

Evaluación del carácter probiótico de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas aisladas de intestinos de tilapia (*Oreochromis*) en estado de preceba

**Proyecto de grado para optar el título
Zootecnista**

Por

Mariluz Ardila Durango

Asesora

Luz Adriana Gutiérrez

Dr-MSc- Bióloga

**Corporación universitaria lasallista
Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias
Zootecnia
Caldas-Antioquia**

2017

Dedicatoria

A mi hija mi gran inspiración.

A mi madre mi gran apoyo y soporte.

Contenido

Introducción	6
Objetivos	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
Marco Teórico Y Estado Del Arte	9
Probióticos.....	10
Probióticos en peces y sus mecanismos de acción.	11
Colonización.....	14
Selección de probióticos	15
Principales cepas estudiadas en acuicultura.....	16
Población a muestrear:.....	20
Identificación y caracterización morfológica de cepas de bacterias ácido lácticas y Bacillus:	21
Estabilidad en el paso por el sistema gastrointestinal:	21
Resistencia a las sales biliares:	22
Pruebas de estabilidad a temperaturas altas:	22
Pruebas de estabilidad a Enzima:	23
Identificación bioquímica y molecular de las cepas de bacterias Ácido Lácticas y bacillus nativos:	23
Análisis estadístico:.....	23
Resultados.....	25
Aislamiento de microorganismos.....	25
Evaluación de los microorganismos frente a los analitos	27
Discusión	30

Agradecimientos.

A Dios por permitirme seguir adelante con esta gran meta en mi vida, a mi familia por estar siempre ahí apoyando cada sueño que me propongo, por ser incondicional para mí, por esas palabras de aliento siempre que creía que ya nada era posible.

A mis profesores guías, que más que eso son unos súper maestros, por aportarme ese gran conocimiento, por tener esa paciencia de soportarme y explicarme cada pasó de lo que debía de hacer. Luz Adriana Gutiérrez gracias y mil gracias por creer en mis habilidades académicas.

A mi profesor Carlos Arturo David, y Freddy Arley Arenas por su paciencia y empuje que hicieron que yo creyera cada día más en lo que verdaderamente puedo hacer.

A mi gran compañero Juan David Cano Gil por su gran aporte de conocimientos.

A mi hija, porque gracias a ella aprendí a valorar cada momento de la vida, y que el tiempo es lo único que no se recupera. A todos los auxiliares del laboratorio, Yamile, Arturo y Luisa, gracias infinitas por su disposición y colaboración siempre.

Resumen

Los probióticos son en su gran mayoría bacterias ácido lácticas y bacilos esporulados con características metabólicas especiales que favorecen la salud intestinal y por ende mejora los parámetros productivos en el animal. En peces, especialmente tilapia roja, muy poco se ha estudiado sobre sus interacciones intestinales y su microbiota nativa, razón por la cual se hace necesario un tamizaje de algunas bacterias con actividad probiótica que puedan coexistir en ellos.

En el presente estudio se evaluaron cepas de bacterias lácticas y bacterias esporuladas con potencial probiótico a partir del tracto gastrointestinal de tilapia roja (*Oreochromis sp*), en estado de preceba. Se procesaron en medios de cultivo selectivos para bacterias ácido lácticas (Agar M 17, Agar MRS) y para bacterias esporuladas (Agar Nutritivo). Entre las pruebas para evaluar la capacidad probiótica se determinó: resistencia a pH ácido y alcalino (2,0 y 8,0), resistencia a la acción de las sales biliares (0.3 %), resistencia a un medio hipertónico (NaCl 3%), sobrevivencia a enzimas (lisozima) actividad hemolítica, actividad antibacteriana frente a cepas patógenas (*E.coli*, y *Streptococo B*) y su sensibilidad a antibióticos, para luego ser identificadas por pruebas bioquímicas e identificación molecular.

Palabras claves: Probioticos, Bacillus esporulados. Tilapia roja, Bacterias ácido lácticas, cepas.

Introducción

La mayoría de los microorganismos considerados como probióticos pertenecen a las bacterias ácido lácticas (BAL), siendo los géneros más representativos: *Lactobacillus* sp, *Lactococcus* sp y *Bifidobacterium* entre otras. Estos microorganismos producen una serie de metabolitos como ácido láctico, ácido acético, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y bacteriocinas; capaces de inhibir el crecimiento de organismos patógenos, generando en ellos lisis celular. Es por esto que los probióticos han sido considerados de gran valor tecnológico, especialmente por la capacidad de controlar patógenos de origen fúngico y bacteriano en el hombre y en los animales (Cook et al., 2012).

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

En la actualidad, uno de los retos para la tecnología alimentaria respecto a la adición de probióticos en una matriz, es garantizar que dichos microorganismos lleguen vivos y en óptimas condiciones a su lugar de acción dentro del organismo vivo. La microencapsulación de probióticos es una de las técnicas para asegurar la viabilidad el probiótico, aun en alimentos que no cumplen con la

característica de prebiótico, manteniendo la estabilidad del microorganismo, hasta su consumo.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el carácter probiótico de *Bacillus* sp. y Bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de tilapia roja en estado de preceba

Objetivos específicos

1. Aislar bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas del tracto gastrointestinal de tilapia en estado de preceba de una estación piscícola del departamento de Antioquia (P. Doradal).
2. Evaluar la actividad probiótica de bacterias lácticas y esporuladas nativas como posibles candidatos a probióticos.

Marco Teórico Y Estado Del Arte

Según la FAO, la acuicultura crece anualmente el 8%, constituyendo uno de los sistemas productivos con mayor aumento promedio, con respecto a otro sector productivo alimentario (SOFIA 2012), representando para muchos países un renglón importante de su economía.

En el sector acuícola, la acuicultura continental es quien sustenta el mayor porcentaje de producción anual, y en este la tilapia, es uno de los más importantes. Tilapia es una especie que presenta características importante que favorece el nivel productivo, entre ellos, rápido crecimiento, consumo de dietas artificiales, soporta altas densidades de siembra, manipulación genética y resistencia a enfermedades; sin embargo especies de microorganismos como *streptococcus*, *columnaris* y *aeromonas*, pueden causar serias enfermedades y pérdidas en los cultivos ;Flores et al. (2002).

La producción acelerada y la cría intensiva expone a los animales a condiciones estresantes, que inmuno deprimen el organismo, promoviendo la aparición de enfermedades conllevando a las pérdidas económicas. Varios autores (Acar, et al. (2000); Van den Bogaard, (2000); Phillips (2004). Indican que la prevención y control de enfermedades han tenido un incremento sustancial en el uso de agentes antimicrobianos, sin embargo su uso continuado ha sido cuestionado, debido a la resistencia antibiótico encontrada en los patógenos, aumentando el número de infecciones en el tiempo. El consumo de aditivos probióticos en la nutrición animal es una estrategia para contrarrestar el crecimiento de mi-

croorganismos patógenos y disminuir el consumo de antimicrobianos tanto en humanos como en animales. Las bacterias probióticas controlan los patógenos a través de una variedad de mecanismos metabólicos; de hecho el uso de probióticos en nutrición se ha documentado desde hace ya varias décadas y recientemente se ha venido aplicando en acuicultura (Gomez-Gil et al. (2000); Verschuere et al.

(2000); Irianto and Austin, (2002); Bachere, 2003). Con la creciente demanda para una acuicultura amigable con el medio ambiente, el uso de probióticos es ampliamente aceptado, sin embargo es necesario incrementar el conocimiento de la microbiología intestinal de los peces, de la preparación efectiva y de la evaluación con seguridad de los probióticos con fines de desarrollar acuicultura comercial.

Probióticos

Generalmente se entiende como probiótico, la capacidad de ciertas bacterias para promover la salud de otros organismos; términos como bacterias amigables, saludables o benéficas son también comúnmente utilizados, sin embargo, por su extensiva funcionalidad se han clasificado dentro del grupo de nutracéuticos. Lilley y Stillwell (1965), describieron el término como las sustancias secretadas por los microorganismos capaces de estimular el crecimiento de otros; para Parker (1974), son organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal. Fuller (1989), precisa el término como “suplemento alimenticio microbiano vivo, el cual afecta benéficamente al hospedero mediante el mejoramiento de su balance microbiano intestinal”. El reporte de la FAO/WHO

(2001), indica que los probióticos son organismos vivos, los cuales al ser consumidos en cantidades adecuadas confieren al hospedero salud y bienestar (Fao 2000).

Según Wang et al. (2005), el número de preparaciones de probióticos están comercialmente disponibles y han sido introducidas como aditivos alimenticios, o incorporados al agua directamente para diversas granjas de cultivo de peces, camarones y moluscos; encontrando que son efectivos en proporcionar salud para los organismos acuáticos y completamente seguros para manipular.

Probióticos en peces y sus mecanismos de acción.

Onarheim et al. (1994) en sus estudios sobre la microbiota de algunos peces, encontró anaerobias facultativas, de tipo Gram-negativas en peces marinos, principalmente *Vibrio* y *Pseudomonas*. En contraste, la microbiota propia de peces de agua dulce, tiende a estar dominada por miembros del género *Aeromonas*, *Plesiomonas*, representantes de la familiar *Enterobacteriaceae* y bacterias anaerobias obligadas del género *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Eubacterium* (Sakata, 1990). Bacterias del tipo ácido-lácticas, las cuales son predominantes en mamíferos o aves; son subdominantes en peces y están representadas esencialmente por el género *Carnobacterium*; Ringø and Vadstein, (1998); a su vez Hansen y Olafsen, (1989) sugieren que la población de microbiota endógena puede depender de factores genéticos, nutricionales y medioambientales, sin embargo, los microorganismos que existen en el medio ambiente acuático cer-

cano tienen mayor influencia en el estatus de salud de los hidrobiontes en comparación con los organismos terrestres; así la microbiota asociada al intestino de organismos acuáticos es probablemente constituida por microbiota endógena, en unión a altos niveles de microorganismos alóctonos los cuales son mantenidos por la constante ingestión del agua circundante.

Limitaciones metodológicas y éticas propias del estudio con animales dificultan el entendimiento de los mecanismos de acción de los probióticos, pero la literatura sugiere varios mecanismos entre ellos:

1. Exclusión competitiva: el antagonismo bacteriano es un fenómeno común en la naturaleza, sin embargo la composición de las comunidades bacterianas puede ser modificada por prácticas de manejo, ingestión de microorganismos y condiciones medioambientales que pueden estimular la proliferación especies bacterianas seleccionadas, lo que constituye una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de patógenos oportunistas (Balcázar, et al. (2004) ;Vine et al. (2004). Olson et al. (1992) reportan que cepas bacterianas asociadas a mucosa intestinal de turbot (*Scophthalmus maximus*), suprimen el crecimiento del patógeno *V. anguillarum*. En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), Balcázar, et al. (2007) ,reportaron un estudio sobre la presencia de un alto número de bacterias ácido lácticas del tipo *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* en poblaciones sanas después de presentarse una epidemia de furunculosis. Aly, et al. (2008), en estudio realizado con tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*), reportaron actividad probiótica de *Citrobacter freundii*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus firmus* contra *Aeromonas hydrophila*.

2. Fuente de nutrientes y actividad enzimática que contribuyen a la

digestión: Algunas investigaciones sugieren que los microorganismos tienen efectos benéficos en los procesos digestivos y que estos efectos pueden verse reflejados en su desempeño y tasas de crecimiento; Lara-Flores, et al. (2003), aseguran que una mezcla de *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, mejoran el desempeño y las tasas de crecimiento en *O. niloticus*, similares hallazgos reporta Wang et al. (2008) en una investigación con la misma especie usando la bacteria *Enterococcus faecium*, donde la adición en la dieta de la bacteria mejoró significativamente la ganancia de peso diaria y final en comparación con la dieta sin el probiótico. Una investigación con juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), reemplazando hasta un 50% de la proteína (harina de pescado) por *Saccharomyces cerevisiae*, se logró mejorar el desempeño y la utilización del alimento en comparación con la dieta sin inclusión de *S. cerevisiae*, (Ozorio, et al., 2010). Wang, (2010), reporta un incremento significativo en la ganancia de peso diaria y final, además de un incremento en la actividad proteasa y celulasa en alevinos de la carpa grass (*Ctenopharyngodon idella*), alimentados con dietas que incluían *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Lactobacillus acidophilus* (Zhou et al. 2010).

3. Mejora el sistema inmune: el sistema inmune no específico puede ser estimulado con el uso de probióticos, se ha demostrado por ejemplo que la administración oral de *Clostridium butyricum* en trucha arco iris incrementó la actividad fagocitaria de leucocitos en contra de vibriosis, Sakai et al. (1995); Wang et

al., (2008), reportan en *O. niloticus*, incremento de actividad de lisozima y mieloperoxidasa.

4. Influencia sobre la calidad del agua: mejorar las condiciones de calidad de cuerpos de agua ha sido asociada a *Bacillus sp*, tipo gram-positivos en vista de ser mejores convertidores de materia orgánica que los gram-negativos, su influencia se ha reportado para juveniles de camarón *Penaeus monodon*, donde el uso de *Bacillus sp*, mejoró la sobrevivencia, las tasas de crecimiento y los parámetros de calidad de agua de la especie (Zhou et al. 2010).

Colonización

El proceso de colonización está caracterizado por la afinidad de la bacteria a la mucosa intestinal, dentro del gel mucoso o unido a las células epiteliales, de este mecanismo de adhesión y colonización depende el principio de exclusión por competencia de espacio y de nutrientes (Westerdahl et al. 1991). Según Conway (1996), la capacidad de colonización por parte de un microorganismo del tracto gastrointestinal depende de su persistencia en un periodo de tiempo dado, debido a una tasa de multiplicación que debe ser mayor a la tasa de expulsión del mismo; al respecto Gullian y Rodríguez (2002) describen que *Vibrio sp.*, normalmente coloniza el hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco, sin embargo, su microbiota normal puede ser dominada artificialmente por la adición de *Bacillus sp.* (incluso por encima del 50%) al cuerpo de agua por un periodo de 20 días. Según varios autores (Dopazo et al. 1988; Gram et al. 1999; Chythanya et al. 2002; Sugita et al. 2002; Gullian et al. 2004), existen al menos dos factores

que inciden en la colonización: 1. *Factores relacionados al hospedero*, como por ejemplo, temperatura corporal, niveles de potencial oxido-reducción, concentración de enzimas y resistencia genética y 2. *Factores asociados a los microorganismos*, por ejemplo, microorganismos antagónicos, proteasas, bacteriocinas, lisozimas, peróxidos de hidrógeno, formación de amoníaco y compuestos diacéticos y alteraciones del pH por la producción de ácidos orgánicos.

Selección de probióticos

Para Sotomayor y Balcázar (2003), la manera más común de seleccionar un probiótico es mediante las pruebas in vitro por antagonismo, en el cual los patógenos son expuestos al probiótico en estudio o a sus productos extracelulares en un medio líquido o sólidos. Sin embargo este tipo de ensayos y sus resultados no debe considerarse como pruebas contundentes para predecir el comportamiento o efecto in vivo (Gram et al. 1999). Es así como la respuesta antagonista que presenta la *Pseudomona fluorescens* (cepa AH2), contra *Aeromonas salmonicida*, no confiere al salmón del Atlántico protección contra la furunculosis, pero es un efectivo probiótico para trucha arco iris, confiriéndole protección para vibriosis (Gram et al. 2001). Se deben tener en cuenta características como el origen, en este caso es preferible usar cepas aisladas del hospedero, seguras y que contengan la habilidad de sobrevivir al tránsito gastrointestinal del hospedero y en este medio ser capaces de resistir a las sales biliares, al pH bajo, a la actividad de las proteasas, o como se sugiere en la sección d, un criterio de selección comúnmente usado es el de la capacidad de colonizar y por tanto adherirse al

epitelio intestinal lo cual reduce o previene la colonización por patógenos (Vine et al. 2004). Finalmente se desea que el probiótico debe ser viable bajo condiciones normales de almacenamiento y tecnológicamente adecuado para propósitos industriales. Finalmente, el probiótico puede ser suministrado al hospedero o adicionado al medio (Zhou et al. 2010)

Principales cepas estudiadas en acuicultura

La mayoría de los probióticos propuestos para el uso en acuicultura pertenecen a las bacteria ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*), al género *Vibrio* (*V. alginolyticus*), al género *Bacillus* y al género *Pseudomonas*, principalmente

(Tabla 1).

Tabla 1. Principales grupos de probióticos considerados como agentes de control biológico en cultivos de peces.

CEPA PROBIÓTICO	FUENTE	USADO EN	METODO DE APLICACIÓN	REFERENCIA
<i>Streptococcus lactis</i> y <i>Lactobacillus</i>	No conocida	Larvas de Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Enriquecimiento de alimento vivo	García de la Banda et al.,

<i>bulgaricus</i>		<i>mus</i>)		(1992)
<i>Lactobacillus</i> sp. y <i>Carnobacte-</i> <i>rium</i> sp.	Roti- feros (<i>Bra-</i> <i>chionus</i> <i>pli-</i> <i>catilis</i>)	Larvas de Turbot (<i>Scop-</i> <i>hthalmus maxi-</i> <i>mus</i>)	Enri- quecimiento de rotíferos	Gate- soupe (1994)
<i>Vibrio al-</i> <i>ginolyticus</i>	Gra nja comer- cial de ca- marones	Salmón del Atlántico (<i>Salmo</i> <i>salar</i> L.)	Baño en suspensión	Austin et al., (1995)
<i>Carnobacte-</i> <i>rium divergens</i>	In- testinos de salmón del atlántico	Alevinos de Cod del Atlántico	Adición a la dieta	Gild- berg and Mikkelsen (1998)
<i>Bacillus me-</i> <i>gaterium,</i> <i>B. subtilis, B.</i> <i>polymyxa,</i> <i>B. licheni-</i> <i>formis</i>	Pro- ducto co- mercial	Bagre del canal (<i>Ictalurus</i> <i>punctatus</i>)	Adición a la dieta	Quei- roz y Boyd (1998)
<i>Vibrio pela-</i> <i>gius</i>	Lar- vas de tur-	Turbot	Adición al agua	Ringø and Vadstein

	bot			(1998)
G-Probiótico	Pro- ducto co- mercial	Tilapia niló- tica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Adición a la dieta	Naik et al., (1999)
<i>Pseudomo- nas fluorescens</i>	Pez del hielo (<i>Lates nilo- ticus</i>)	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Adición al agua	Gram et al., (1999)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATC C 53103 Cul- tivo de colección	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Adición a la dieta	Niko- skelainen et al., (2001)
<i>Aeromonas hydrophila,</i> <i>Vibrio fluvia- lis,</i> <i>Carnobacte- rium sp.,</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Trac to digestivo de Trucha arco iris	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Adición a la dieta	Irianto y Austin (2002)
<i>Bacillus cir-</i>	In-	Carpa rohu	Adición	Ghosh

<i>culans</i>	testinos de carpa rohu (<i>Labeo rohita</i>)		a la dieta	et al., (2004)
<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prod ucto com- ercial	<i>O. niloticus</i>	Adición a la dieta	Lara- Flores, et al., (2003)
<i>Enterococcus faecium</i>	Prod ucto com- ercial	<i>O. niloticus</i>	Adición a la dieta	Wang, et al., (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prod ucto com- ercial	<i>Piaractus messopotamicus</i>	Adición a la dieta	Ozorio, et al., (2010)
<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Prod ucto com- ercial	carpa grass (<i>Ctenopharyngodon idella</i>),	Adición a la dieta	Wang (2010)

Metodología

Población a muestrear:

Para la determinación de bacterias ácido lácticas y *Bacillus* esporulados con actividad probiótica se evaluaron tejidos en 10 tilapia en estado de preceba de 350g, los cuales fueron sacrificados por choque térmico, para posteriormente retirar de manera aséptica el intestino, el cual se pesó en balanza analítica, una vez se tenía el tejido intestinal, se lavó varias veces con solución salina estéril; disminuyendo la microbiota acompañante no funcional para este trabajo (Chabrillon, *et al.*, 2005). Posteriormente se sometió al stomacher durante 60 segundos favoreciendo la salida de microorganismos adheridos al epitelio, posteriormente se lava en solución salina estéril al 0.85% (Trabelsi et al. 2013)

Para el aislamiento de Bacterias lácticas se utilizó MRS (De Man Rogosa y Sharpe) suplementado con 2% p/v de extracto de levadura. Del tejido anteriormente lavado se realizó diluciones consecutivas hasta 10^{-3} y se cultivó 0,1ml por siembra en superficie de forma directa sobre el medio de cultivo, incubándose anaeróbicamente durante 72 horas a 37°C. (Chou *et al.*; 1999).

Para el aislamiento de *bacilos* esporulados, se tomó la dilución hasta 10^{-2} del triturado del tejido y se procedió a calentarlo hasta 80°C durante 10 minutos, asegurando que solo las formas esporuladas sobrevivirán a estas condiciones. De este proceso se inoculará 0,1ml en agar Mossel para *Bacillus* y se incubará 24 horas a 37°C

Identificación y caracterización morfológica de cepas de bacterias ácido lácticas y *Bacillus*:

Para la identificación morfológica de estos microorganismos se procedió a determinar colonias cremosas puntiformes de bordes enteros en el agar MRS y rizoides, de bordes indefinidos en el agar Mossel. Además se hizo coloraciones diferenciales por Gram y especiales como endospora; asegurando que las bacterias lácticas correspondan a bacilos Gram positivos no esporulados y los *Bacillus* correspondan a bacilos Gram positivos esporulados. Una vez se tuvo el diagnóstico de estas colonias se purificarán en sus respectivos medios selectivos y se caracterizarán bioquímicamente estos aislados.

Evaluación de la actividad probiótica de bacterias lácticas y esporuladas nativas:

La metodología utilizada para seleccionar las cepas de bacterias susceptibles de ser caracterizadas como probióticas, incluye ciertos criterios para asegurar las características funcionales en el interior del organismo. Estos criterios deben basarse en su capacidad de llegar vivas al intestino, y esto incluye la resistencia al ácido del estómago y a las sales biliares del intestino (Trabelsi et al. 2013)

Estabilidad en el paso por el sistema gastrointestinal:

El pH del estómago es de 2.5, para la mayoría de organismos superiores; la evaluación a este pH incluye la viabilidad que la cepa bacteriana presenta en llegar viva al intestino. El tiempo promedio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago

varía de acuerdo a la especie, aproximadamente es de 4 horas. Por lo que, según Chou y Weimer, en su trabajo publicado en 1999, las pruebas in vitro de resistencia de microorganismos susceptibles de ser catalogados como probióticos deben verificar que son capaces de resistir ese tiempo y pH sin perder viabilidad. Para asegurar esto, una población de 1×10^8 bacterias/ml, tanto para Bacterias ácido lácticas como para *Bacillus* se someterá durante 4 horas a esta acidez y luego se realizarán las pruebas de viabilidad en agar MRS y Mossel respectivamente (Trabelsi et al. 2013).

Resistencia a las sales biliares:

Para asegurar que las cepas aisladas tienen resistencia a sales biliares, 1×10^8 bacterias/ml, tanto de Bacterias ácido lácticas como *Bacillus* se sometieron durante 4 horas a una concentración de 3% de sales biliares y luego se realizaron las pruebas de viabilidad en agar MRS y Mossel respectivamente.

Pruebas de estabilidad a temperaturas altas:

Para determinar la estabilidad de las cepas al calor se contarán de forma duplicada por Mac Farland 1×10^8 bacterias/ml y se someterán a temperaturas de 80°C y 50°C durante 20 minutos con el objetivo de evaluar la resistencia a temperaturas empleadas en la producción de alimentos, posteriormente se evaluará viabilidad por UFC. (Ramírez et al., 2007)

Pruebas de estabilidad a Enzima:

La sensibilidad de los microorganismos a la actividad de algunas enzimas será evaluada con Tripsina, enzima proteolítica digestiva que cataliza en el intestino delgado la fragmentación de las proteínas de la dieta en péptidos y aminoácidos. Para ésta evaluación se estimarán 1×10^{12} bacterias/ml y se someterán durante 2 horas 0.5 mg mlG^{-1} posteriormente se evaluará la viabilidad por conteo en placa por UFC.

Identificación bioquímica y molecular de las cepas de bacterias Ácido Lácticas y bacillus nativos:

Los aislados que hayan presentado los mejores perfiles en todas las pruebas previamente descritas se someterán a los análisis para determinación de género y especies por pruebas bioquímicas convencionales como catalasa, oxidasa, API50CHL y API 50 CHB. Las pruebas de identificación molecular se realizarán por 16S RNA, de acuerdo al protocolo descrito por Hensieky colaboradores en 1992.

Análisis estadístico:

Todos los resultados se mostrarán como promedios y sus variaciones expresadas como las desviaciones estándar, de los promedios encontrados. Se aplicará una prueba de Student y análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la cantidad de poblaciones de posibles probióticos encontrados en los diferentes muestreos en relación a la época de lluvia o de sequía.

Se aplicará además un coeficiente de correlación de Pearson para determinar la posible relación entre la época del año (lluvia – sequía), el tipo de probiótico encontrado.

Todos los análisis se correrán utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurión (XVI).

Resultados

Aislamiento de microorganismos

Después de realizar los aislamientos tal cual como se describió en la metodología se encontraron cinco aislados que presentaron características de microorganismo probiótico, encontrando resistencia a cada uno de los metabolitos evaluados.

CE2.1

CE3

CE3b

CE4b

CEbal

Los aislados CE2.1, CE3, CE3b, CE4b correspondieron a bacilos esporulados y el aislado CEbal correspondió a una bacteria láctica.

Las bacterias que mostraron hemólisis en agar sangre no se tuvieron en cuenta dentro del proyecto, en la figura 1, se observa dos de las cepas evaluadas sin actividad hemolítica.

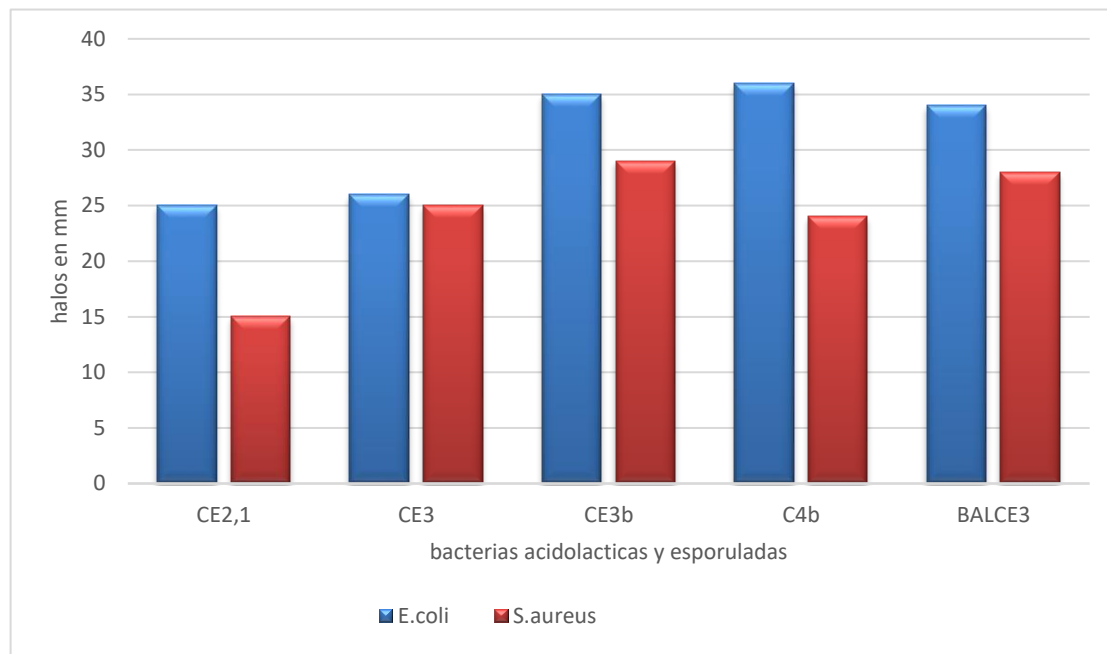
Grafico 1: Aislados No Hemoliticos



Los microorganismos que presentaron los mejores perfiles de desempeño probiótico, fueron evaluados frente a cepas patógenas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el ensayo de difusión en pozos los resultados encontrados se muestran en el gráfico 2.

En los resultados se observa que los microorganismos CE3b, C4b y CEbacteria lácticas controlaron muy bien el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus*, los halos fueron superiores a los generados por CE2.1 y C3

Grafico 2: Actividad bactericida de los extractos de microorganismos probióticos frente a E.coliy S.aureus



Evaluación de los microorganismos frente a los analitos

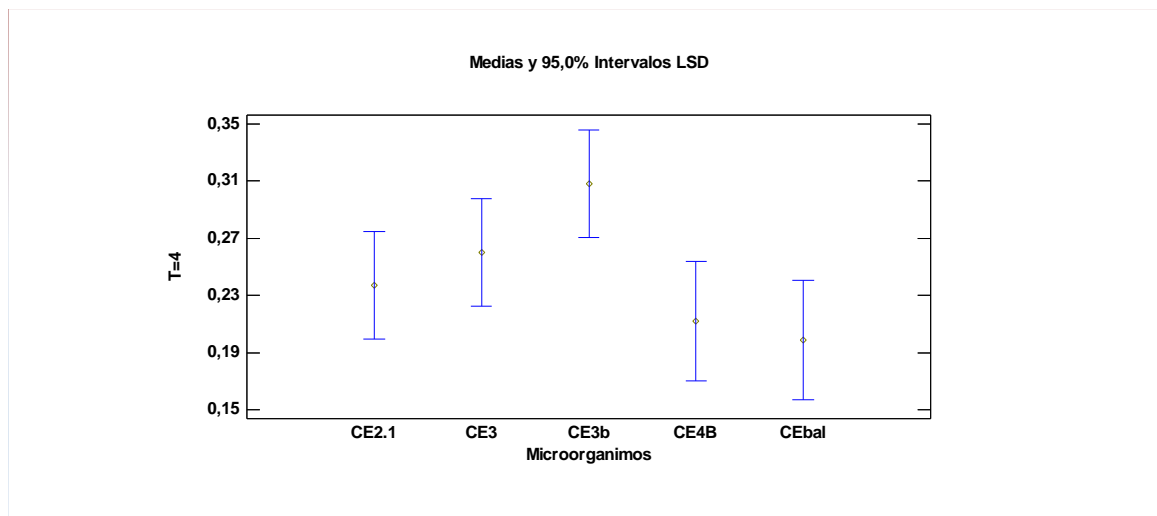
Para evaluar la diferencia entre las respuestas de los microorganismos frente a los diferentes analitos, se realizó una ANOVA en el paquete estadístico Statgraphics Centurión (XVI), con el objeto de determinar si hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los resultados se muestran en la tabla 1 donde se observa un $p < 0,05$ corroborando que hubo diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de los microorganismos a los analitos.

Tabla 2 : Análisis de Varianza para diferencias entre los microorganismos frente a los metabolitos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>l</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0,332746	0	0,0332746	4,33	0,0003
Residuo	0,346075	5	0,0076905		
Total (Corr.)	0,678821	5			

Los resultados de sobrevivencia después de 4 horas al efecto de los analitos se muestran en el grafico 3. El microorganismo CEb presentó las medidas de absorbancia más altas, lo cual se ve reflejado directamente en el crecimiento del microorganismo.

Grafico 3: sobrevivencia de microorganismos probioticos (absorbancia)



Para corroborar la diferencia en la medida de absorbancia de los microorganismos evaluados frente a los analitos, se realizó un análisis de Comparaciones Múltiples para los 5 Microorganismos evaluados (tabla 2). El aislado que presentó diferencia al interior del grupo es el aislado C3b, tal cual como lo muestra el gráfico 3

Tabla 3: Comparaciones múltiples entre los 5 aislados

<i>Microorganismos</i>	<i>Re-cuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cebal	12	0,198 887	0,029 2469	X
CE4B	12	0,211 887	0,029 2469	X
CE2.1	12	0,237	0,026	XX

		311	3079	
CE3	12	0,260	0,026	XX
		311	3079	
CE3b	12	0,308	0,026	X
		227	3079	

De acuerdo a los resultados tanto bioquímica como molecularmente, el aislado CEb corresponde a un *Bacillus subtilis*.

Discusión

Los resultados encontrados en esta investigación se contrastaron con otros trabajos, entre ellos el realizado por Angmo y colaboradores en 2015, ellos evaluaron en potencial probiótico de 25 cepas de bacterias lácticas aisladas de alimentos fermentados, estos microorganismos fueron sometidos a una concentración de lisozima de 100 ppm durante una hora, demostrando que los microorganismos sometidos a estas condiciones son capaces de resistir a la acción pro-

teolítica de la lisozima (Angmo, Kumari, Savitri, & Bhalla, 2016), eso soporta lo encontrado en este trabajo ya que las bacterias ácido lácticas aisladas resistieron a la acción de la lisozima.

Cueto et al. En(2010) evaluaron la resistencia a sales biliares de 53 cepas de BAL aisladas de queso costeño a una concentración de sales al 0,3% durante 2 horas y reportaron una resistencia del 49,1 % de los aislados a esta condición. por su parte Ji et a. (2015), evaluaron bacterias lácticas a una concentración del 0,3% p/v durante 24 horas concluyendo que el 90% de los microorganismos evaluados resistieron a estas condiciones (Ji, Jang, & Kim, 2015); Ramesh y colaboradores en 2015 determinaron la capacidad de cepas de *Bacillus* sp para resistir a las sales biliares encontrando una sobrevivencia del 72% (Ramesh, Vinothkanna, Rai, & Vignesh, et al. 2015); en este estudio se pudo evidenciar que los microorganismos aislados, tanto BAL como bacilos esporulados mostraron una supervivencia a la acción ejercida por las sales biliares, esta resistencia se debe a que estos microorganismos generan solutos compatibles como método de adaptación a las sales biliares.(Khan & Kang, 2016).

En trabajos realizados por (Chaves, Silva, Pinheiro, Valadares Filho, & Campos, 1999; Ji et al., 2015; Nguyen et al., 2015; Ramesh et al. 2015; Rodríguez, 2009) (Cervantes & Ciencias, 2014)(Perez-Sanchez et al. 2014) la evaluación de la resistencia al pH y a la sales biliares se llevó a cabo de manera conjunta concluyendo que no hay diferencias en la combinación del pH con las sales biliares, puesto que la respuesta de los microorganismos es diferente para cada uno de los analitos(Saran, Bisht, Singh, & Teotia, et al. 2012). La evaluación de

la resistencia a NaCl se incluyó en este estudio, porque las tilapias cultivadas en tanques se les debe introducir sal con el fin de osmorregular el agua, entonces la resistencia de los microorganismos a medios hipertónicos se usó como criterio para adicionar este analito como prueba de desempeño probiótico en tilapia roja.

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

Actividad bactericida: Los extractos de los microorganismos aislados presentaron actividad bactericida, Amorocho en 2011 evaluó la actividad bactericida de los extractos de BAL aisladas de leche de cabra en 2 cepas de *H. pylori* y 4 cepas de *Salmonella* sp evidenciando que el extracto de bacterias BAL posee compuestos antimicrobianos capaces de evitar el crecimiento de bacterias patógenas In Vitro (Amorocho Cruz, 2011). Bálcazar y colaboradores en 2008 demostraron la capacidad bactericida de tres cepas de BAL frente a 4 bacterias que causan infecciones en peces (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*,

Yersinia ruckeri y *Vibrio anguillarum*)(Jose L. Balcazar et al. 2008), en otro estudio, Pirarat y colaboradores evaluaron la capacidad bactericida de una cepa de BAL tenían contra *S. agalactiae*, demostrando que las BAL pueden disminuir la mortalidad por este agente al menos en un 50% en tilapias.(Pirarat et al., 2015) Apún en 2009 evaluó la capacidad bactericida de extractos de BAL y *Bacillus* sp aislados de tilapia frente a cepas de *Vibrio* sp. encontrando halos de inhibición de 6 mm de diámetro(Apun-Molina et al., 2009), en 2015 Bentzon y colaboradores demostraron que cepas de *Roseobacter* tienen capacidad antagónica frente a cepas de *V. anguillarum* y *V. harveyi*, que son los principales patógenos bacterianos en los crustáceos y larvas de róbalo en los países mediterráneos (Bentzon-tilia, Dourala, Nielsen, Gram, & Street, 2015), Ramesh y colaboradores en 2015 evaluaron la actividad bactericida que cepas de *Bacillus* Sp. tenían frente a cepas de *A. hydrophila* concluyendo que los bacilos esporulados producen compuestos con actividad bactericida. (Ramesh et al. 2015), la actividad bactericida de cepas de *Bacillus* sp se debe a que estos microorganismos producen proteasas y fosfatasa.(Aly et al. 2008) Wu en 2014 evidenció el aumento de la respuesta inmune y la protección contra *Vibrio parahaemolyticus* por cepas nativas de *Bacillus* sp. en el cangrejo de barro, los cuales gracias a la suplementación con cepas nativas mostraron una expresión más elevada de los genes de la respuesta inmune (Wu et al. 2014); Muñoz y colaboradores en 2014 evaluaron la capacidad bactericida de cepas de BAL en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) contra cepas de *Vibrio splendidus*, de las cuales 7 de 8 cepas evaluadas ejercieron actividad antimicrobiana directa contra, al menos, cuatro cepas de *V. splen-*

didus (Muñoz-Atienza et al. 2014). En 2012 Zhao y colaboradores determinaron los efectos de potencial probiótico de cepas de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento, la inmunidad y la resistencia a la enfermedad contra la infección por *Vibrio splendidus* en juveniles pepino de mar *Apostichopus japonicus* (Zhao et al. 2012) todos estos estudios soportan los resultados encontrados en este trabajo, puesto que tanto bacterias lácticas como bacterias esporuladas demostraron tener actividad bactericida frente a cepas de bacterias gram positivas y gram negativas, lo que convierte a estos microorganismos en un método de control natural contra bacterias oportunistas.

Conclusiones Y Recomendaciones

En este trabajo se pudo concluir que los microorganismos CE3b, C4b y CE bacteria lácticas controlaron muy bien el crecimiento de Escherichia coli y Staphylococcus, los halos fueron superiores a los generados por CE2.1 y C3. El microorganismo CEb presentó las medidas de absorbancia más altas, lo cual se ve reflejado directamente en el crecimiento del microorganismo. BAL como bacilos esporulados mostraron una supervivencia a la acción ejercida por las sales biliares, esta resistencia se debe a que estos microorganismos generan solutos compatibles como método de adaptación a las sales biliares.

Para este estudio todas las cepas aisladas fueron sensibles a los antibióticos empleados, las bacterias lácticas como bacterias esporuladas demostraron tener actividad bactericida frente a cepas de bacterias gram positivas y gram negativas, lo que convierte a estos microorganismos en un método de control natural contra bacterias oportunistas.

Referencias

- Acosta-Garcia, J, & Aguilar-Garcia, C. (2014). Infección de tejidos blandos por *Aeromonas salmonicida*. Primer reporte de caso en México y revisión de la bibliografía Soft Tissues Infection Due to *Aeromonas*. *Medicina Interna de México*, 30(2), 221–226.
- Acuña-Monsalve, Y. (2013). Selección e identificación de bacterias con potencial probiótico aisladas del suero costeño. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 44, 54-67.
- Al-Hisnawi, A. A., Mustafa, J. M., Yasser, Y. K., Hussain, K. A., & Jabur, A. M. (2016). Influence of aquatic environment on microbiota of *Liopropoma santi* fish in a local river in Iraq. *Karbala International Journal of Modern Science*, pp1–5.
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008). Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. *Aquaculture*.277,1-2, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture/2008.02.021.Htm>.
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*. 66, 428–435.
- Apun-Molina, J. P., Santamaria- Miranda, A., Luna-Gonzalez, A., Martinez-Diaz, S. F., & Rojas-Contreras, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the

- laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8), 887–894.
- Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O., & Muzquiz, J. L. (2007). Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 51(1), 185–193.
- Bash, E. (2015). Acuerdo de competitividad de la cadena de la piscicultura en colombia. *PhD Proposal*. Recuperado de <http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/pla-nacional-para-el-desarrollo-de-la-acuicultura-sostenible-colombia-pdf>. Htm.
- Bentzon-tilia, M., Dourala, N., Nielsen, K. F., Gram, L., & Street, N. (2015). Isolation of TDA-producing *Phaeobacter* strains from sea bass larval rearing units and their probiotic effect against pathogenic *Vibrio* spp . in *Artemia* cultures. *Systematic and Applied Microbiology*, (October), 1–34.
- Bocek, A., Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - Departamento de Acuicultura de Uruguay, & FAO. (2010). Manual básico de Piscicultura en estanques. *FAO Orientaciones Técnicas Para La Pesca Responsable*. 5(4), 1–52.
- Calvo, P. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp . aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*) physiological characterization of *Bacillus* spp . Strains from potato (*Solanum tuberosum*) *rhizosphere*. 9, 1-2.

Carmen, J., Ramírez, R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas : Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*. 7, 1–16.

Díaz Villamil Luisa, Martínez María Angélica. (2009). Probioticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camaron. Recuperado de <http://www.oceandocs.org/handle.htm>.

Food and Agriculture Organization (FAO 2007) .*El papel de la cuicultura en el desarrollo sostenible*. recuperado de <http://www.FAO.org/newsroom/es/news/2007/index.html>.

Food and Agriculture Organization (FAO 2002) *Estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Recuperado de <http://www.FAO.org/docrep/005/y7300/htm>.

Ricardo Garcia Naranjo, Luz A. Gutierrez, Carlos A David. (2015). El uso de los probioticos en la industria acuícola. *Articulo de revisión, corporación universitaria lasallista*. Recuperado de <http://www.alimentosdehoy.acta.org.co/index.php/hoy/Article/download>. Htm.

Sorroza,I; Padilla,D; Acosta,F; roman,L; Acosta, B. y Real, F. Uso de probioticos en acuicultura. *Revista canaria de las ciencias veterinarias*. 51, 5 - 7. Recuperado de <http://www.acceda.ulgc.es/pdf.htm>.

Spanggaard,B.,Huber,I., Nielsen,J., Sick.E.B, Pipper,C.B., (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Envirionmental microbiology* . 3, 755-765.

Wache, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbe, L., Quentel, C., (2006). Cross effects of the strain of dietary *saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout. *Onchorhynchus mykiss*. *fr. aquaculture*. 258, 470-478.