beltrán, (2012) “la morfología y longitud del tracto digestivo está relacionada con el régimen alimentario de los peces, que puede variar ampliamente en el medio natural, de una especie a otra”.

Múltiples investigaciones se han adelantado, con la finalidad de evaluar los alimentos alternativos y su efecto sobre el comportamiento productivo de los animales sin observar los efectos en las estructuras anatómicas (Preston, 1995).

Estudios científicos en otras especies en las cuales se ha utilizado la inclusión de morera como sustitución parcial del concentrado comercial en reproductoras porcinas, el análisis del intestino delgado mostró una mayor integridad de las estructuras histológicas presentes en el duodeno y ciego, arrojando como resultado un mayor número y tamaño de las vellosidades intestinales (Rodríguez & Beltrán, 2012).

La estructura de la mucosa intestinal revela información muy útil sobre la fisiología del intestino. El tamaño y la densidad de las microvellosidades es otro factor a tener en cuenta en la capacidad del intestino para digerir y absorber alimento (Rodríguez & Beltrán Amaris, 2012). A mayor altura de las vellosidades intestinales traduce en un aumento no sólo de la superficie intestinal, sino también, de la actividad de las enzimas y de los sistemas de transporte de nutrientes lo que da lugar a una activación de las funciones de digestión y absorción (Pluske & Dong, 1998; Rodríguez & Beltrán, 2012).

2.5 Alimentación

La alimentación de la tilapia en producciones intensivas piscícolas se basa principalmente en concentrados y suplementos que contengan todos los nutrientes necesarios. El concentrado puede esparcirse en el agua, sobre toda la superficie del estanque o depositarla siempre en el mismo sitio (Villarruel Castillo *et al.*, 2011).

Mendoza *et al.*, (2013) concluyen que los parámetros nutricionales y hábitos de las especies, varían según la edad, siendo estos desde componentes de plancton, hasta frutos, semillas, follaje y proteína de origen animal.

La variación de la morfo-histología de las porciones del tubo digestivo se debe a las funciones específicas de cada órgano según el proceso digestivo que desempeña.

2.5.1 Alimentación en Alevinos y Juveniles

Usualmente, la fase de alevinos en tilapia, comienza cuando estos alcanzan peso entre 0.2 – 1.0 g y termina con un peso promedio de 8.0 g. Cuando inicia la fase de alevinaje, la alimentación se complementa con producción de plancton en la columna de agua (fertilización orgánica) más concentrado que incluye harina de pescado (35% Proteína Cruda) con una frecuencia de alimentación de 7 a 8 veces al día. Las tasas de alimentación están en el rango de 30% de la biomasa al inicio hasta un 10% al final de la fase de alevinaje. Algunos productores tailandeses de tilapia en la primera fase de crecimiento (larval); alimentan con una fina harina de pescado (60% Proteína Cruda) para abastecer necesidades nutritivas e iniciar la alimentación. El inicio de la alimentación, antes de absorbido el saco vitelino, parece beneficioso para las tilapias en su fase inicial de producción (alevinaje) (Castillo Campo, 2006).

De Silva & Gunasekera, (1989) encontraron que un contenido de 34 - 36 % de proteína cruda en la dieta proporciona el mayor crecimiento en alevinos de tilapia, sin embargo, por un menor costo dietario, recomiendan un nivel de proteína cruda que no supere el 30%. Los alevinos de tilapia son alimentados con harina de pescado, afrecho de arroz, o tortas de aceite por separado o con una combinación de estos en forma de polvo o en pasta. Sin embargo, las prácticas de alimentación dependen del sistema de producción.

La fase de juveniles inicia con un peso promedio de 10 g y termina con un peso final de entre 30 a 40 g, la alimentación en sistemas de producción semi-intensivo e intensivo, está fundamentada en la combinación de dietas balanceadas más fertilización de la columna de agua para incentivar la producción de plancton,

los concentrados balanceados varían su porcentaje de proteína entre 28 a 32 de proteína cruda, y la frecuencia de alimentación supone suministrar el alimento entre 4 a 5 veces al día (Castillo Campo, 2006).

2.6 Prebióticos y Probióticos

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que promueven la salud del huésped al estimular selectivamente el crecimiento y la actividad de una bacteria benéfica o un grupo de ellas en el tracto digestivo (Partida Arangure, 2009). Algunos investigadores lo precisan como el citoesqueleto de los vegetales, una sustancia inerte que algunos tipos de bacterias pueden fermentar, sin posibilidad de ser desdobladas por las enzimas digestivas, por lo que resulta inabsorbible (Rojas, 1994).

Para que una sustancia (o grupo de sustancias) pueda ser calificada como prebiótico debe cumplir algunos criterios: 1) origen vegetal, 2) No pueden ser hidrolizada ni absorbida en el tracto gastro-intestinal, 3) Selectiva para bacterias benéficas, y 4) su fermentación debe generar efectos beneficiosos locales o sistémicos en el hospedador (Manning & Gibson, 2004).

Los prebióticos que tiene un mayor uso potencial, son aquellos posibles aditivos de los alimentos con características además de no digeribles, químicamente estables, fácil conservación (no refrigeración) y de rápida incorporación a los alimentos. En su gran mayoría, los prebióticos descritos suelen ser carbohidratos y oligosacáridos con diferentes estructuras moleculares, presentes habitualmente en la dieta, como las fibras, aunque los más prometedores son los oligosacáridos no digeribles (ODNs). Los prebióticos más ampliamente estudiados son los fructanos inulina y oligofructosa, (Kelly, 2009; Roberfroid, 2005; Seifert & Watzl, 2007). Al respecto, otros oligosacáridos como los xilooligosacáridos, derivados de materiales ricos en xilano, integran hidratos de carbono no digeribles alternativos que pueden presentar las mismas propiedades esperadas que los

prebióticos conocidos (Drakoularakou, A. McCartney, Rastall, & Gibson, 2004; Vázquez, Alonso, Domínguez, & Parajó, 2000). Otros oligosacáridos con propiedades prebióticas potenciales incluyen los transgalactooligosacáridos, lactulosa, isomalto-oligosacáridos, lactosacarosa, oligosacáridos de la soja y gluco-oligosacáridos (Vulevic, Rastall, & Gibson, 2004).

La acción de los prebióticos ejerce un impacto positivo sobre la microbiota intestinal, pero hay que considerar otros efectos indirectos, como la regulación del metabolismo de la microbiota intestinal y las propiedades inmuno-moduladoras mediados por la microbiota intestinal (Vrese & Schrezenmeir, 2008).

La utilización conocida de probióticos es tan antigua como los métodos prehistóricos de conservación de alimentos (Bengmark, 1998). Una aproximación al concepto de probióticos lo refiere, Parker, (1974) como “organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal microbiano”. Dicha definición pone en la dimensión al probiótico como un microorganismo vivo que suplementa la alimentación y beneficia al hospedero mejorando el equilibrio de la flora microbiana; en ese mismo sentido lo define (Partida Arangure, 2009). Tannock, (1996), propone referirse a organismos o células microbianas que mejoran la salud del hospedero, siendo suministradas como suplemento en la dieta.

En 1998, la Comisión Europea definió a los probióticos como ingredientes microbianos vivos de la dieta que son beneficiosos para la salud y FAO (2011) como microorganismos vivos que al ser administrados en la dosis adecuada otorgan beneficios al huésped.

Es común que la principal característica de los probióticos es referirse a microorganismos vivos; muchos de los efectos conseguidos al ser utilizados como células viables se han obtenido también para poblaciones de células muertas, es decir, tanto células vivas como muertas pueden generar respuestas biológicas beneficiosas (Adams, 2010; Díaz-Rosales *et al.*, 2006).

Un buen ejemplo de lo que podría ser esperado de los probióticos es: (1) antagonismo a patógenos, (2) colonizadores del intestino, (3) mejoramiento de la supervivencia.

Entre bacterias marinas es frecuente el antagonismo. Al respecto, más del 60% de las bacterias aisladas del zooplancton fueron bacteriolíticas (Nair, Sukamoto, & Shimidu, 1985). También es común la actividad microbiana en la microbiota de agua dulce (Sugita, Shibuya, Shimooka, & Deguchi, 1996). En los procesos de crianza del mero *Epinephelus marginatus* son colonizados por *Pseudomonas* (Bergh, Naas, & Harboe, 1994). *Alteromonas haloplanktis* limitó la mortalidad de la almeja *Argopecten purpuratus* causado por una infección experimental con *Vibrio anguillarum* (Riquelme *et al.*, 1996).

En Colombia, a pesar de que actualmente se usan probióticos comerciales en el cultivo de organismos acuáticos, no se han realizado estudios en los que se evalúe a profundidad los beneficios de su aplicación. De esta manera Villamil Diaz & Martinez Silva (2009), proponen realizar estudios para comparar el efecto de los probióticos vivos con las células inactivas, o probar otros compuestos como bacteriocinas. Cabe mencionar que los productos probióticos que se comercializan en el país son importados, por lo cual la realización de proyectos encaminados a obtener una formulación de probióticos con aislados bacterianos nativos a escala comercial que pueda ser probado con las características propias de nuestros cultivos, sería un importante avance en la prevención de las enfermedades que afectan dramáticamente el sector acuicultor (Villamil Diaz & Martinez Silva, 2009).

2.6.1 Empleo de prebióticos y probióticos en acuicultura

Los prebióticos en la acuicultura se utilizan para mejorar el crecimiento y la resistencia a enfermedades en los peces, a la mejora económica y a la viabilidad y sostenibilidad de la piscicultura. Varios estudios han demostrado que la dieta con

prebióticos mejora el crecimiento y la salud de los recursos acuáticos animales (Sakai *et al*, 1996). En un reciente estudio se pudo determinar que el sistema inmune de peces puede reconocer moléculas no autónomas (prebiótico Oligosacárido-MOS) a través de receptores que identifican patrones moleculares, que son característicos de los microbios (patrones moleculares asociados) que estimula los leucocitos de peces para producir lisozima y otros péptidos antimicrobianos. Por otra parte, MOS proporciona el sustrato manosa en la que las bacterias intestinales patógenas se unen selectivamente afectando la adherencia a los enterocitos, lo que lleva a una mejor salud intestinal, integridad de las vellosidades y captación de la dieta nutritiva (Yuji *et al*, 2015).

En experimentos iniciales de uso de probióticos en alimentos para acuicultura, se utilizaron preparaciones comerciales diseñadas para organismos de producción terrestre. El primero en ser evaluado fue el *Bacillus toyoi*, esporas mejoraron la tasa de sobrevivencia de la anguila *Anguilla japonica* y la tasa de crecimiento del jurel *Alectis alexandrinus* (Kozasa, 1986). El uso de bacterias ácido lácticas mejoró la producción de rotíferos, y el crecimiento de larvas de lenguados *Solea solea* (F. J. Gatesoupe, 1990). A su vez, determinados bacilos mejoraron la tasa de crecimiento de la carpa *Cyprinus carpio* (Noh, Han, Won, & Choi, 1994).

En larvas de crustáceos se han obtenido resultados exitosos seleccionando probióticos del medio acuático. Nogami & Maeda, (1992) aislaron una cepa bacteriana que reduce el crecimiento del *Vibrio spp*, patógeno de decápodos, e incrementa la producción de la larva del crustáceo *Portunus trituberculatus*. En el Ecuador, Griffith (1995) reportó que larvas de camarón fueron afectadas por una enfermedad bacteriana caracterizada por un descenso en cantidades de *V. alginolyticus* y el incremento de *V. parahaemolyticus*. Esta cepa de *V. alginolyticus* fue exitosamente empleada para curar la enfermedad.

Por lo general, la mayoría de los microorganismos probióticos formulados para acuicultura pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (LAB), de los cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Estos son considerados como GRAS ("Generally recognized as safe"), reduciendo de este modo la necesidad de ensayos de seguridad biológica, inevitables para garantizar que la implementación de probióticos aislados no van a causar daños colaterales a los organismos cultivados ni al consumidor final (Holzapfel, *et al.*, 1998). El uso de probióticos como LAB está relativamente bien establecido en otras especies animales y destacan el aumento de tamaño y peso, el establecimiento de un equilibrio microbiano intestinal, así como la mejora de algunas respuestas inmunes (Broudiscou & Jouany, 1995; Wallace & Newbold, 1995).

En peces, las LAB se han descrito como parte de la microbiota normal de los organismos (Ringo & Strom, 1994; Strøm & Olafsen, 1990). La administración de LAB exógenas también se ha asociado con la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Gildberg *et al.*, 1995; Lewus, *et al.*, 1991); como promotor de crecimiento de peces (Noh *et al.*, 1994), y, en algunos casos, con un aumento en la supervivencia de peces infectados experimentalmente (Gatesoupe, 1994; Gildberg *et al.*, 1995; Robertson, *et al.*, 2000).

La prevención de la colonización de bacterias perjudiciales con una selección de cepas bacterianas, se ha propuesto como una alternativa importante para el control microbiano en el cultivo de *Artemia* (Verschuere *et al.*, 1999). También se ha demostrado que algunas de éstas cepas bacterianas seleccionadas pueden prevenir el crecimiento de bacterias patógenas como *Vibrio proteolyticus* en el cultivo de *Artemia* (Verschuere *et al.*, 1999).

Recientemente, Balcázar *et al.*, (2007)^a J. Balcazar *et al.*, (2007)^b, demostraron que *Lactococcus lactis ssp. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* aislados de salmónidos, eran capaces de persistir en el intestino de la trucha arco iris (*Salmo*

trutta) y aumentar significativamente la actividad de la lisozima después de la suplementación de alimentos con probióticos.

Las LAB también se han aplicado con éxito en el cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*). F. Gatesoupe (1991), informó que un preparado comercial de *Lactobacillus plantarum* en estado viable disminuyó el recuento de *A. salmonicida* y otras bacterias asociadas a los rotíferos. Harzevili, Duffel, Dhert, Swings, & Sorgeloos (1998), demostraron que *L. lactis* (AR21) tienen un efecto inhibitorio contra *V. anguillarum* en cultivo de rotíferos en condiciones subóptimas y, de igual forma, demuestra un incremento significativo en el crecimiento en condiciones de alimentación óptimas.

- Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal

Es conocido que las bacterias para adherirse y sobrevivir en el mucus entérico son significativas en el establecimiento de la microbiota intestinal. La capacidad de adherencia es una característica que es aprovechada tanto por las bacterias probióticas como por las patógenas. Para el caso de las probióticas, éste ha sido uno de los criterios más significativos para su selección y aplicación en acuicultura según Nikoskelainen, Ouwehand, Goran, Salminen, & Lilius (2003), mientras que para las patógenas la habilidad para adherirse, se relaciona con la virulencia y se considera como el primer paso para una infección (Villamil Diaz & Martinez Silva, 2009).

En acuicultura, la información disponible indica que las bacterias aisladas de animales cultivados o de su entorno tienen mayor capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal y a los tejidos, que las de otras bacterias exóticas que suelen ser transitorias, por lo que nace la necesidad que los probióticos sean consecutivamente bien administrados, ya sea como suplemento en el alimento o a través del agua de cultivo (Villamil Diaz & Martinez Silva, 2009). Este mismo autor indica que microorganismos aislados de un organismo pueden colonizar otras

especies cultivadas, demostrando así la falta de especificidad para la colonización del tracto digestivo.

- Producción de antibióticos / compuestos antivirales

La selección de microorganismos con acción probiótica también se puede determinar por la capacidad de generar productos extracelulares (ECPS) que pueden inhibir otras bacterias potencialmente patógenas, entre ellas sustancias antibacteriales, enzimas bacteriolíticas, ácido láctico, ácidos orgánicos y bacteriocinas (Villamil & Martínez, 2009).

Por otra parte, los péptidos antimicrobianos derivados de estas bacterias interactúan con las células del sistema inmunológico y pueden ser reconocidos por ellas, gracias a los anticuerpos policlonales contra bacteriocinas como la nisina y pediocina en peces. Adicionalmente, algunas bacterias ácido-lácticas (LAB) también ostentan actividad contra bacterias Gram-negativas como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* y *Proteus vulgaris*. La carnocina de *Carnobacterium piscicola* también ha resultado eficaz para combatir a *Aeromonas hydrophila*. Estudios más recientes han encontrado un nuevo género de bacterias aisladas de granjas productoras de rodaballo (*Scophtahmus maximus*), roseobacter, como probióticos basado en la actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de peces marinos *V. anguillarum* y *V. splendidus* (Villamil Diaz & Martínez Silva, 2009).

- Producción de compuestos benéficos

Las bacterias marinas y las levaduras pueden llegar a ser un recurso de proteína trascendente en el mejoramiento del aporte nutricional de varias especies acuáticas cultivadas, debido al perfil de aminoácidos que contienen (Villamil & Martinez, 2009). En varios aislados de bacterias intestinales, se ha demostrado alta producción de ácidos grasos de cadena corta y también su contribución al valor nutritivo de los rotíferos y peces (Clements, 1997).

De la misma manera, los lípidos producidos por microorganismos marinos se han descrito como sustancias importantes para la nutrición de especies acuáticas como el rodaballo y la tilapia (Kihara & Sakata, 1997). Por otra parte, la producción de enzimas como lipasas, quitinasas y proteasas, pueden favorecer al proceso digestivo de los organismos cultivados, especialmente en estadios larvales de bivalvos (Prieur *et al.*, 1990), y camarón (Wang *et al.*, 2000).

- Mejoramiento de las funciones inmunes

En numerosas publicaciones científicas describen un aumento en la resistencia de peces tratados con probióticos durante infecciones experimentales (Balcazar *et al.*, 2006). Existen pocas investigaciones en las que se estudien a profundidad los mecanismos empleados en dicha defensa; en otros trabajos, han demostrado la incidencia de los probióticos en las funciones del sistema inmune; Partida, (2009), investigó sobre los efectos de prebióticos y microorganismos con potencial probiótico en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune del camarón blanco cultivados en condiciones experimentales, también describieron un incremento en parámetros celulares, como el número de eritrocitos, linfocitos y macrófagos y un incremento de la actividad lisozímica de *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Scophthalmus maximus* alimentados con probióticos tanto Gram-positivos como Gram negativos.

- Mejora de la calidad de agua

Se ha planteado que las bacterias del género *Bacillus* seleccionadas como probióticos pueden convertir la materia orgánica en CO₂, en contraste con las bacterias gram-negativas que se caracterizan por convertir materia orgánica en biomasa bacteriana o limo (Dalmin *et al.*, 2001). Lalloo *et al.*, (2007) comprobaron la capacidad de tres aislados del genero *Bacillus* para disminuir las concentraciones de nitritos, nitratos y amonios en el agua de cultivo de peces ornamentales. Este mismo fenómeno también fue observado por Kim *et al.*, (2005) en *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis*, quienes atribuyen estos efectos a mecanismos tales como bioacumulación, bioasimilación y nitrificación.

En conclusión, los efectos descritos por estos aditivos dependen en gran medida de la especie de pez, la duración e intensidad del tratamiento, como también del tipo de prebiótico y probiótico evaluado. Al respecto, es necesario realizar nuevas investigaciones que permitan determinar los efectos a nivel morfológico del tracto gastrointestinal del pez cuando se adicionan estos compuestos en el alimento con el objetivo de conocer las respuestas esperadas de sus beneficios en los peces.

2.6.2 Prebióticos y probióticos comerciales

Un número creciente de prebióticos y probióticos comerciales son ofrecidos a los acuicultores, pero en la mayoría de los casos estos productos se consideran algo desatinados en sus objetivos. Esto plantea un escenario de incertidumbre en la aplicación de probióticos para la acuicultura, además no asegura la eficiencia de todos los probióticos comerciales sobre el mejoramiento de la producción acuícola (F. J. Gatesoupe, 1990).

Muchos de estos productos comerciales son destinados para organismos de crianza terrestre. En los primeros experimentos de incorporación de probióticos

en acuicultura se utilizaron preparaciones comerciales diseñadas para organismos de crianza terrestres. Uno de los primeros en ser evaluado fue el *Bacillus toyoi*. Las utilizaciones de esas esporas contribuyeron a mejorar la supervivencia de la *anguilla japónica* y la tasa de crecimiento del *Trachurus murphyi* (Kozasa, 1986). El uso de bacterias ácido lácticas fue también eficiente para mejorar la tasa de crecimiento de larvas de *Solea solea* (F. J. Gatesoupe, 1989). Bogut, Milakovic, Bukvic, Brkic, & Zimmer (1998) estudiaron el efecto del *Streptococcus faecium* sobre el crecimiento de *Cyprinus carpio*, observando efectos positivos sobre la micro-fauna intestinal. La producción de sustancias estimulantes del crecimiento puede ser una justificación para explicar sus efectos benéficos. Sin embargo, estos efectos parecen limitar generalmente el crecimiento, aunque se observaron beneficios en la salud peces en algunos casos.

Desde un punto de vista taxonómico, organismos Gram-positivos obligados o anaerobios facultativos son dominantes en el tracto gastrointestinal del hombre y animales de crianza terrestre. Organismos Gram-negativos anaerobios facultativos predominan en el tracto digestivo de peces y crustáceos, y estos son comúnmente los probióticos más eficientes para acuicultura siendo diferentes de aquellos designados para especies terrestres (F. J. Gatesoupe, 2000).

Entre los productos comerciales más populares de probióticos y prebióticos que se ofrecen en el mercado colombiano, se encuentran marcas como **BIOSA®**, **BIO-MOS®** y **OREGO-STIM®**, fueron los productos escogidos para la investigación en este estudio y que cuentan con las siguientes especificaciones:

- **BIOSA®**

El producto llamado comercialmente Biosa® es conocido mundialmente como Microorganismos eficientes (EM), ya que contienen la combinación única de bacterias y levaduras identificadas por el profesor Higa de Japón en la década de 1980.

Este producto, faculta a la inmunidad de los animales y estimular la utilización del alimento que repercute en una mayor cantidad de producto y calidad. También disminuye las fuentes de alimento para cualquier patógeno, por tanto, reduce la necesidad de gran parte de la medicina animal.

- **BIO-MOS®**

Es un producto derivado de la pared celular de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que consiste en un manano y un componente de glucano llamado manano-oligosacárido fabricado por la compañía Alltech, Inc (Nicholasville, Kentucky). La estructura del componente de manano se asemeja a la de las glicoproteínas de superficie que contienen manosa presentes en la superficie de la mucosa del intestino. Los mananos actúan como ligandos de alta afinidad para las bacterias patógenas del tipo 1, de tipo manosa, como *Escherichia coli* y *Salmonella* (Miguel, Rodriguez-Zas, & Pettigrew, 2004).

El mecanismo de acción del producto, consiste en la teoría de que las bacterias patógenas (inhibidoras del crecimiento y absorción de nutrientes) que normalmente se adhieren a los mananos en la superficie mucosa del intestino, en su lugar se unen al componente manano del Bio-Mos y se desprenden del tracto intestinal. De esta manera, al eliminar organismos patógenos puede mejorar la salud y el crecimiento en los animales (Miguel *et al.*, 2004)

Spring, *et al.*, (2000) realizaron un experimento de aglutinación in vitro demostrando que cinco de siete cepas de *E. coli* y siete de diez cepas de *Salmonella serovar Typhimurium* y *Salmonella serovar Enteritidis* se aglutinaban con oligosacáridos de manano.

Otro posible modo de acción de Bio-Mos es un efecto sobre el sistema inmunológico. La inclusión en la dieta de Bio-Mos incrementó la actividad de las células fagocíticas de los ratones (Sisak, 1994; Zennoh, 1995) y aumentó las

concentraciones de IgG plasmática y de IgA de la bilis en los pavos (Savage, *et al.*, 1996).

Estas acciones pueden mejorar la resistencia, lo que se ve reflejada en la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia al permitir que el animal mantenga un estado inmune bajo (J. D. Kim *et al.*, 2000).

En un estudio con cerdos de vivero, Bio-Mos tuvo un efecto inhibitorio sobre el número de linfocitos, permitiendo así que los nutrientes fueran utilizados para crecimiento y no para la activación del sistema inmune (Davis *et al.*, 2002).

- **OREGO-STIM®**

Es un antibiótico de origen vegetal (Fitobiótico) hecho a base de aceites esenciales del híbrido de *Oreganum vulgare hirtum* al 5%, el cual contiene diferentes grupos químicos (terpenos, esteroides, alcoholes, fenoles) ingredientes que poseen potente poder curativo y preventivo. Está indicado en la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales, así como para preservar la integridad de la mucosa intestinal del ganado bovino, ovino, caprino, aves, cerdos, camarones y peces. Controla las poblaciones de coccidia en animales jóvenes y adultos. Previene nuevas agresiones del intestino por quistes de coccidia. Estimula el desarrollo de las vellosidades intestinales. Preserva la longitud de la vellosidad. Equilibra la población bacteriana intestinal. Aumenta la disponibilidad de los nutrientes consumidos, incrementando la inmunidad, mejorando la salud y el crecimiento en los animales.

Estudios en porcinos han demostrado que la utilización de Orego-Stim actúa contra todas las fases de desarrollo intracelular de la coccidia, incluyendo los esquizontes, micro y macrogametos, como resultado, el protozoo se incapacita para completar su ciclo de vida, que causa la enfermedad clínica o sub-clínica de la coccidiosis (Boletín técnico AVILAB, 2016).

Otros estudios donde se comparó el Oregos-Stim con tratamientos que suministraban antibióticos y tratamientos sin aditivos, indicaron que los resultados fueron bastante homogéneos entre tratamiento, midiendo la variable consumo de alimento promedio en pollos (Kyriakis *et al.*, 1998). Tsinas *et al.*, (1998), concuerdan con estos resultados al tratar cerdos con el producto comercial Oregos-Stim.

3. Hipótesis

- Si incorporamos probiótico y prebiótico en el alimento, mejoramos las variaciones morfométricas microscópicas de vellosidades intestinales en alevinos y juveniles de tilapia roja *Oreochromis sp.* A los 32 días alevinos y 60 días juveniles.
- Si incorporamos probiótico y prebiótico en el alimento, NO mejoramos las variaciones morfométricas microscópicas de vellosidades intestinales en alevinos y juveniles de tilapia roja *Oreochromis sp.* A los 32 días alevinos y 60 días juveniles.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Establecer la existencia de variaciones morfométricas microscópicas de vellosidades intestinales en tilapia roja *Oreochromis sp.*, alimentada con pellets enriquecidos con probióticos y prebióticos.

4.2 Objetivo Específicos

- Evaluar las variaciones morfométricas microscópicas de vellosidades intestinales en **alevinos** de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con pellets enriquecidos con probióticos y prebiótico mediante cortes histológicos.
- Evaluar las variaciones morfométricas microscópicas de vellosidades intestinales en **juveniles** de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con pellets enriquecidos con probióticos y prebiótico mediante cortes histológicos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Descripción general de la instalación

La fase experimental se llevó a cabo en la GRANJA PISCÍCOLA CAMPO ALEGRE, ubicada en la vereda Agua Clara, municipio de Palmira valle del Cauca, a unos 1100 msnm, con una temperatura promedio de 27°C.

Toda la fase experimental se desarrolló en dos reservorios en tierra cada uno con un volumen de 160 m³, utilizando un sistema de circuito abierto del agua. Cada reservorio albergo un total de 3 japas o jaulas de 3m de ancho por 3m de largo, cada una subdividida en cuatro partes, los materiales utilizados para su fabricación y anclaje fueron: polisombra al 75%, Nylon y varillas de hierro. Se realizó la profilaxis del reservorio antes de su llenado, fumigando con ½ litro de Gramoson para eliminar malezas, posteriormente se efectuó una fumigación con verde malaquita (40 cm/20 litros de agua), formol para eliminar patógenos y finalmente se distribuyó cal dolomita por todo el reservorio para mejorar las condiciones de pH.

No se fertilizo el reservorio para evitar la proliferación de plancton y así evitar que los peces consuman otro alimento diferente a las dietas experimentales.

5.2 Parámetros de agua

Todos los días se procedió a retirar las bajas de peces presentes en los tanques, y se midieron los valores de temperatura y oxígeno disuelto mediante sonda multiparamétrica (Metter Toledo). Los análisis de calidad del agua (amoníaco, nitritos, nitratos) fueron realizados con KIT para análisis (MOL LABS Quimiométricas) tres veces por semana, con el fin de mantener los peces en condiciones óptimas de producción.

5.3 Diseño experimental

Para alcanzar los objetivos propuestos, se evaluaron cuatro (4) tratamientos en cada una de las dos etapas productivas de la tilapia, alevines y juveniles, cada tratamiento conto con tres replicas o repeticiones y quedaron de la siguiente manera:

- **Tratamiento Control (T1):** Alimentación solo con concentrado comercial.
- **Tratamiento 2 (T2):** Alimentación con concentrado comercial y prebiótico “Orego-stim”.
- **Tratamiento 3 (T3):** Alimentación con concentrado comercial y probiótico “Biosa”.
- **Tratamiento 4 (T4):** Alimentación con concentrado comercial y probiótico “Biomos”.

5.3.1 Material biológico

Se utilizaron 1200 peces (600 alevines de tilapia y 600 juveniles de tilapia) con un peso de inicio promedio de 2 g para la etapa de alevinos, y 12 g para la etapa de juveniles, los alevinos se distribuyeron en 12 jaulas al igual que los juveniles, y en cada jaula se establecieron 50 peces.

El alimento se suministró manualmente a saciedad en 6 raciones diarias, iniciando a las 9:00 y terminando a las 16:00 horas para todos los tratamientos.

5.3.2 Periodo experimental

El periodo experimental fue de 60 días, y se tomaron muestras de intestino de 15 individuos por tratamiento, previó ayuno de 24 horas, en cuatro (4) periodos, a los 8, 16, 24 y 32 días para alevinos y 15, 30, 45 y 60 días juveniles. Se establecieron estos periodos con el fin de poder conocer las variaciones morfométricas de las vellosidades intestinales en diferentes periodos de alimentación de los peces con la inclusión de un (1) prebiótico y dos (2) probióticos.

5.4 Adición del prebiótico y probióticos al alimento

Se utilizaron dos alimentos comerciales con un 38 y un 32% de proteína de la marca ITALCOL S.A. con el fin de alimentar tilapias en etapas de alevines y juveniles respectivamente, la adición del prebiótico y probióticos al alimento se realizó de la siguiente manera:

Para una cantidad de alimento de 40 Kg, se realizó un preparado (jarabe) que contenía 330 g de sacarosa comercial, 200 g de azúcar morena, 500 ml de aceite y 200 ml de agua para los tratamientos que contenían prebiótico y probióticos. A cada preparado se le adicionó los productos a ensayar a razón de: Biosa= 200 ml/Kg de alimento y, para Biomos y Oregostim = 8 g/Kg de alimento. Una vez, incorporado cada producto al preparado, se adicionó al alimento mezclando durante 15 minutos, paso seguido, se puso a secar y se almacenó.

5.5 Pruebas histológicas

5.5.1 Técnica de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E)

Para la preparación de las muestras con fines histológicos y su tinción mediante H&E se realizó la conservación de las porciones intestinales en solución buffer de formaldehído 10%. Los pasos en el protocolo de la técnica son: Deshidratación, aclaramiento e imbibición, inclusión de tejido en parafina, corte con micrótopo 6 μm y fijación de tejido en placa, para finalmente teñir con H&E (Luna, 1968). Para esto, se procesaron 60 placas para juveniles y 60 placas para alevines siguiendo la metodología:

- Fijación inicial: La fijación química de las porciones intestinales se llevó a cabo en Solución a base de formaldehído buffer al 10%.
- Toma de Muestras: se sacrificaron los peces, se realizó un corte ventral y se extrajo una porción intestinal de aproximadamente 3 cm para hacer el endurecimiento y procesamiento histológico. Se utilizó un estereoscopio Marca *Carl Zeiss* para la observación.
- Endurecimiento de la Muestra: se llevó a cabo en Solución *Bouin's*, especial para tejidos blandos, a base de formaldehído al 25%, ácido pícrico saturado 75% y ácido acético glacial 5%. Las muestras se fijaron para su endurecimiento por un período mínimo de 72 horas.
- Deshidratación y Aclarado: la deshidratación se realizó en una serie de alcohol al 80%, dos series de alcoholes al 90%, tres series de alcoholes al 96%, dos series de alcoholes al 100%, dos series de xilol y parafina. El periodo de permanencia en cada uno fue de una hora.
- Inclusión en Parafina: las muestras una vez aclaradas se incluyeron en parafina 60°C, utilizando para ello una estufa de secado 220° marca MEMERT, y luego ubicadas en anillos para realizar los cortes posteriormente.

- Cortes y Fijación de Tejido en Placa: las muestras incluidas se recortaron en el anillo para liberar parafina y dejar expuesta la cara del tejido. Los cortes se realizaron a 6 μm , utilizando un micrótomo rotatorio marca *American optical*. A cada muestra se le realizó en promedio de 35 a 40 cortes dejando expuesto el epitelio intestinal. Para la fijación en placa se utilizó un baño de flotación de tejidos marca *Shandon*, con el fin de realizar la distensión del tejido y la parafina para su posterior ubicación en láminas portaobjetos.
- Coloración y Montaje: para la tinción se utilizaron los colorantes Hematoxilina de *Harris'* y Eosina alcohólica. La batería de coloración se realizó teniendo en cuenta los pasos por dos series de xilol, dos series de alcohol al 100%, una serie de alcohol al 96%, un baño con agua destilada, y paso por hematoxilina, agua, solución de alcohol ácido, agua y eosina, tres series de alcoholes al 96% y tres series de xilol . Se utilizó resina *consul mount* para la protección de los tejidos con láminas cubre objetos de 22X40mm. Una vez realizados los cortes histológicos, fijados en placa y teñidos con la técnica de H&E, se procedió a realizar su observación utilizando un microscopio óptico marca *Carl Zeiss y Axiostar plus*, con el fin de identificar vellosidades intestinales.

5.6 Evaluación morfométrica microscópica de vellosidades intestinales

Para la evaluación morfométrica microscópica de las vellosidades intestinales de tilapia en etapa de alevinos se seleccionaron 60 placas y 60 placas para juveniles, se observaron 120 placas en total con el objetivo de 10x, y se seleccionaron las mejores imágenes, se fotodigitalizaron y se tomaron las medidas de altura, ancho y densidad utilizando el software Motic Images plus 2.0.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó mediante medidas repetidas (PROC MIXED), empleando como factores el tratamiento y el tiempo, siendo cada repetición la unidad experimental. Se utilizó el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System Institute, 2006), como test de comparaciones múltiples se utilizó el test de Tukey.

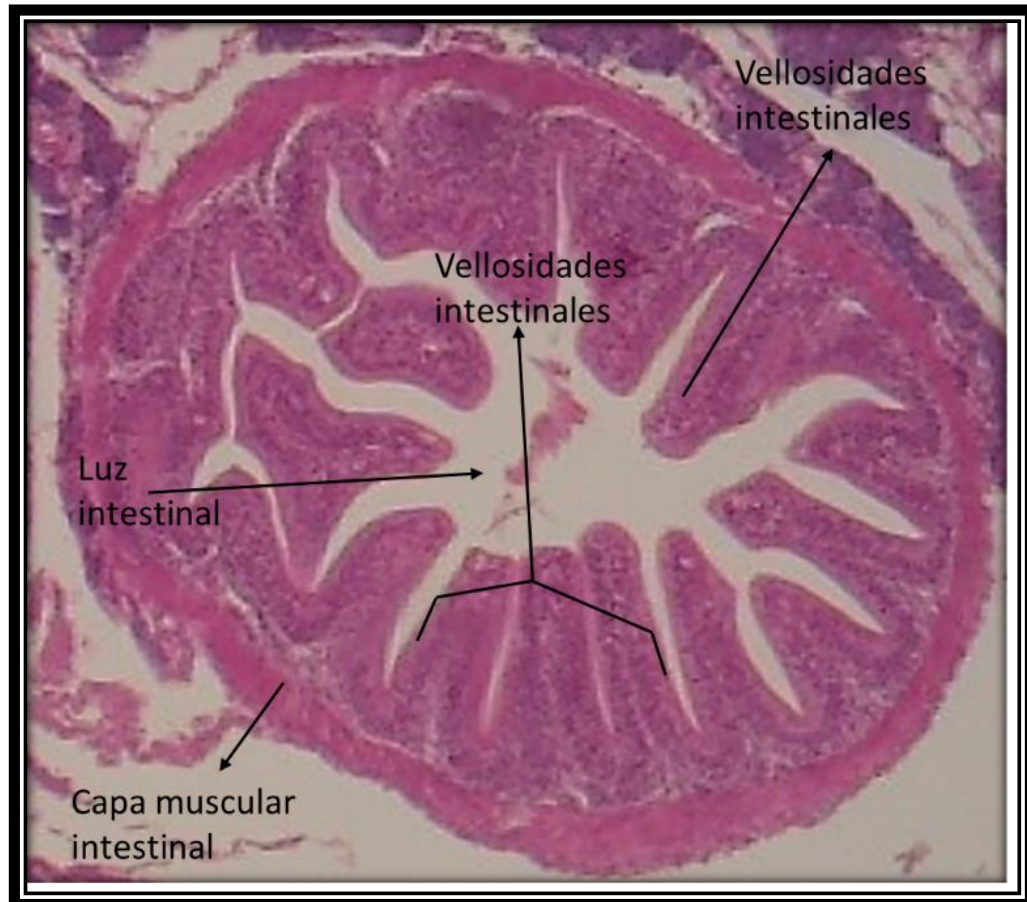
6. Resultados

El establecer la existencia de variaciones morfométricas microscópicas de vellosidades intestinales en tilapia roja *Oreochromis sp.* y su posible interpretación fisiológica, implica conocer la variable altura o largo de las vellosidades intestinales, lo cual juega un papel importante, pues el tratamiento que promueva mayor longitud de las vellosidades, tendrá mayores probabilidades de mostrar la respuesta fisiológica más favorable, ya que contribuirá a aumentar la superficie de digestión y adsorción de los nutrientes, como lo demuestran (Macari, Furlan, & Gonzáles, 2002), quien afirma que cuando un alimento detiene o disminuye la velocidad de proliferación celular, reduce el largo de las vellosidades, lo que repercute en la disminución de la digestión y absorción del mismo.

Otra variable a determinar de igual importancia es el ancho de las vellosidades intestinales; para esta variable hay que tener en cuenta que una respuesta fisiológica favorable sería la disminución del ancho de las vellosidades ya que al ser las vellosidades más delgadas un mayor número de ellas cabrían en un espacio determinado, lo que se traduce en una densidad mayor de vellosidades por área de superficie, siendo esta la transformación más anhelada pues mejora la adsorción de los nutrientes. Una interpretación fisiológica es la entregada por Guyton & Hall (2011), el cual considera que al aumentar el número de vellosidades en el intestino, se está aumentando el número de criptas de LieberKühn, las cuales son las estructuras glandulares y tubulares presentes en la mucosa de las vellosidades y presentan en su base las llamadas células de Paneth; estas tienen como finalidad la secreción del jugo entérico, responsable de la digestión final de los alimentos, transformando los polipéptidos en aminoácidos libres, los disacáridos en monosacáridos y las grasas en glicerina y ácidos grasos.

Aunado a lo anterior, las variables a medir que determinarán una mejor respuesta fisiológica intestinal, serán la altura, anchura y densidad de las vellosidades, pues son estas las que al final modifican la morfología intestinal de la tilapia. (Figura 3)

Figura 2. Placa de Intestino de la Tilapia



Fuente: G.J. Cornejo D. 2016

6.1 Análisis morfométrico de vellosidades intestinales en alevinos

Los estudios de las distintas estructuras histológicas pertenecieron a las regiones medias del intestino, las variables analizadas en la etapa de alevinos para medir el desarrollo morfométrico intestinal fueron: Altura, ancho y densidad de vellosidades intestinales, como se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. ANDEVA para datos de medidas morfométricas en Alevinos

Variable	Fuente	GI	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F.CALC	F.TABLA	Media (µm)	CV [1] (%)
ALTURA	REPETICION	2	910	455	1,71	0,2578	137,2	
	TRATAMIENTO	3	10516,9	3505,6	13,2	0,0047		12,2
ANCHO	REPETICION	2	216,2	108,1	1,28	0,3451	78,4	
	TRATAMIENTO	3	760,2	253,4	2,99	0,1174		13,6
DENSIDAD	REPETICION	2	35,8	17,9	2,02	0,2137	17,3	
	TRATAMIENTO	3	22	7,3	0,83	0,5252		9,9

[1] CV: Coeficiente de Variación

Fuente: G.J. Cornejo D.

Al observar el valor de la variable **Altura** de vellosidad, este presentó un Coeficiente de Variación del 12.26%, lo que indicó que las medidas obtenidas tienen tendencia a ser homogéneas, con una media representativa de 137.21 µm. Respecto a la variable **ancho** de vellosidad al comparar las repeticiones se observó un coeficiente de Variación del 13.69%, lo que demuestra que los datos tienen tendencia a una distribución normal y homogénea, con una media de 78.49 µm. Para la variable **densidad** de vellosidad, que significa el número de vellosidades por unidad de área µm², presentó un coeficiente de variación del 9.96%, esto mostró que los datos tienen una tendencia uniforme y con bajo nivel de dispersión, presentando una media del 17.34 µm. Las variables altura, ancho y densidad de vellosidades entre repeticiones no presentan diferencias estadísticas significativas (Tabla 1)

En la Tabla 2, se ven reflejados los resultados obtenidos de las diferentes variables bajo los efectos de los 4 tratamientos (T1:Control, T2:oregostin, T3:Biosa, T4:Biomos); de esta información se deduce que para la característica **altura** de vellosidad se observaron diferencias estadísticas significativas (>0,05) entre T1 y los demás tratamientos (T2,T3 y T4); el tratamiento control (T1) presentó el menor tamaño en altura de las vellosidades (101.21 µm), en comparación con los de más tratamientos en los que se incorporaba probióticos y

prebiótico en la alimentación, esto se corrobora con el gráfico de barras como se puede observar en la Figura 3.

Tabla 2. Resultados morfológicos de las vellosidades intestinales en alevinos-obtenidos con los diferentes tratamientos

VARIABLE	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
ALTURA (μm)	101,2 ^B	153,2 ^A	146,6 ^A	147,7 ^A
ANCHO (μm)	73,4 ^A	80,4 ^A	86,8 ^A	73,1 ^A
DENSIDAD (μm^2)	15,7 ^A	18,1 ^A	17,5 ^A	17,9 ^A

A o B: Datos con la misma letra no existen diferencias significativas (<0.05). Fuente: G.J. Cornejo D.

Figura 3. Relación altura de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Alevinos

Fuente: G.J. Cornejo D. 2016

Para la variable **ancho** de vellosidad no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, pero se pudo observar que se presentó una diferencia biológica entre los tratamientos T2 y T3, los cuales alcanzaron valores mayores en comparación con T1 y T4 (Tabla 2).

Figura 4. Relación Ancho de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Alevinos

Fuente: G.J. Cornejo D

Los tratamientos evaluados no afectaron la variable **densidad** de vellosidad, pues no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Tabla 2), aunque es importante destacar que los tratamientos que incorporaron pre y prebióticos en el alimento (T2, T3 y T4), presentaron un mayor número de vellosidades intestinales respecto al control (T1) (Figura 5).

Figura 5. Densidad de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Alevinos

Fuente: G.J. Cornejo D, 2016

6.2 Análisis morfométrico de vellosidades intestinales en juveniles

Al estudiar las distintas estructuras histológicas procedentes de la porción media del intestino perteneciente a tilapias en etapa de juveniles, las variables analizadas para medir el desarrollo morfométrico intestinal fueron: Altura, ancho y densidad de vellosidades intestinales, como se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. ANDEVA para datos de medidas morfométricas en Juveniles

VARIABLE	FUENTE	GL	Suma Cuadrados	Cuadrados Medios	F.CALC	F.TABLA	Media (μm)	CV (%)
ALTURA	REPETICION	2	13,99	6,9	0,00	0,9952	177,1	14,2
	TRATAMIENTO	3	16163,42	5387,80	3,74	0,0795		
ANCHO	REPETICIÓN	2	1306,20	653,10	2,34	0,1773	107,7	18,29
	TRATAMIENTO	3	3430,05	1143,35	4,10	0,0670		
DENSIDAD	REPETICION	2	10,81	5,40	1,61	0,2749	15,13	13,15
	TRATAMIENTO	3	164,86	54,95	16,41	0,0027		

Fuente: G.J. Cornejo D. 2016

En la Tabla 3, se puede observar que, dentro de las repeticiones para la variable **altura** de vellosidad, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre las muestras ($>0,05$) y presento una media de 177.16 μm y un coeficiente de variación del 14.2% lo que indicó que los datos mantienen una distribución uniforme. Para efecto de los diferentes tratamientos en la variable **altura** de vellosidad se tiene que $F. \text{cal} > F. \text{tabla}$, lo que demuestra que existieron diferencia significativa ($>0,05$) entre tratamientos. Si consideramos la variable **ancho** de vellosidad dentro de repeticiones, no se observaron diferencias significativas y presentaron un Coeficiente de variación del 18.29%, esto mostró que las medidas tienen tendencia homogénea con una media de 107.79 μm ; contrario sucedió con el efecto de los tratamientos sobre la variable ancho, la cual presentó diferencias estadísticas significativas ($>0,05$) ya que $F. \text{cal} > F. \text{tabla}$. La **densidad** de vellosidades por μm^2 dentro de repeticiones, indicó un CV del 13.15% y una media de 15.13 vellosidades/ μm^2 lo que demuestra que los datos tienen tendencia

homogénea y presentaron una distribución normal; La variable densidad bajo el efecto de tratamientos presentó diferencias estadísticas significativas ($> 0,05$) ya que $F. cal > F. tabla$, tanto los resultados variaron de acuerdo al tratamiento utilizado.

En la Tabla 4, se expresan los valores obtenidos para tilapias en etapa juvenil bajo los efectos de los tratamientos. Para la variable **Altura**, se pudo observar que los tratamientos presentaron diferencias significativas ($> 0,05$), donde el tratamiento T1 (150 μ m) obtuvo el menor valor respecto a T3 y T4 que no presentaron diferencias entre sí y obtuvieron los valores más altos (Figura 6).

Tabla 4. Resultados morfométricos de las vellosidades intestinales en juveniles obtenidos con los diferentes tratamientos

VARIABLE	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
ALTURA (μ m)	150,5 ^B	165,9 ^{AB}	207,7 ^A	184,0 ^A
ANCHO (μ m)	102,7 ^{AB}	94,4 ^B	118,6 ^A	115,3 ^A
DENSIDAD (1 μ m ²)	12,5 ^B	18,0 ^A	16,2 ^A	13,6 ^B

A o B: existen diferencias significativas (<0.005). Fuente: G.J. Cornejo D, 2016

Figura 6. Relación Altura de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Juveniles

Fuente: G.J. Cornejo D. 2016.

Para la variable **ancho** se observaron diferencias significativas entre tratamientos, donde el tratamiento T2 (94,4 μm) obtuvo el menor valor en comparación con los tratamientos T3 y T4, los cuales alcanzaron los valores más altos (Figura 7).

Figura 7. Relación Ancho de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Juveniles

Fuente: G.J. Cornejo D, 2016

Para la variable **densidad** de vellosidades por unidad de área, los tratamientos T1 y T4 arrojaron los menores valores, siendo T2 y T3 los tratamientos con mayor número de vellosidades intestinales (Figura 8).

Figura 8. Densidad de Vellosidades Intestinales vs Tratamiento-Juveniles

Fuente: G.J. Cornejo D, 2016

7. Discusión

Las vellosidades intestinales son consideradas estructuras funcionales para la digestión y la absorción en el intestino de los peces, esto permite deducir que, si aumenta el número, y mejoran su altura, el intestino tendrá la capacidad de utilizar de mejor forma los nutrientes incorporados en los alimentos (Trautman & Fiebiger, 1970).

En cuanto a la variable altura de vellosidades en alevinos, los tratamientos que incorporaron los probióticos (biosa y biomos) y prebiótico (oregostin) en el alimento, alcanzaron las mayores longitudes, esto demostró que la inclusión de estos compuestos, generan cambios significativos ($P < 0,05$) en las vellosidades intestinales de alevines de *Oreochromis spp.* Este mismo comportamiento se presentó para juveniles, donde los tratamientos enriquecidos con probióticos (biosa y biomos) y prebiótico (oregostin), alcanzaron las mayores longitudes respecto al tratamiento control. García (2013), informa que se presentó cambios estructurales en el intestino de *Solea senegalensis* cuando se adicionó dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) en la alimentación. Xu, *et al* (2003), observaron un incremento en la longitud de las microvellosidades del yeyuno en pollos alimentados con una ración suplementada lo cual mejoró el aprovechamiento nutritivo del alimento.

En cuanto a la variable densidad de vellosidades en intestino al no encontrarse diferencias significativas, se asume que los probióticos y prebiótico no aumentan el número de vellosidades por $1 \mu\text{m}^2$ en alevinos de *Oreochromis sp.* Por el contrario, resultados diferentes se obtuvieron en juveniles, al encontrarse diferencias, y se pudo demostrar que los probióticos como biosa y el prebiótico oregostin aumentaron el número de vellosidades por $1 \mu\text{m}^2$. Lopez Villagomez & Cruz Benavides (2011), hace referencia a que la capacidad de absorción de nutrientes en cada segmento de intestino es proporcional al número de

vellosidades que se encuentren, así a mayor número de vellosidades mayor absorción de nutrientes.

Si nos referimos a la variable ancho de la vellosidad en intestino de alevines, se pudo observar que los tratamientos que incorporaban probióticos (biossa y biomos) y prebiótico (oregostin) en el alimento, no incidieron en el aumento o disminución del ancho de las vellosidades. En ese sentido, los resultados obtenidos en juveniles de *Oreochromis sp.*, difieren a los encontrados en Juveniles, donde aquellos tratamientos que incorporaban probióticos (biossa y biomos) en el alimento, tuvieron incidencia en la anchura de las vellosidades al aumentar su grosor. Al respecto Goldin, (1998), manifiesta que al presentar menor grosor las vellosidades intestinales, el número de estas aumenta pues se pueden alojar mayor número en un mismo espacio, esto significa en términos nutricionales una mayor superficie de absorción.

Los resultados respecto a la variable altura de vellosidad intestinal alcanzados con tilapias en etapa de alevinos y juveniles, concuerdan con lo reportado por (Rodríguez & Beltrán, 2012), Quienes encontraron que el tratamiento testigo presentó menor altura de las vellosidades duodenales con respecto a los tratamientos a los cuales les incluyeron probióticos.

Los estudios de Díaz, *et al.*, (2014); Menocal, *et al.*, (2008); Ramírez, *et al.*, (2006); Rodríguez & Alsina (2010), reportaron resultados que coinciden con este estudio, pues encontraron que las vellosidades varían su morfometría aumentando su altura y densidad cuando se adicionan probióticos en la dieta en diferentes especies.

8. Conclusiones y Recomendaciones

- Los resultados del presente trabajo demostraron que la inclusión de probióticos y prebiótico en el alimento generó cambios significativos ($P < 0,05$) en las vellosidades intestinales de tilapias en etapa productiva de alevinos y juveniles de *Oreochromis sp.*, en cuanto a la altura, pues incrementaron su longitud.
- Por otra parte, solo se evidencio cambios estadísticamente significativos en el ancho y la densidad de las vellosidades intestinales cuando se alimentó con prebiótico y probióticos en la etapa juvenil, para la etapa de alevinaje, aunque no se presentaron diferencias significativas, hay que destacar que biológicamente si se obtuvieron diferencias en los valores, donde los tratamientos que suministraron probióticos y prebiótico en el alimento alcanzaron los mayores valores.
- En términos generales, los resultados del presente trabajo pudieron demostrar que el comportamiento en la morfometría de las vellosidades intestinales de tilapias en fase de alevinaje y juvenil, se modificaron cuando se enriqueció el alimento con probióticos y prebiótico.

Recomendación.

- Es importante complementar estos estudios morfométricos de vellosidades intestinales con pruebas de crecimiento, aprovechamiento nutritivo y supervivencia, lo que permitiría establecer una interpretación fisiológica, de los posibles beneficios al incluir prebiótico y probióticos en la alimentación de la tilapia.

9. Bibliografía

- Adams, C. a. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*, 23(May), 37–46. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000090>
- AUNAP. (2014). Servicio Estadístico Pesquero Colombiano. Retrieved January 1, 2016, from <http://sepec.unimagdalena.edu.co/Home/InformacionMetodologica>
- Balcazar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A. C., Márquez, I., ... Muzquiz, J. L. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *The British Journal of Nutrition*, 97(3), 522–527. <https://doi.org/10.1017/S0007114507432986>
- Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 55(5), 409–412. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9000-0>
- Balcazar, J., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>

- Bengmark, S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*, 42(1), 2–7. <https://doi.org/10.1136/gut.42.1.2>
- Bergh, O., Naas, K. L., & Harboe, T. (1994). Shift in the intestinal microflora of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1899–1903.
- Bogut, I., Milakovic, Z., Bukvic, Z., Brkic, S., & Zimmer, R. (1998). Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, 43, 231–235.
- Boletín técnico AVILAB. (2016). Los Porcicultores y su Entorno 101, BM. Retrieved from www.produccion-animal.com.ar, www.avilab.com.mx;
- Broudiscou, L., & Jouany, J. P. (1995). Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reproduction, Nutrition, Development*, 35(5), 517–535.
- Brown, L. (2000). *Acuicultura para veterinarios producción y clínica de peces*. (Acribia, Ed.).
- Castillo Campo, L. F. (2006). *Tilapia roja: Una evolución de 25 años, de la incertidumbre al éxito*.
- Clements, K. D. (1997). Fermentation And Gastrointestinal Microorganisms In Fishes. In *Gastrointestinal Microbiology* (pp. 156–197).
- Cota-Rubio E., Hurtado-Ayala L., Pérez-Morales E., A.-J. L. (2008). Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(1), 75–85.

Cota Gastélum, L. A. (Instituto P. nacional). (2011). *Efecto de prebióticos y microorganismos con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia Oreochromis niloticus, cultivada en condiciones experimentales.* Intituto Politécnico Nacional.

Dalmin, G., Kathiresan, K., & Purushothaman, A. (2001). Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39(9), 939–942.

Davis, M. E., Maxwell, C. V., Brown, D. C., Rodas, B. Z. De, Johnson, Z. B., Kegley, E. B., ... Hellwig, D. H. (2002). Effect of dietary mannan oligosaccharides and (or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing / finishing pigs. *Animal Science*, (December 2002), 2887–2894. <https://doi.org/10.2527/2002.80112887x>

De Silva, S. S., & Gunasekera, R. M. (1989). Effect of dietary protein level and amount of plant ingredient (*Phaseolus aureus*) incorporated into the diets on consumption, growth performance and carcass composition in *Oreochromis niloticus* (L.) fry. *Aquaculture*, 80(1–2), 121–133.

Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrilón, M., Balebona, M. C., ... Meseguer, J. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.06.007>

Díaz, C., Medina, A., Villamizar, A., & Palencia, D. (2014). Efecto de un suplemento líquido a base de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus casei* para la alimentación de mojarra roja (*Oreochromis sp*) en etapa de alevinaje y

precia Liquid supplement effect based *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus case*. *Alimentech Ciencia Y Tecnologia Alimentaria*, 12(1), 86–92.

Drakoularakou, A. McCartney, A., Rastall, R., & Gibson, G. R. (2004). Established and emerging prebiotics and their effects on the gut microflora. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 15, 18–20.

Estevez, M. (1990). *Manual de piscicultura*.

FAO. (2011). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. World Health Organization, Cordoba, Argentina.

Ferrufino, J. C., Taxa, L., & Angeles, G. (1996). Histología normal del intestino delgado. *Revista Medica Herediana*, 7(1), 46–57.

García de la Banda García, I. (2013). Efecto de la adición de dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Tesis de doctorado.

Gatesoupe, F. (1991). The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 96, 335–342.

Gatesoupe, F. (1994). Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic Living Resources*, 7, 277–282. <https://doi.org/10.1051/alr:1994030>

Gatesoupe, F. (1999). The use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*, 180(1), 147–165. Retrieved from www.biotechsnigeria.org.

- Gatesoupe, F. J. (1989). *Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, Scophthalmus maximus L. . In: De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. Eds., Ž. Aquaculture — A Biotechnology in Progress. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium.,*
- Gatesoupe, F. J. (1990). The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* , and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*, 89, 139–148.
- Gatesoupe, F. J. (2000). Uso de probióticos en acuicultura. *Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. Y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances En Nutrición Acuícola IV. Memorias Del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S., México., pp. 463–472.*
- Gildberg, A., Johansen, A., & Bøgwald, J. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138(1–4), 23–34. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01144-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01144-7)
- Goldin, B. R. (1998). Health benefits of probiotics. *British Journal Nutrition*, 80, 203–207.
- Griffith, D. R. W. (1995). Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. *Larvi'95 - Fish & Shellfish Larviculture Symposium (Eds P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants) European Aquaculture Society Special Publication 24, Gent, Belgium, 478.*
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado De Fisiología Médica-Elsevier (2011).pdf.*

- Harzevili, A. ., Duffel, V. H., Dhert, P., Swings, J., & Sorgeloos, P. (1998). Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquaculture Research*, 29, 411–417.
- Herrería Roman, E. (2013). *Intestino delgado y patologías asociadas a la malabsorción intestinal*. Retrieved from <http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/2198/HerreriaRomanE.pdf?sequence=1>
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & Huis in't Velt, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00044-0)
- Incoder, & Minagricultura. (2011). *AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL DESARROLLO RURAL - INCODER Y ACUICULTURA*.
- Kelly, G. (2009). Inulin-type prebiotics: A review (Part 2). *Alternative Medicine Review*, 14(1), 36–55. <https://doi.org/19364192>
- Kihara, M., & Sakata, T. (1997). Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 118(4), 1201–1207. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00052-2)
- Kim, J. D., Hyun, Y., Sohn, K. S., Kim, T. J., Woo, H. J., & Han, I. K. (2000). Effects of mannanoligosaccharide and protein levels on growth performance and immune status in pigs weaned at 21 days of age. *Korean Journal of Animal Science*, 42(4), 489–98.

- Kim, J. ., Park, K. ., Cho, K. ., Nam, S. W., Park, T. J., & Bajpai, R. (2005). Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 96(17), 1897–1906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.040>
- Kozasa, M. (1986). Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie-Aliments- Nutrition*, 4, 121–135.
- Kyriakis, S., Sarris, K., Lekkas, S., Tsinas, A., Agiannakopoulos, C., Alexopoulos, C., & Saoulidis, K. (1998). Control of post weaning diarrhoea syndrome of piglets by in feed application of *Origanum* essential oils. *In: Proc. of the 15th IPVS Congress. Birmingham.*, 3, 221.
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2007). Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1471–1479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x>
- Lewus, C. B., Kaiser, A., & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meatt. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1683–1688.
- Lopez Villagomez, B. R., & Cruz Benavides, L. A. (2011). *Elaboración de un probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la tilapia roja (Oreochromis sp.) en etapa de engorde en la zona de Santo Domingo*. Escuela Politécnica del Ejercito. Santo Domingo, Ecuador.
- Luna, L. G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces*.

Institute of Pathology.

Macari, M., Furlan, R., & Gonzáles, E. (2002). Ingestao de alimentos: Mecanismos regulatorios. In *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: Ed. Funep; V 2* (pp. 187–192).

Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. Best Practice and Research. *Clinical Gastroenterology*, 18, 287–298.

Mendoza, M. A., Corredor, J., & Romero, C. S. (2013). Estudio histológico del sistema digestivo en diferentes estadios de desarrollo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista de Medicina Veterinaria*, 25, 21–38.

Menocal, J. A., González, E. Á., & Coello, C. L. (2008). Performance parameters and morphological changes in intestinal villi of broilers at 21 days of age by the inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Veterinaria Mexico*, 39(2), 223–228.

Miguel, J. C., Rodriguez-Zas, S. L., & Pettigrew, J. E. (2004). Efficacy of a mannan oligosaccharide Bio-Mos for improving nursery pig performance. *Journal of Swine Health and Production*, 12(6), 296–307. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=Z1WfU4tfHzlKXo5evoO&page=2&doc=61&cache_urlFromRightClick=no

Nair, S., Sukamoto, K., & Shimidu, U. (1985). Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environment of Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51, 1469–1473.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Goran, B., Salminen, S., & Lilius, E. (2003).

Fish & Shellfish Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*, 15, 443–452. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00023-8)

Nogami, K., & Maeda, M. (1992). Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, 2373–2376.

Noh, S. H., Han, I. K., Won, T. H., & Choi, Y. J. (1994). Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. *Korean Journal of Animal Science*.

Parker, R. B. (1974). Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4–8.

Partida Arangure, B. O. (2009). Efecto de prebióticos y microorganismos con potencial probiótico en el crecimiento , supervivencia y sistema inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* , cultivado en condiciones experimentales. Instituto Politecnico Nacional.

Pineda Santis, H. R., Zuluaga Sepulveda, C. A., & Vertel Betancur, D. A. (2012). Evaluación de la morfometría y del hábito alimenticio en tilapia roja *Oreochromis sp.* y tilapia nilótica *Oreochromis niloticus var. chitralada* bajo diferentes condiciones de manejo en dos granjas piscícolas del occidente Antioqueño. *Revista Politecnica*, 14(8), 97–104.

Pluske, J. R., & Dong, G. Z. (1998). Factors influencing the utilisation of colostrum and milk. In *The Gestating and Lacting sow* (pp. 45–70).

Preston, T. R. (1995). Alimentación de los animales tropicales. Retrieved January

1, 2016, from <http://www.FAO.org/docrep/N0613T/W0613T00.htm>

Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J. L., Plusquellec, A., & Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*, 28, 277–352.

Ramírez, C., Bolívar, A., Ciffoni, G. A., Pancheniak, E. M. G., & Soccol, E. F. R. C. (2006). Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. *La Alimentación Latino Americana*, 264.

Ringo, E., & Strom, E. (1994). Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L .): Gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00726.x>

Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. and Ishida, Y. (1996) Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research* 15, 369-374.

Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S13. <https://doi.org/10.1079/BJN20041350>

Robertson, P. A. W., O´Dowd, C. ., Burrells, C., Williams, P., & Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp . as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L .) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* , Walbaum). *Aquaculture*, 185(3–4), 235–243.

Rodríguez, J. E. F., & Alsina, S. (2010). Cambios morfológicos en vellosidades intestinales, en pollos de engorde alimentados a partir de los 21 días con una

dieta que incluyó el 10% de microorganismos eficientes. *Revista Citecsa*, 1(1), 40–46. Retrieved from <http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/article/view/7>

Rodriguez, J. E. F., & Beltrán Amaris, L. M. (2012). Variaciones morfométricas a nivel de las vellosidades en intestino anterior y posterior en Cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) con la inclusión de morera (*Morus alba*) al 15% en la etapa de cebo. *Revista Citecsa*, 2(3), 50–59.

Rojas, H. E. (1994). *La fibra dietética: Os carbohidratos en nutrición humana*. Madrid: Grupo Aula Médica.

Savage, T., Cotter, P., & Zakrzewska. (1996). The effect of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. *Poultry Science*, 75(1), 143.

Seifert, S., & Watzl, B. (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of Nutrition*, 137(11 Suppl), 2563S–2567S. <https://doi.org/137/11/2563S> [pii]

Sisak, F. (1994). Bio-Mos mediated stimulation of phagocytosis as assessed by luminol enhanced chemiluminescence. Czech Research Institute.

Spring, P., Wenk, C., Dawson, K. A., & Newman, K. E. (2000). The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*, 79(2), 205–211. <https://doi.org/10.1093/ps/79.2.205>

Strøm, E., & Olafsen, J. A. (1990). The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. In *Microbiology in poecilotherms* (pp. 181–185).

- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H., & Deguchi, Y. (1996). Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*, 145, 195–203.
- Tannock, G. W. (1996). Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. *Gastrointestinal Microbiology, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions (Eds R.I. Mackie, B.A. Withe and R.E. Isaacson) Chapman & Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, Pp., 2, 434–465.*
- Toledo Perez, S. J., & Garcia Capote, M. C. (2000). Nutrición y Alimentación de Tilapia Cultivada en América Latina y el Caribe. *Actas Del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola- Avances En Nutricion Acuicola*, 83–137.
- Trautman, D., & Fiebiger, J. (1970). *Histología y Anatomía microscópica de los animales domésticos*. Editorial Grijalbo, Valencia, 225-241.
- Trewavas, E. (1983). *Tilapiine Fishes of the Genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia Tilapiine Fishes of the Genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia British Museum (Natural History) London*. London.
- Tsinas, A., Kyriakis, S., Bourtzi-Chatzopolou, E Arsenakis, M., Sarris, K., Papasteriades, A., & Lekkas, S. (1998). Control of porcine proliferative enteropathy by in feed application of Origanum essential oils. *In: Proc. of the 15th IPVS Congr., Birmingham., 3, 218.*
- Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2000). Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 387–393.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., & Verstraete, W.

- (1999). Microbial Control of the Culture of Artemia Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2527–2533.
- Villamil Diaz, L., & Martinez Silva, M. A. (2009). PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA. *Boletín de Investigaciones Marinas Y Costeras*, 38(2), 165–187.
- Villarruel Castillo, L. W., Angel Armas, J. A., & Céspedes, P. (2011). *Efectividad de dos eclosionadores prototipo en la eclosión de ovas de tilapia roja (Oreochromis sp.) y tilapia negra (Oreochromis niloticus) en Yahuarcocha Imbabura*. Universidad Técnica del Norte.
- Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 1–66.
- Vulevic, J., Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2004). Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.036>
- Wallace, R. J., & Newbold, C. J. (1995). Microbial feed additives for ruminants. In Herborn-Dill (Ed.), *Probiotics: Prospects of Use in Opportunistic Infections* (pp. 101–125). <https://doi.org/10.1002/9783527615353.ch13>
- Wang, X., H., L., X., Z., Li, Y., Ji, W., & Xu, H. (2000). Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *Journal of Ocean University of Qingdao*, 30, 493–498.
- Xu X, Bazner J, Qi M, Johnson E, Freidhoff R (2003). The role of telencephalic NMDA receptors in avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Behav.*

Neurosci., 117(3): 548-554.

Yuji, R., Fernanda, R., Franchi, P., & Baioco, F. (2015). Growth , immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides- MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(5), 944–952. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-14>

Zennoh, L. (1995). *Effect of Oral Administration of Bio-Mos on Stimulation of Spleen Derived Monocytes from Mice.*