

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA**

DEPARTAMENTO DE ACUACULTURA

**Efecto de bacterias ácido lácticas y levaduras con potencial
probiótico en el cultivo de las tilapias *Oreochromis niloticus* y
*Oreochromis sp.***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA:

DANIEL QUIÑÓNEZ ZÚÑIGA

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO. DICIEMBRE DE 2008.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave el día 02 del mes Diciembre del año 2008, el (la) que suscribe Daniel Quiñónez Zúñiga alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B061202, adscrito a CIIDIR-SINALOA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Antonio Luna González y cede los derechos del trabajo intitulado Efecto de bacterias ácido lácticas y levaduras con potencial probiótico en el cultivo de la tilapia *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis sp.*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dragon_120@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Daniel Quiñónez Zúñiga

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave siendo las 15:00 horas del día 02 del mes de Diciembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa para examinar la tesis de titulada: "Efecto de bacterias ácido lácticas y levaduras con potencial probiótico en el cultivo de la tilapia *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis sp.*"

Presentada por el alumno:

QUINÓNEZ
Apellido paterno

ZÚÑIGA
Apellido materno

DANIEL
Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	2	0	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Antonio Luna González

Dr. Javier Ordúna Rojas

Dr. Jesús Méndez Lozano

Dr. Héctor A. González Ocampo

Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Jesús Méndez Lozano



CIIDIR-IPN
UNIDAD DEVAL. COE
DIRECCION

Dedicatoria:

A mis padres, que en todo momento de mi vida han estado presentes.

A mi madre, que ha sido mi principal fortaleza para seguir adelante.

A mi padre, que siempre ha estado a mi lado apoyándome.

A mis hermanas Fabiola, Santa, Nohemí y Damariz, las quiero mucho y siempre están conmigo.

A mi sobrina Fernanda, por darme la alegría de hacerla sonreír y al nuevo sobrino, bienvenido.

Los quiero mucho y gracias por dejarme ser parte de sus vidas.

A mis amigos de toda la vida, Hugo, Luís y Juvencio.

A mi esposa Marisol, por dejarme entrar en su vida y compartir momentos alegres a su lado, es una estrella más en el cielo y le agradezco dejarme ser su compañero en la vida, te amo mi vida.

Agradecimientos:

Al Dr. Antonio Luna, por su apoyo y dirección en la elaboración de este trabajo, a mis tutores, Dr. Javier Orduña Rojas, Dr. Ignacio Maldonado Mendoza, Dr. Héctor González Ocampo y al Dr. Jesús Méndez Lozano, por sus aportes en los tutoriales y la revisión de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos de la generación de la G10, quienes me apoyaron en algún momento de mi estancia en el CIIDIR y en mi trabajo de tesis: Viridiana Peraza, Ángel Rojo, Juan Pablo Apún, Arturo Fierro, Dra. Durga, Ely Sara, Gabyta, Carina Gámez, René, Alfredo Sánchez, Damián Cordero, Nacho, Baruch, Arlene Mora, Marcos Tapia, Mariela Espinosa, Hugo Galindo, Luis Cubedo, Pedro Hernández, Jorge Soto, Blanca, Don Roberto, Claudia Norzagaray,

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional por la beca de Posgrado y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por apoyarme con la beca PIFI.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Sinaloa por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

Esta experiencia vivida será un buen recuerdo y pretendo poner en práctica todo el conocimiento adquirido en mi vida laboral.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE CUADROS	IV
GLOSARIO	V
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades del cultivo de tilapia	3
1.2 Enfermedades del cultivo de tilapia	4
1.3 Antibióticos	5
1.4 Probióticos	6
1.5 Mezclas probióticas	6
1.6 Bacterias ácido lácticas	7
1.6.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas	7
1.7 Levaduras	9
2. ANTECEDENTES	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVO GENERAL	16
4.1 Objetivos específicos	16
5. HIPÓTESIS	16
6. METODOLOGÍA	17
6.1 Preparación del alimento con bacterias ácido lácticas (BAL) y la levadura	17
6.2 Experimento 1: Bioensayo con <i>Oreochromis</i> sp.	17
6.3 Experimento 2: Bioensayo con <i>Oreochromis niloticus</i> y <i>Oreochromis</i> sp.	18
6.4 Evaluación del peso, supervivencia y tasa de crecimiento específico	19
6.5 Monitoreo de vibrios totales y bacterias heterótrofas totales durante el experimento	19
6.6 Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y nutrientes	20
6.7 Identificación de las bacterias ácido lácticas	20
6.7.1 Extracción de ADN bacteriano con el kit Bactozol y DNAzol	20
6.7.2 Amplificación con la PCR	21

6.7.3 Clonación y secuenciación del producto amplificado	21
6.7.4 Criterios de identificación	22
6.8 Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	23
7.1 Primer experimento: evaluación del peso, tasa de crecimiento específico y supervivencia final de <i>Oreochromis</i> sp.	23
7.1.1 Evaluación del crecimiento en peso de <i>Oreochromis</i> sp.	23
7.1.2 Tasa de crecimiento específico	24
7.1.3 Evaluación de la supervivencia final	25
7.1.4 Análisis bacteriológico	26
7.1.5 Parámetros fisicoquímicos y nutrientes	26
7.2 Segundo experimento: evaluación del peso, tasa de crecimiento específico y supervivencia final de <i>Oreochromis niloticus</i> y <i>Oreochromis</i> sp.	27
7.2.1 Evaluación del crecimiento en peso de <i>Oreochromis niloticus</i>	27
7.2.2 Evaluación del crecimiento en peso de <i>Oreochromis</i> sp.	28
7.2.3 Tasa de crecimiento específico de <i>Oreochromis niloticus</i>	29
7.2.4 Tasa de crecimiento específico de <i>Oreochromis</i> sp.	30
7.2.5 Supervivencia de <i>Oreochromis niloticus</i>	30
7.2.6 Supervivencia de <i>Oreochromis</i> sp.	31
7.2.7 Análisis bacteriológico	32
7.2.8 Parámetros fisicoquímicos y nutrientes	32
7.3 Identificación de las bacterias ácido lácticas	33
7.3.1 Amplificación con la PCR	33
7.3.2 Clonación y secuenciación del producto amplificado	33
7.3.3 Comparación de la secuencia LTA8 con la base de datos de NCBI	34
8. DISCUSIÓN	37
9. CONCLUSIONES	42
10. RECOMENDACIONES	43
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
12. ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Primer experimento. Tasa de crecimiento específica de <i>Oreochromis sp.</i>	23
Figura 2	Primer experimento. Supervivencia final de <i>Oreochromis sp.</i>	24
Figura 3	Segundo experimento. Peso promedio de <i>Oreochromis niloticus.</i>	25
Figura 4	Segundo experimento. Peso promedio de <i>Oreochromis sp.</i>	27
Figura 5	Segundo experimento. Tasa de crecimiento específico de <i>Oreochromis niloticus.</i>	28
Figura 6	Segundo experimento. Tasa de crecimiento específico de <i>Oreochromis sp.</i>	29
Figura 7	Segundo experimento. Supervivencia final de <i>Oreochromis sp.</i>	30
Figura 8	Amplificación con la PCR	31
Figura 9	Clonación del producto amplificado	33
Figura 10	Gel de agarosa que muestra el fragmento de la cepa Lta8 liberado del vector pGEM T-easy.	34

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1	Experimento 1.- Bacterias totales y vibrios totales presentes en el agua de los tanques de cultivo.	26
Cuadro 2	Determinación del pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura, amonio, nitritos y nitratos en el agua del sistema de cultivo.	26
Cuadro 3	Experimento 2.- Bacterias totales y vibrios totales presentes en el agua de los tanques de cultivo.	32
Cuadro 4	Determinación del pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura, amonio, nitritos y nitratos en el agua del sistema de cultivo.	32
Cuadro 5	Identificación de la cepa Lta8 a partir del análisis de comparación de secuencias utilizando el software BLAST.	35
Cuadro 6	Secuencia obtenida sin vector, utilizada para el análisis de secuencias y la comparación con la base de datos del NCBI.	36

GLOSARIO

Acuicultura.- Conjunto de técnicas y actividades cuyo objetivo es la cría en cautiverio de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos, reptiles o algas) en agua cuyo mayor o menor carácter intensivo depende del grado de intervención del hombre en los ciclos biológicos de los organismos en cuestión.

Antibiótico.- Sustancia química capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos. Generalmente actúan sobre bacterias, aunque algunos también actúan contra ciertos hongos y contra virus de gran tamaño, o contra células animales o vegetales.

Alevín.- Pez con peso de 0.5 a 25 gramos o largo total no mayor de 2.5 cm.

Cepa.- En bacterias: Variedad dentro de una misma especie debido a diferencias genéticas. Aunque las cepas varían genéticamente todavía pueden reproducirse entre sí. Equivale al término raza en plantas y animales. Colonia de microorganismos monoespecífica la cual se utiliza para iniciar un cultivo bajo condiciones controladas.

Dry Oil®.- Atractante y ligante para alimentos destinados a la acuicultura fabricado a base de aceites de pescado deshidratado.

Lactobacilo.- Bacteria ácido láctica. Es un género de bacterias Gram positivas anaerobias, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. Normalmente son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales, por ejemplo, están presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Muchas especies son importantes en la descomposición de material vegetal. La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas.

Lactococcus.- Es un género de bacteria ácido láctica formado por cinco especies. Son típicamente esféricas u ovoides, de 0,5 a 1,2 μm por 0,5 a 1,5 μm , y viven en pares y cadenas cortas. Son no formadores de esporas y no son móviles. La especie tipo del grupo es *L. lactis* con dos subespecies *lactis* y *cremoris*. *Lactococcus* difiere de otras bacterias ácido lácticas por su pH, sales y tolerancia a temperatura para crecer.

Levadura de torula.- Es obtenida a partir del serrín de madera, en la fabricación del alcohol ejemplo de ellas son: *Torula utilis*.y *Candida utilis*. Se diferencian de las otras levaduras porque su metabolismo se dirige de tal modo que se logra la formación exclusiva y específica de grasas, lípidos, proteínas y otros componentes celulares y no la formación clásica de alcohol y dióxido de carbono a expensas de los azúcares. Son poco exigentes en lo que se refiere a medios de cultivo y su grado de aprovechamiento técnico es particularmente alto.

Presuntivo.- Apoyado en presunciones, supuesto.

Probiótico.- Se considera alimento probiótico aquel que contiene microorganismos vivos presentes en un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos. Se define como un suplemento microbiano formado por un cultivo simple o mixto de microorganismos seleccionados que son adicionados con el propósito de manipular las poblaciones bacterianas presentes en los sistemas de producción.

Tilapia.- Grupo de peces de origen africano que habita mayoritariamente en regiones tropicales del mundo. Entre sus variedades destacan la tilapia *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus* y *Oreochromis mossambicus*.

***Oreochromis niloticus*.-** La tilapia negra o gris, sus extraordinarias cualidades, como crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación al cautiverio,

aceptación a una amplia gama de alimentos, resistencia a enfermedades, carne blanca de calidad y amplia aceptación, han despertado gran interés comercial en la acuicultura mundial. Es un pez de aguas cálidas, que vive tanto en agua dulce como salada y aguas poco oxigenadas. Se encuentra naturalmente distribuida por América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica y el sudeste asiático. Antes considerado un pez de bajo valor comercial, hoy su consumo, precio y perspectivas futuras han aumentado significativamente.

Oreochromis sp.- La tilapia roja es originaria de África y del Oriente Medio, es producto del cruce de cuatro especies (*Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, *O. hornorum* y *O. aureus*). La tilapia roja por sus hábitos alimentarios, capacidad de adaptación, fácil reproducción, resistencia a enfermedades y posibilidades de soportar condiciones adversas en cultivo, con amplia tolerancia a enfermedades y rápido crecimiento, es ideal para la producción en estanques bajo sistemas extensivos o intensivos.

Bacteria ácido-láctica.- Grupo de bacterias que fermentan carbohidratos dando ácido láctico como producto principal. Se las emplea en la fabricación de yogurth, quesos, leche fermentada y embutidos.

Pediococcus.- Es un género de bacterias del ácido láctico Gram-positivas de la familia *Lactobacillaceae*. Normalmente se presentan en pares o tétradas, siendo las únicas bacterias del ácido láctico con forma de coco que se dividen a lo largo de dos planos de simetría. Son bacterias puramente homofermentativas, usualmente consideradas contaminantes de la cerveza y vino aunque en algunas cervezas tales como la de tipo Lambic es deseable su presencia.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAL	Bacterias ácido lácticas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grado Celsius
cm	Centímetro
d	Días
DE	Desviación Estándar
EE	Error Estándar
g	Gramo
h	Hora
l	Litro
m³	Metro cúbico
min	Minutos
ml	Mililitro
mg/l	Miligramos por litro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH₄	Amonio

NO₂	Nitrito
NO₃	Nitrato
Organismos/m³	Organismos por metro cúbico
%	Porcentaje
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
t	Toneladas
TCBS	Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa
TCE	Tasa de crecimiento específico
TS	Tripticasa de soya
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
TCE	Tasa de Crecimiento Específico

RESUMEN

Se evaluó el efecto de una mezcla probiótica (bacterias ácido lácticas y una levadura) en la ganancia en peso y la supervivencia de las tilapias *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp. en dos experimentos y además se realizó la identificación de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) mediante la secuenciación del ADNr 16S. El primer experimento tuvo una duración de 4 meses. Los alevines de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) tenían un peso promedio de 0.18 g. La densidad de siembra inicial fue de 40 animales por tanque realizando un desdoble del 50 % al primer mes de cultivo. Cuatro tratamientos fueron analizados: 1) peces alimentados con alimento comercial + Dry Oil (DO); 2) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; 3) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g) diariamente; y 4) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g) diariamente. Los organismos se pesaron al inicio y mensualmente, la supervivencia se registró al final del experimento. El peso promedio de los peces alimentados con alimento + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente fue mayor que los demás tratamientos; la supervivencia final fue mayor en el tratamiento control con 92.1 % que en los tres tratamientos con la mezcla probiótica con un porcentaje promedio de 71 %; en cuanto a la Tasa de Crecimiento específica (TCE) se obtuvieron valores muy similares en todos los tratamientos y no se encontraron diferencias significativas en los parámetros antes mencionados. El segundo experimento tuvo una duración de 3 meses. Los alevines de tilapia negra tenían un peso promedio de 6.12 g y la tilapia roja 4.09 g. La densidad inicial de siembra fue de 80 animales por tanque, 40 negras y 40 rojas realizando un desdoble del 50 % al primer mes de cultivo. Cuatro tratamientos fueron analizados: 1) peces alimentados con alimento comercial + DO; 2) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; 3) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) cada 10 días y 4) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) sólo durante los primeros 10 días y luego alimento sin la mezcla. Los organismos se pesaron al inicio y mensualmente, la supervivencia se registró al final del experimento. El peso promedio de los peces (*O. niloticus* y *Oreochromis* sp.) alimentados diariamente y cada 10 días con alimento + mezcla probiótica + DO fue significativamente mayor que el tratamiento con peces alimentados con alimento comercial + DO sin la mezcla probiótica. La supervivencia final de *O. niloticus* fue del 100 % en los 4 tratamientos. En *Oreochromis* sp. el tratamiento con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diario tuvo una supervivencia de 96.6 %, en los peces alimentados con alimento comercial + DO fue de 91.6%, en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d fue de 88.3 % y en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d fue de 95 % y no se presentaron diferencias significativas. Las bacterias y la levadura adicionadas al alimento, en las concentraciones experimentales, mejoran el crecimiento en peso de los alevines de *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp. La cepa bacteriana Lta8 pertenece al género *Pediococcus*.

ABSTRACT

The effect of a probiotic mixture (lactic acid bacteria and one yeast) was evaluated in two experiments on weight and going survival of the tilapias *Oreochromis niloticus* and *Oreochromis* sp. The identification of some lactic acid bacteria (BAL) was done by sequencing the 16S rDNA. The first experiment had duration of 4 months. The fries of red tilapia (*Oreochromis* sp.) had an average weight of 0.18 g. The initial density was 40 animals per tank with 50 % unfolding after the first month of culture. Four treatments were analyzed: 1) fish fed with commercial feed + DO; 2) fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g) every day; 3) fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (1×10^6 UFC/g) every day, and 4) fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (1×10^7 UFC/g), every day. The organisms were weighed at the beginning of the experiment and monthly. The survival was registered at the end of the experiment. The average weight of the fish fed with commercial feed + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g) every day was better than the other treatments. Survival was higher on fish fed with commercial feed + DO. Specific Growth Rate did not show significant differences between treatments. The second experiment had duration of 3 months. The fries of *O. niloticus* had an average weight of 6.12 g and *Oreochromis* sp. 4.09 g. The initial density of culture was 80 animals per tank, 40 of *O. niloticus* and 40 *Oreochromis* sp. with 50 % unfolding after at the first month of culture. Four treatments were analyzed: 1) fish fed with commercial feed + DO; 2) fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g) every day; 3) fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g), every 10 d and 4) fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g), only during the first 10 d and after that regular commercial feed was given. The animals were weighed at the beginning and monthly. The survival was registered at the end of the experiment. The average weight of *O. niloticus* and *Oreochromis* sp. fed every day and every 10 d with commercial feed + probiotic mixture was significantly better than fish fed with commercial feed + DO. The final survival rate of *O. niloticus* was 100 % in all treatments. In *Oreochromis* sp., fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g) daily had 96.6 %, fish fed with commercial feed + DO was 91.6 %, in fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g), every 10 d was 88.3 % and fish fed with commercial feed + DO + probiotic mixture (5×10^4 UFC/g), only during the first 10 d was 95 %. There was no significant difference between treatments. The bacteria and yeast added to the food, at the experimental concentrations used, improved the growth in weight of the fries of *Oreochromis niloticus* and *Oreochromis* sp. The bacterial strain Lta8 was identified molecularly belonging to the genus *Pediococcus*.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, en los últimos años, ha tenido avances significativos en la producción de una amplia variedad de organismos que proporcionan proteína de origen animal, como peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos, con un crecimiento del 32.4 %, registrado solamente en el año 2004. Este crecimiento sigue siendo más rápido que el logrado en cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal. El cultivo de peces dulceacuícolas representa el mayor volumen de producción (56.6 %) comparado con los demás grupos de especies cultivadas (FAO, 2006).

1.1 Generalidades del cultivo de tilapia

El cultivo de tilapia posee gran importancia en la producción de proteína animal en todo el mundo, particularmente en los países en vías de desarrollo (Lara- Flores *et al.*, 2002). La tilapia es cultivada en más de 100 países y ocupa el segundo puesto en la producción mundial con 1.6 millones de toneladas métricas al año. Este crecimiento le ha permitido conquistar todo tipo de mercados, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo (Castillo, 2005).

El cultivo comercial de tilapia en Latinoamérica ha crecido enormemente en los últimos 25 años (FAO, 2004). En México, se han construido estanques con la intención de hacer de la piscicultura una actividad productiva rutinaria del campo, debido a que es una actividad capaz de proporcionar, además de alimento, recursos económicos y empleo (Arce-Moreno, 1989). Aunque se conocen más de 100 especies de tilapia sólo algunas se cultivan debido a la importancia económica en la producción en condiciones controladas. Entre las especies más cultivadas se encuentra *Oreochromis niloticus* (tilapia negra) que es originaria de África y del Oriente Medio y *Oreochromis* sp. (tilapia roja) que es producto del cruce de cuatro especies (*Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, *O. hornorum* y *O. aureus*) (Beveridge y McAndrew, 2001). En estas especies, la temperatura y el oxígeno son los parámetros más importantes, aunque son capaces de sobrevivir a bajas condiciones de oxígeno esto tiene sus consecuencias, como la susceptibilidad a enfermedades, sobretodo cuando se

encuentran en condiciones de estrés, que se traduce en bajas tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia. Tiene hábitos alimenticios omnívoros, aunque difiere la alimentación de los juveniles y la de los adultos, la reproducción es externa y la incubación de los huevos se lleva bucalmente, este tipo de cultivo se lleva a cabo en aguas tranquilas y con poca profundidad (Costa- Pierce *et al.*, 1997).

Los estudios indican que la microflora gastrointestinal del pez es altamente variable y es un reflejo de su medio acuático, especialmente por el alimento que consumen (Nieto *et al.*, 1984), y la mayoría de estas bacterias llegan al tracto gastrointestinal (Buras *et al.*, 1987).

Debido a las condiciones de cultivo, como son altas densidades de siembra y limitada calidad del agua, los organismos se encuentran sujetos a un estrés constante que se traduce en bajas tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia, así como presencia de enfermedades oportunistas (Lara- Flores *et al.*, 2002).

1.2 Enfermedades del cultivo de tilapia

Uno de los inconvenientes que presenta el cultivo de tilapia es la aparición de enfermedades en edades tempranas (larvas y alevines) causadas por hongos, parásitos, crustáceos, y un gran número de bacterias (Conroy, 2004), lo que impide que continúe su desarrollo y crecimiento en un plazo corto, incluso causando mortalidad. Al igual que en el cultivo de camarón, las enfermedades causadas por vibrios son de las más comunes (Moriarty, 1999).

Este resurgimiento de las enfermedades se relaciona con la intensificación de los métodos de cultivo. Actualmente las tilapias se cultivan en densidades cada vez mayores y en sistemas de recirculación de agua; y aunque la tilapia crece de manera importante en estos sistemas, los patógenos también. La erradicación de un patógeno generalmente implica el despoblamiento, la esterilización y la repoblación del área; pero aún llevando a cabo el segundo paso, el de la esterilización, nunca se conocerá si se eliminaron por completo los patógenos (Conroy, 2004).

1.3 Antibióticos

Una de las soluciones prácticas que se han encontrado para resolver el problema de las enfermedades, especialmente bacterianas, es el uso de antibióticos; sin embargo, los problemas de resistencia generados por los mismos han dirigido la investigación hacia el uso de controles más amigables con el organismo y con el ambiente (Sotomayor y Balcázar, 2003).

Entre los antibióticos usados en la acuicultura, están la tetraciclina, cloramfenicol, quinolonas; además de varios agentes terapéuticos, desinfectantes, pesticidas, tratamientos para el agua y suelo, y aditivos de alimentos (Phillips, 1996). El uso inapropiado de estas sustancias puede resultar en efectos adversos en el animal como alteraciones hormonales, intoxicación, predisposición a enfermedades (Lara-Flores *et al.*, 2002), además de la acumulación de antibióticos en los órganos internos del pez, haciéndolo inadecuado para el consumo humano, y con riesgos de contaminación ambiental. Algunas de estas sustancias son excretadas sin haber sido metabolizadas o liberadas como metabolitos activos, persistiendo en el ambiente durante largo tiempo (Díaz-Cruz *et al.*, 2003) o en el consumidor final, así como pueden conducir a una resistencia en bacterias patógenas, las cuales son capaces de transportar los genes de resistencia a los antibióticos, desde las zonas de producción piscícola hasta los humanos (Sorum y L'Abée-Lund, 2002), pudiendo generar cepas resistentes en la microbiota intestinal humana, dando lugar a desequilibrios en la misma. Estos inconvenientes hacen inadecuado el uso de los antibióticos como medida profiláctica (Kautsky *et al.*, 2000).

Las estrategias de control se han enfocado a mejorar técnicas en larvicultura para incrementar el rendimiento y resistencia a enfermedades de origen bacteriano (Alday, 1999). La tendencia actual es de restringir o reducir el uso de antibióticos utilizando los probióticos, los cuales son usados como una estrategia de control bacteriológico bajo el principio de exclusión competitiva, ya que ocupan espacios y demandan nutrientes del agua, del fondo del estanque, del tracto digestivo y reducen la colonización y el desarrollo de otros microorganismos patógenos (Moriarty, 1999; Berger, 2000; Newman, 2000; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001).

1.4 Probiótico

La palabra probiótico fue acuñada por Parker en 1974, se deriva de dos vocablos griegos que significa “para la vida” el cual contrasta con otra palabra muy usada que es antibiótico que significa “contra la vida”.

La definición original de Parker sólo delimitaba a los cultivos microbianos y a los productos de estos. Metchnikoff (1907) atribuía la longevidad de los habitantes búlgaros al consumo de leche fermentada, él tenía la teoría de que al ingerir microorganismos benéficos era posible controlar a los patógenos y que la ingesta de estos microorganismos impedía la colonización de los patógenos, lo cual incrementa las condiciones de la salud, esto es conocido en microbiología con el término de “exclusión competitiva” (Amores *et al.*, 2004).

Fuller (1989) señaló que los probióticos son un suplemento alimenticio microbiano vivo que beneficia al hospedero animal con una mejoría del balance microbiano intestinal.

En acuicultura el término probiótico se define como un suplemento microbiano formado por un cultivo simple o una mezcla de microorganismos que son adicionados con el propósito de manipular las comunidades microbianas presentes en los sistemas de producción (Balcázar, 2002).

El término probiótico está más asociado al género *Lactobacillus* en la salud humana. Entre los microorganismos comúnmente empleados se encuentran las bacterias ácido lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies (Vaughan *et al.*, 2002).

1.5 Mezclas probióticas

El uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, y en el mejor establecimiento de poblaciones probióticas, observándose procesos sinérgicos entre cepas que han potenciado los resultados deseados (Douillet, 2000).

La interacción entre el ambiente y el hospedero en un ambiente acuático es compleja, pero ambos conviven en el mismo ecosistema. Los microorganismos presentes en el agua influyen en la microbiota del intestino del hospedero y viceversa.

Los géneros presentes en el intestino del hospedero parecen ser los mismos microorganismos presentes en el ambiente. De hecho, se considera que en sistemas acuícolas el uso de probióticos tiene gran influencia en la salud de peces que en animales terrestres y humanos (Verschuere *et al.*, 2000).

Las microorganismos tienen propiedades como agentes de biocontrol para el uso en laboratorios y granjas de cultivo, reduciendo la presencia de *vibrios* patógenos en los sistemas acuícolas (Sotomayor y Balcázar, 2003), basándose en el principio de exclusión competitiva, uno de los procesos ecológicos que manipula la composición de las bacterias presentes en el agua, sedimento y la flora gastrointestinal de los organismos.

1.6 Bacterias ácido lácticas

Según Axellsson (1998) las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram positivas agrupadas por características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de estas bacterias las incluye dentro del grupo de Gram positivas, no esporuladas, cocos y bacilos anaerobios que producen mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos. Se pueden distinguir dos vías de fermentación del azúcar entre las BAL. La glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof), que en condiciones estándar resulta en la formación de casi exclusivamente ácido láctico como producto final y el metabolismo se conoce como fermentación homoláctica. La segunda vía es la de la ruta de 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa, que además del ácido láctico resulta en la producción de cantidades significativas de productos finales como etanol, acetato y CO₂. A este tipo de metabolismo se le llama fermentación heteroláctica. Los productos resultantes de la fermentación pueden alternarse dependiendo de las condiciones de crecimiento. Estos cambios pueden atribuirse a alguna alteración del metabolismo del piruvato y/o el uso de un aceptor externo como el oxígeno o componentes orgánicos.

1.6.1. Clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL)

La clasificación de las BAL siempre ha sido materia de controversia, pero históricamente, los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*

forman el núcleo principal de su clasificación. Las revisiones taxonómicas sugieren que el grupo de bacterias ácido lácticas compromete los siguientes grupos: *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Giobicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

El género *Bifidobacterium* generalmente está considerado como una bacteria ácido láctica genuina, pero filogenéticamente no tiene relación alguna ya que tiene una única vía de fermentación de azúcar. La clasificación de las bacterias BAL está ampliamente basada en la morfología, vía de fermentación de la glucosa (fermentación homoláctica o heteroláctica), crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido (L- o D-), habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia al medio ácido o básico. Los marcadores quimiotaxonómicos así como la composición de ácidos grasos y los constituyentes de la pared celular también pueden ser útiles para su clasificación.

Se han descrito diversos sistemas de inhibición microbiana desarrollada por bacterias lácticas como producción de ácidos orgánicos, formación de metabolitos de oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas. Estos mecanismos las hacen capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes y/o patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria* (Zamora-Rodríguez, 2003).

Las bacterias ácido lácticas no son dominantes en la microbiota normal del pez, pero algunas cepas pueden colonizar el intestino y mantener artificialmente la población de bacterias ácido-lácticas en alta concentración por consumo regular en el alimento (Ringø, 1998).

Una simple dosis debe ser capaz de sobrevivir dentro del intestino y adherirse al moco intestinal. Sin embargo, dosis desde 10^6 células/mL pueden ser innecesarias (Maeda, 1994). Dosis regulares con bajas concentraciones de bacterias pueden asegurar que las bacterias permanezcan en el agua y subsecuentemente en el tracto intestinal. Las larvas de la escalopa chilena *Argopecten purpuratus* fueron expuestas por 24 h a un probiótico (cepa 77) en concentraciones de 10^4 y 10^6 células/mL. Encontrándose que casi el 100 % del intestino fue dominado por el probiótico

(Riquelme *et al.*, 2000). La concentración de bacterias se mantienen en el intestino cuando se adicionan en concentraciones de 5×10^3 células/mL cada día (Riquelme *et al.*, 2001).

En la producción de sustancias antimicrobianas, se ha demostrado que algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* producen antibióticos como acidophilis, lactolina y acidolina. La acidolina ha sido investigada y se ha observado que tiene una alta actividad contra bacterias enteropatógenas como *E. coli*, *Salmonella typhimuriun*, *Sthaphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* (Aguirre, 1992).

Algunas cepas probióticas que han sido estudiadas en la salud humana como *Lactobacillus rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* Shirota, han sido empleadas en experimentos en peces para prevenir enfermedades, con resultados positivos contra patógenos como *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum* (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

1.7 Levaduras

Son hongos unicelulares, usualmente de forma ovalada, con estados vegetativos que se reproducen predominantemente por gemación o fisión, dando por resultado un crecimiento unicelular, aunque algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecer como micelio bajo condiciones ambientales apropiadas. Este grupo de microorganismos está incluido taxonómicamente en la División Eumycota y dadas sus características de reproducción sexual, se pueden ubicar en tres subdivisiones: Ascomycota, que comprende a levaduras que pueden formar esporas contenidas dentro de una asca; Basidiomycota, en donde los representantes forman esporas externas localizadas sobre basidios o esterigmas y Deuteromycota en donde se incluyen todas aquellas levaduras para las que no ha sido posible demostrar que presentan una fase sexual en su ciclo de vida (Ochoa y Vázquez-Juárez, 2004). Las levaduras registran una amplia distribución en un variado tipo de hábitats terrestres. Sin embargo, es poco lo que se sabe de las levaduras de ecosistemas acuáticos, particularmente del marino. También hay algunas levaduras que son capaces de

distribuirse en ambientes salinos no marinos y son altamente halofílicas o halotolerantes (Ochoa y Vázquez-Juárez, 2004).

En los ecosistemas acuáticos, la mayoría de las levaduras probablemente crecen en condiciones no óptimas, requiriendo para su desarrollo sitios de amplificación de las poblaciones como sedimentos, detrito y de manera importante, están asociadas a organismos acuáticos para su desarrollo (Sallenave-Namont *et al.*, 2000). Del salmón del atlántico se han aislado diferentes especies de levaduras, con cuentas de hasta 3×10^3 células/g de intestino. Las especies dominantes fueron *Debaryomyces hansenii*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula glutinis* (Andlid, 1995). La mayoría de las células en tránsito por el intestino de peces son eliminadas rápidamente debido al continuo flujo de agua, situación que pone en duda la presencia de una microflora normal en estos tejidos. Sin embargo, se ha demostrado que algunas especies de levaduras poseen mecanismos que les permite colonizar el intestino de peces y eventualmente amplificar la población (Andlid, 1995). Otros estudios más detallados han establecido el mecanismo de colonización, el cual parece estar mediado por la participación de adhesinas específicas y la hidrofobicidad típica de este tipo de células. Actualmente, hay un modelo que propone que las células tienen capacidad para cambiar rápidamente su fenotipo de superficie celular (hidrofóbico-hidrofílico) en respuesta a la disponibilidad de nutrimentos, lo que les confiere capacidad de crecer con componentes de la mucosa como única fuente de energía y establecer una relación estrecha a través del reconocimiento específico de ciertos componentes de la mucosa.

Dos aspectos han motivado la consideración del uso de levaduras como probióticos en acuicultura: primero, el difundido y probado efecto benéfico de levaduras en diversos modelos que incluyen al hombre; y segundo, la demostración de la presencia de levaduras en el tracto digestivo de peces con una alta capacidad de colonización. La levadura *Saccharomyces boulardii* es ampliamente utilizada en varios países de Europa en el tratamiento de enteritis infecciosa aguda, en desórdenes producidos por el uso de antibióticos y colitis asociadas a infecciones por *Clostridium difficile*. El género *Candida* sp. se utiliza en el cultivo a gran escala de rotíferos. Diversos mecanismos del efecto benéfico han sido descritos y se sugiere que la

expresión de enzimas intestinales es favorecida por poliaminas secretadas por el organismo (Ochoa y Vázquez-Juárez, 2004).

El presente trabajo de tesis evaluó el efecto de cepas de bacterias ácido lácticas y una levadura aisladas del tracto digestivo de *O. niloticus* a través del crecimiento y supervivencia de los organismos en cultivo.

2. ANTECEDENTES

El uso de bacterias ácido lácticas y levaduras es común en animales terrestres ofreciendo beneficios en la salud y en el crecimiento. Los probióticos generalmente incluyen bacterias y levaduras como *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Saccharomyces*. En acuicultura son adicionadas a los sistemas de cultivo para mejorar la calidad de agua, y/o inhibir los patógenos presentes en el agua, además de incrementar la producción. De esta manera “Probiótico”, “probionte”, “bacteria probiótica” o “bacteria benéfica”, son los términos usados para nombrar a las bacterias probióticas.

Jiravanichpaisal *et al.* (1997) usaron *Lactobacillus* sp. como bacteria probiótica en el camarón tigre *Penaeus monodon* para tratar la vibriosis y la enfermedad de la mancha blanca evaluando el crecimiento de algunas bacterias probióticas y su supervivencia a 20 ‰ en agua de mar al menos por 7 días. La actividad de inhibición de dos cepas de *Lactobacillus* sp. contra *Vibrio* sp., *E. coli*, *Staphylococcus* sp. y *Bacillus subtilis* fue determinada demostrando la posibilidad de usar *Lactobacillus* contra patógenos en el cultivo de camarón.

Byun *et al.* (1997) utilizaron una cepa de *Lactobacillus* para investigar la resistencia a ácidos y bilis además de la actividad antagonista contra microorganismos patógenos de peces como *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pasteurella piscida*, *Streptococcus faecalis* y *Aeromonas hydrophila*, la cual identificó tentativamente como *Lactobacillus* sp. DS-12. Esta bacteria mostró resistencia a los ácidos y la bilis de los peces además de resistencia a sales y mostrando una actividad antagonista contra los patógenos, reflejando una ganancia en peso de *Paralichthys olivaceus*, en condiciones de cultivo.

Direkbusarakom *et al.* (1997) aislaron dos cepas de *Vibrio* sp. NICA 1030 y NICA 1031 del camarón tigre de granja las que mostraron una actividad antiviral contra los virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y *Oncorhynchus masou*, con inhibición entre el 62 % y 99 %, respectivamente.

Avendaño-Herrera *et al.* (2001) evaluaron la factibilidad de establecer las bacterias benéficas 11, C33 y 77 en el tracto digestivo de reproductores de *Argopecten purpuratus* determinando la infección gonadal de los organismos tratados, utilizando

como vector de incorporación cultivos axénicos de *Isochrysis galbana*. Los resultados de ingestión en adultos de *A. purpuratus* revelaron la ingestión de las cepas 11 y C33 en un 92 % ($p < 0.05$).

Lara-Flores *et al.* (2002) compararon el efecto de un promotor de crecimiento convencional y un probiótico comercial en tilapia *Oreochromis niloticus* obteniendo un mejor crecimiento con la cepa probiótica. La inclusión de una mezcla probiótica de las bacterias *Streptococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus* con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* SC 47 en dietas para la tilapia sometida a estrés mejoró su crecimiento. También evaluaron el nivel óptimo de la inclusión de una levadura probiótica (*Saccharomyces cerevisiae* SC 47) en forma inactiva y activa como promotor del crecimiento para la tilapia *O. niloticus*, pero no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Guevara *et al.* (2003) evaluaron el efecto de la inclusión de 3 concentraciones de un probiótico comercial en el alimento balanceado para juveniles de la tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Los parámetros productivos evaluados durante 45 días en el cultivo fueron: la tasa de crecimiento, la tasa de conversión de alimento y la tasa de mortalidad. Los resultados mostraron un efecto positivo para la fase de precría.

Günther y Jiménez-Montealegre (2004) determinaron el efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de juveniles de *Oreochromis niloticus*. En el primer experimento, el crecimiento y la utilización del alimento fueron menores en los organismos tratados con el probiótico sin diferencias significativas. En el segundo experimento, la tasa específica de crecimiento se redujo y el factor de conversión alimenticia fue mayor con la adición de la bacteria a la dieta; con una diferencia significativa del 94 %, apenas por debajo del 95 % que se utiliza por convención estadística.

Carnevali *et al.* (2004) aislaron una cepa de *Lactobacillus fructivorans* (AS17B) del intestino del pez marino (*Sparus aurata*) y otra aislada de heces de humano que se usó como control de *Lactobacillus plantarum* (906). Ambas cepas fueron suministradas durante el desarrollo de este pez usando *Brachionus plicatilis* y/o *Artemia salina* y alimento seco como vectores. A los 35 días, *L. fructivorans* no colonizó el intestino, pero sí lo hizo *L. plantarum*. A los 66 días *L. fructivorans* se presentó junto con el

control, además cuando se dieron las condiciones ambientales favorables, ocurrió la metamorfosis gastrointestinal y se observó la competencia entre *L. plantarum* y *L. fructivorans*. Finalmente, a los 90 días *L. plantarum* fue desplazado por *L. fructivorans*, cuya proliferación fue significativamente más alta con respecto al control. La administración de probióticos redujo significativamente la mortalidad en larvas y juveniles de este pez.

Rodríguez-Méndez *et al.* (2006) evaluaron el crecimiento y supervivencia de juveniles de *Ariopsis bonillai* mediante el suministro de 4 dietas de alimentación con pescado fresco, concentrado comercial con 35 % de proteína y concentrado comercial con dos tipos de probióticos. Los autores encontraron una mayor ganancia en peso y talla con la mezcla probiótica de *Lactobacillus*, *Bacillus natto* y *Saccharomyces* con respecto a los otros tratamientos.

Balcázar *et al.* (2007) realizaron un estudio *in vitro* en cinco bacterias ácido lácticas para ser utilizadas como candidatos probióticos en peces, basados en la propiedad de las cepas de adhesión competitiva y de producción de sustancias que actúan contra algunos patógenos de peces. Los investigadores notaron una reducción de la adhesión en todas las cepas patogénicas analizadas al utilizar tres de las cepas ácido lácticas (*Lactococcus lactis* Subs. *Lactis* CLFP100, *Lactococcus lactis* Subs. *Cremoris* CLFP102 y *Lactobacillus curvatus* CLFP150). Sólo los patógenos de peces, *Renibacterium salmoninarum* y *Flavobacterium psychrophilum* no fueron inhibidos por las cepas ácido lácticas. La producción de compuestos antagónicos por las cepas lácticas analizadas fue observada al menos contra una de las cepas patogénicas indicadoras. Basándose en la adhesión al mucus, exclusión competitiva y supresión de crecimiento de patógenos, las cepas seleccionadas podrían ser consideradas para futuros experimentos en peces y son una nueva alternativa al uso de agentes terapéuticos.

Apún-Molina (2007) determinó el efecto de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* en condiciones de laboratorio utilizando altas densidades (200 organismos/m³) y temperaturas subóptimas para el cultivo, encontrando un resultado positivo en el crecimiento, pero negativo en su supervivencia, en su tratamiento con lactococos.

3. JUSTIFICACIÓN

Sinaloa ocupa el cuarto lugar a nivel nacional en producción de tilapia en embalses como presas y además con un gran número de proyectos en marcha con el cultivo tecnificado en jaulas flotantes y granjas; *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp. son las tilapias más cultivadas en todo el mundo, siendo la primera la más cultivada en el estado de Sinaloa; y la segunda especie con un gran auge por la calidad de su filete, hoy en día se busca tener una mayor producción reduciendo el tiempo de cultivo alcanzando tallas de comercialización en el menor tiempo posible. El cultivo de tilapia tiene una gran importancia en la producción de empleos directos e indirectos en el estado con beneficio para miles de familias. Los probióticos son una estrategia de control bacteriológico que no daña el ambiente ni la salud humana, la importancia de estos radica en que ha sido comprobado su uso en la salud humana y de organismos domesticados, durante los últimos 15 años se ha ampliado su uso en el cultivo de camarón y peces como la tilapia, con los siguientes beneficios:

1. Reducir la mortalidad.
2. Ganancia en peso y talla en corto plazo.
3. Reducción de las poblaciones de microorganismos patógenos.
4. Mejoramiento de la nutrición.
5. Incremento de la digestión.

Por lo anteriormente dicho, es de gran importancia estudiar nuevas alternativas para aumentar la producción y mejorar el cultivo de la tilapia en la región, sin afectar al ambiente y beneficiando a los productores al obtener un producto en menor tiempo posible y de buena calidad.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial probiótico de las cepas de bacterias ácido lácticas y levaduras en el crecimiento y supervivencia de alevines de tilapia *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp. en diferentes fases de su ciclo de cultivo.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1.- Evaluar el crecimiento en peso, la tasa de crecimiento específico y la supervivencia final de los organismos tratados con una mezcla probiótica.

4.1.2.- Analizar las condiciones del cultivo de tilapia en relación con las bacterias totales y vibrios totales.

4.1.3.- Identificar molecularmente las cepas de bacterias ácido lácticas, utilizando secuencias conservadas del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S.

5. HIPÓTESIS

El alimento adicionado con bacterias ácido lácticas y una levadura con potencial probiótico mejora la supervivencia y la ganancia en peso de *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación del alimento con bacterias ácido lácticas (BAL) y la levadura

El trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, en el Laboratorio de Acuicultura. Se probaron cuatro cepas bacterianas pertenecientes al grupo de los lactococos (Lta2, Lta6, Lta8 y Lta10) y una levadura (Lt6), previamente aisladas, caracterizadas y probadas en *Oreochromis niloticus* en nuestro laboratorio (Apún- Molina, 2007). La incorporación de la mezcla probiótica de 4 cepas de BAL y la levadura en el alimento balanceado (Silver Cup[®], México, 45 % de proteína) se hizo por medio del aditivo attractante y ligante Dry Oil[®], (Innovaciones Acuícolas S.A. de C.V., México), siguiendo las instrucciones del fabricante. También se impregnó de Dry Oil[®] (DO) al alimento para el control sin bacterias. Las BAL y la levadura fueron cultivadas en medio MRS y se agregaron en aproximadamente 40 ml de DO al alimento por aspersion, con una concentración determinada de UFC/g. El alimento con probióticos se secó a temperatura ambiente durante 5 h, revolviendo manualmente cada hora. Se preparó alimento con bacterias para 10 días y se almacenó en el refrigerador a 4 °C. Las bacterias utilizadas mantienen su viabilidad en el alimento durante 14 días, para esto se tomaron muestras del alimento (50 mg) y se sembraron en medio MRS agar en cajas Petri, incubadas por 24 h a 37 °C y posteriormente se hizo un conteo de UFC/g.

6.2 Experimento 1: Bioensayo con *Oreochromis* sp.

El experimento tuvo una duración de cuatro meses (del 4 de mayo al 30 de Agosto de 2007) y se realizó en tanques circulares de plástico con 1200 L de agua potable. Los organismos que se utilizaron se compraron a la empresa Aquatic Depot, S.A. de C.V. Los alevines de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) estaban recién hormonados (aprox. 35 días de edad y 0.1 ± 0.03 g de peso). La densidad de siembra fue de 40 animales por tanque. A los 30 días del cultivo se hizo un desdoble del 50 %, dejando 20 organismos por tanque.

El experimento consistió de 4 tratamientos: 1) peces alimentados con alimento comercial + DO; 2) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g); 3) peces alimentados con alimento comercial + DO +

mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g) y 4) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El recambio de agua fue del 80 % semanal. La alimentación se realizó diariamente, los organismos se alimentaron con una ración diaria inicial equivalente al 15 % de su peso corporal dividida en tres subraciones (09:00, 13:00 y 17:00 h) y luego se disminuyó el porcentaje de manera semanal de acuerdo a la tabla de alimentación de Purina. (Anexo 1).

6.3 Experimento 2: Bioensayo con *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp.

El experimento tuvo una duración de tres meses (del 08 de septiembre al 08 de diciembre de 2007) y se realizó en tanques circulares de plástico con 1200 L de agua potable. Los alevines de tilapia negra (*Oreochromis niloticus*) y tilapia roja (*Oreochromis* sp.) que se utilizaron se compraron hormonados a la empresa Aquatic Depot S.A. de C.V. La edad aproximada de las rojas era de 35 d y su peso de 2.54 ± 0.22 g. La edad aproximada de las negras era de 45 d y un peso promedio de 4.8 ± 0.49 g. Antes de iniciar el experimento, los alevines (1250 rojas y 1250 negras) se mantuvieron en dos tinajas de 1000 L, durante 45 d para su aclimatación y para que alcanzaran los 75 d de edad. Al iniciar el experimento las tilapias rojas tenían aprox. 80 d y 4.09 g en promedio y las negras 90 d y 6.12 g en promedio. La densidad de siembra fue de 80 animales por tanque, 40 negras y 40 rojas. A los 30 días del cultivo se hizo un desdoble del 50 %, quedando 20 rojas y 20 negras por tina.

El experimento consistió en 4 tratamientos: 1) peces alimentados con alimento comercial + DO; 2) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; 3) peces alimentados con alimento comercial + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d y 4) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 días del experimento. En los tratamientos 3 y 4, en los días cuando no se alimentaron con alimento más bacterias, se alimentaron con alimento + DO. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El recambio de agua fue del 80 % semanal. Los organismos se alimentaron con una ración diaria inicial equivalente al 15 % de su peso corporal dividida en 3 subraciones (09:00, 13:00 y 17:00 horas), disminuyendo el porcentaje de

manera semanal de acuerdo a la tabla de alimentación de Purina. En este experimento fue posible utilizar ambas especies por disponibilidad con el proveedor Aquatic Depot S.A. de C.V., además se dependía del mejor tratamiento del primer experimento.

6.4 Evaluación del peso, supervivencia y tasa de crecimiento específico (TCE)

Para evaluar la ganancia en peso de ambos experimentos, se pesaron los organismos al inicio y mensualmente, obteniendo un promedio para cada tratamiento.

La supervivencia se registró al final del experimento, la cual se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Supervivencia} = (\text{PI} / \text{PF}) * 100$$

Donde: PF= peces finales

PI = peces iniciales

La tasa de crecimiento específico se calculó de la siguiente manera:

$$\text{TCE} = 100 (\text{LN } W_2 - \text{LN } W_1) / T$$

Donde: W_2 es el peso final, W_1 el peso inicial y T es el número de días de cultivo.

6.5 Monitoreo de vibrios totales y bacterias heterótrofas totales durante el experimento

Los conteos de bacterias totales y vibrios totales en el agua en todos los tratamientos se realizaron al inicio y mensualmente. Las bacterias se contaron haciendo diluciones seriadas decimales colocando 100 μl de agua de cada tina en placas con TS agar (por duplicado). Los vibrios totales se contaron haciendo diluciones seriadas decimales colocando 100 μl de agua en placas con TCBS agar (por duplicado) o colocando los 100 μl en las placas sin hacer las diluciones.

6.6 Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y nutrientes

La toma de las variables fisicoquímicas (temperatura, oxígeno disuelto y pH) se realizó semanalmente en todos los tratamientos desde el primer día de siembra. La temperatura se registró con un termómetro de máximos y mínimos. Para el oxígeno se usó un oxímetro YSI. El pH se determinó con un potenciómetro marca Hanna.

La determinación de los nutrientes (amonio, nitritos y nitratos) se realizó mensualmente en todos los tratamientos desde el primer día de siembra por métodos químicos ya estandarizados internacionalmente (Strickland y Parsons, 1972).

6.7 Identificación de las bacterias ácido lácticas (BAL)

6.7.1 Extracción de ADN bacteriano con el kit Bactozol y DNAzol (MRC, Cincinnati, OH., USA)

Se utilizaron 4.5 ml de cultivo bacteriano para obtener aproximadamente 40 µg de ADN. La suspensión bacteriana se centrifugó a 6,000 x g por 4 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el pellet resultante se resuspendió en 100 µl de solución enzimática Bactozol 1X, agitando con el vórtex para homogenizar la suspensión. La suspensión bacteriana se lisó incubando a 50 °C por 45 min. para bacterias Gram (+). Una suspensión turbia puede indicar una lisis incompleta. Para mejorar la lisis celular y la recuperación de ADN, se extendió el tiempo de incubación por 30 min más y se elevó la temperatura de incubación a 55 °C. Se centrifugó a 10,000 x g por 7 min a temperatura ambiente y se colectó el sobrenadante. El ADN se precipitó adicionando 0.5 ml de etanol al 100 % por 1 ml de DNAzol usado para el aislamiento. Las muestras se mezclaron invirtiendo los tubos entre 5 y 8 veces y almacenando a temperatura ambiente por 3 min. El DNAzol y el etanol se mezclaron bien para formar una solución homogénea. Se centrifugó a 3,000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El ADN se colocó en otro tubo estéril. El ADN precipitado se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 75 %. En cada lavado, se suspendió el ADN en etanol invirtiendo los tubos entre 3 y 6 veces. Se centrifugó a 3,000 x g por 5 min a temperatura ambiente, luego se removió el etanol con la pipeta y se dejó secar. Para suspender el ADN, se disolvió en 30 µl de agua ultra pura y se almacenó a -20 °C.

6.7.2 Amplificación con la PCR

La identificación de las cepas se hizo mediante la secuenciación del ADN ribosomal 16S. Para la amplificación del ADNr 16S se utilizaron oligonucleótidos (iniciadores) diseñados en base a secuencias conservadas del gen que codifica para la subunidad del ADN ribosomal 16S (Sauer *et al.*, 2005). Los oligos que se utilizaron para la PCR fueron UNI_OL out (sentido) 5'-GTGTAGCGGTGAAATGCG-3' y UNI_OR out (contrasentido) 5'-ACGGGCGGTGTGTACAA-3'. El tamaño esperado del fragmento de la PCR es de 709 pb. La mezcla de reacción para la PCR sencilla se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 ml en un volumen total de 25 μ l, de la manera siguiente: 17 μ l de H₂O; 2.5 μ l de búfer de reacción 10X; 1.0 μ l de dNTPs (10 mM cada uno; Bioline); 1.0 μ l de cada oligo (100 μ M) y 0.5 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l; *Bioline*). Se añadieron 2 μ l del ADN aislado a la mezcla de reacción como ADN molde. La amplificación se realizó en un termociclador *Biometra (Whatmann)* usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min para el anillado del par de primers de la PCR sencilla y 72 °C por 1 min para la extensión final. Los ciclos fueron repetidos 30 veces. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 100 – 12000 pb) en un gel de agarosa al 1 % (electroforesis en gel), teñido con bromuro de etidio. La visualización del gel se hizo con luz UV.

6.7.3 Clonación y secuenciación del producto amplificado

Para realizar la clonación molecular, se corrió un gel de agarosa al 1 % del producto de la PCR, se cortaron bandas únicas por muestra, el ADN contenido en la banda se purificó empleando el kit comercial *Gen Clean (Gibco-BRL)*.

Los ADN amplificados se clonaron con el kit pGEM- Teasy vector[®] (*Promega*) el cual consiste en lo siguiente:

Se adicionaron 3 μ l del producto de PCR a clonar ya limpio, se adicionó 5 μ l del buffer de ligación 2X, 1 μ l de pGEM-Teasy vector, 1 μ l de DNA ligasa, se incubó a 37 °C por 2 h y se dejó toda la noche a 4 °C. La transformación se hizo en células de *Escherichia coli* electro competentes. Las células transformantes fueron seleccionadas en cajas Petri con LB-agar conteniendo ampicilina (50 μ g/ml), X-Gal (40 μ g/ml) y IPTG

(0.5 mM). Un solo clon fue seleccionado por cada cepa. Los plásmidos recombinantes fueron aislados mediante el kit GenElute HP Plasmid Maxiprep (*Sigma-Aldrich*). Los plásmidos se digirieron con la enzima *EcoRI* y se visualizó en un gel de agarosa al 1.5 % para confirmar la presencia del fragmento insertado. Los fragmentos de ADN obtenidos se mandaron a secuenciar al laboratorio de secuenciación del CINVESTAV-Irapuato.

Finalmente, la secuencia obtenida se comparó con las secuencias nucleotídicas reportadas en el banco genómico (GeneBank database) mediante el software BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Las alineaciones de las secuencias se realizaron mediante el software *Clustal W* de la EBI (European Bioinformatic Institute, Reino Unido, www.ebi.ac.uk) que forma parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

6.7.4 Criterios de identificación

La identificación a nivel de especie se aceptó cuando la secuencia obtenida obtuvo una similitud de ≥ 99 % con respecto a la secuencia de la cepa prototipo en el GenBank. La identificación a nivel de género se aceptó cuando la secuencia obtenida obtuvo una similitud de ≥ 95 % con respecto a la secuencia de la cepa prototipo en el GenBank de acuerdo a los criterios utilizados en el programa BLAST-N, la identificación no será aceptada cuando la secuencia obtenida tenga una similitud menor del 95 % con respecto a la secuencia de la cepa prototipo en el GenBank.

6.8 Análisis estadístico

El peso, supervivencia y la tasa de crecimiento específica se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar las diferencias entre tratamientos y controles. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes. Cuando existieron diferencias significativas, se utilizó un análisis *a posteriori*, usando la prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($p < 0.05$) (Daniels 1979; Zar, 1999).

7. RESULTADOS

7.1 Primer experimento: evaluación del peso, tasa de crecimiento específico y supervivencia final de *Oreochromis sp.*

7.1.1 Evaluación del crecimiento en peso de *Oreochromis sp.*

Los resultados (Fig. 1) muestran que al final del experimento (día 120), el peso promedio de los peces alimentados con alimento comercial + DO fue de 99.52 ± 2.59 g, los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) pesaron 97.26 ± 3.12 g, los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g) pesaron 96.64 ± 4.52 g, mientras que los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g) pesaron 97.36 ± 4.09 g. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

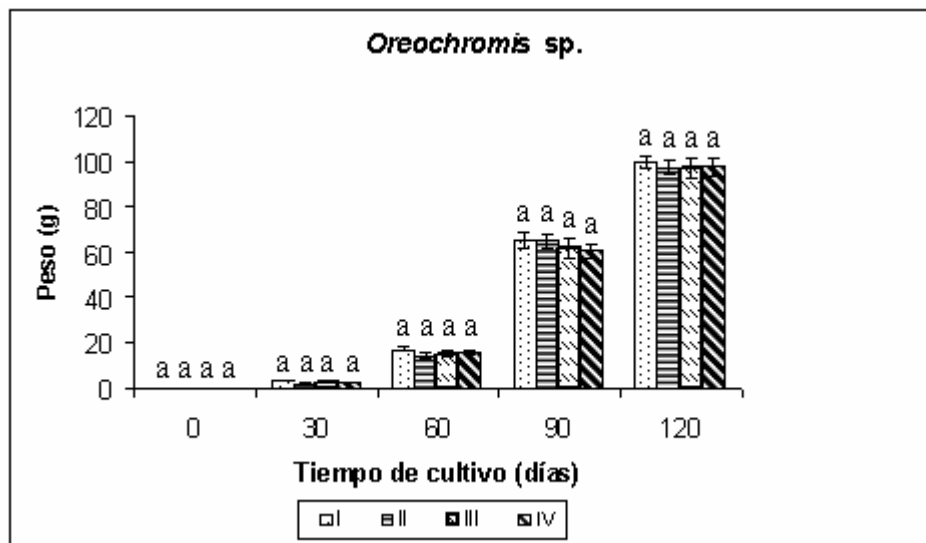


Figura 1. Peso promedio de *Oreochromis sp.* A los días 0, 30, 60, 90, y 120. Tratamientos: I = peces alimentados con alimento comercial + DO, II = peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), III = peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g), IV = peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g). La grafica muestra el promedio \pm barras de error = error estándar. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

7.1.2 Tasa de crecimiento específico (TCE)

Los resultados de la TCE (Fig. 2) muestran que los peces alimentados con el tratamiento I) alimento comercial + DO tienen una TCE de 6.01 ± 0.04 , los peces alimentados con el tratamiento II) alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), 5.99 ± 0.08 , los peces alimentados con el tratamiento III) alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g), muestra una TCE= 5.98 ± 0.16 y los peces alimentados con el tratamiento IV) alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g) poseen una TCE de 5.99 ± 0.05 . No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

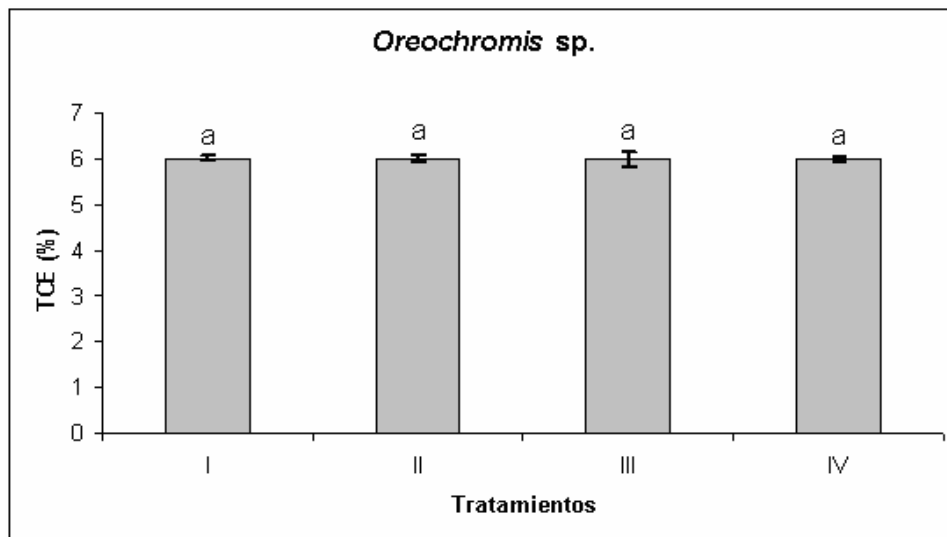


Figura 2. Tasa de crecimiento específico del cultivo de *Oreochromis* sp. Tratamientos: I = Peces alimentados con alimento comercial + DO, II = Peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), III = Peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g), IV = Peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). La grafica muestra el promedio \pm barras de error = desviación estándar.

7.1.3 Evaluación de la supervivencia final

La supervivencia final fue de 92.1 % en los peces alimentados con alimento comercial + DO, 76.5 % en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), 85.7 % en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g) y 82.6 % en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g) (Fig. 3).

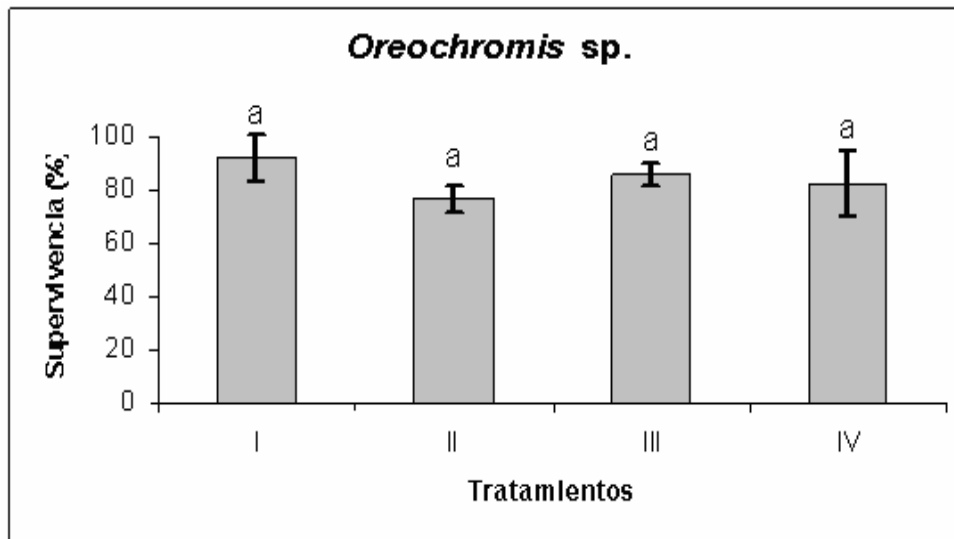


Figura 3. Supervivencia final de *Oreochromis* sp. Tratamientos: I = peces alimentados con alimento comercial + DO, II = peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), III = peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^6 UFC/g), IV = peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^7 UFC/g). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). La grafica muestra el promedio \pm barras de error = desviación estándar.

7.1.4 Análisis bacteriológico

La concentración de las bacterias totales, medidas mensualmente, presentó gran variabilidad, con valores promedio entre 2042 y 2204 UFC/ml. No se encontraron vibrios presentes en el agua del sistema de cultivo (Cuadro 1). El cuadro muestra el promedio de los muestreos mensuales y su desviación estándar. Duración del cultivo 120 días.

Cuadro 1.- Resultados de las bacterias totales y vibrios totales presentes en el agua de los tanques de cultivo.		
Tratamientos	Bacterias Totales (UFC/ml)	Vibrios Totales (UFC/ml)
I	2042±47	0
II	2088±225	0
III	2204±667	0
IV	2204±237	0

7.1.5 Parámetros fisicoquímicos y nutrientes

Los resultados muestran que durante los 120 días del experimento, los valores del pH estuvieron entre 8.0 y 8.6, muy cerca del valor crítico; los de la temperatura entre 25.4 y 27.4 °C, el oxígeno disuelto entre 7.7 y 8.7 mg/ml, el amonio entre 0.43 y 0.45 mg/ml, los nitritos entre 0.20 y 0.25 mg/ml estos antes mencionados dentro los intervalos óptimos y los nitratos entre 0.68 y 0.78 mg/ml, muy por encima del valor crítico (Cuadro 2). En el cuadro se muestran los valores promedios de todos los muestreos ± desviación estándar.

Cuadro 2. Valores promedio del pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura, amonio, nitritos y nitratos en el agua del sistema de cultivo.						
Tratamientos	pH	T (°C)	OD (mg/ml)	Amonio (mg/ml)	Nitritos (mg/ml)	Nitratos (mg/ml)
I	8.0±0.05	25.4±0.21	7.7±0.11	0.44±0.27	0.20±0.01	0.70±0.23
II	8.6±0.02	26.5±0.09	8.5±0.22	0.45±0.27	0.20±0.01	0.78±0.11
III	8.6±0.01	26.1±0.85	8.2±0.26	0.44±0.29	0.25±0.08	0.69±0.24
IV	8.6±0.00	27.4±0.30	8.7±0.20	0.43±0.30	0.22±0.04	0.68±0.25
Intervalos óptimos	6.5 – 7.5	24 - 29	3 – 9.5	< 0.1	< 0.6	< 0.25
Valores críticos	< 6 ->9	29 - 32	< 1.0	> 0.1	> 2.0	> 0.25

7.2 Segundo experimento: evaluación del peso, tasa de crecimiento específico y supervivencia final de *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis* sp.

7.2.1 Evaluación del crecimiento en peso de *Oreochromis niloticus*

Los resultados (Fig. 4) muestran que al final del experimento (día 92), el peso promedio de los peces alimentados con alimento comercial + DO fue de 80.6 ± 2.71 g, los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente pesaron en promedio 89.7 ± 2.39 g, los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) cada 10 días pesaron en promedio 86.2 ± 2.62 g, mientras que los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) durante los primeros 10 días pesaron en promedio 84.8 ± 2.41 g. Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento I y II sólo al final del experimento (día 92).

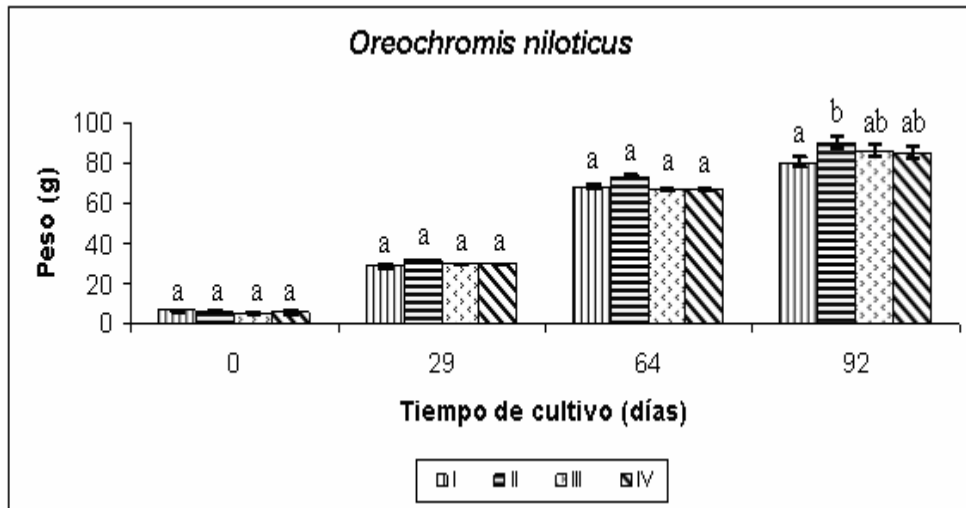


Figura 4. Peso promedio de *Oreochromis niloticus* en el día 0, 29, 64, y 92. Tratamientos: I) peces alimentados con alimento comercial + DO; II) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; III) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d y IV) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La grafica muestra el promedio \pm barras de error = error estándar.

7.2.2 Evaluación del crecimiento en peso de *Oreochromis sp.*

Los resultados (Fig. 5) muestran que al final del experimento (día 92), el peso promedio de los peces alimentados con alimento comercial + DO fue de 40.9 ± 1.88 g, los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente pesaron en promedio 46.8 ± 2.30 g, los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^4 UFC/g) cada 10 días pesaron en promedio 48.0 ± 1.72 g, mientras que los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (1×10^4 UFC/g) durante los primeros 10 días pesaron en promedio 45.98 ± 1.86 g. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). El crecimiento en peso del tratamiento III fue significativamente mayor que el tratamiento I sólo al final del experimento.

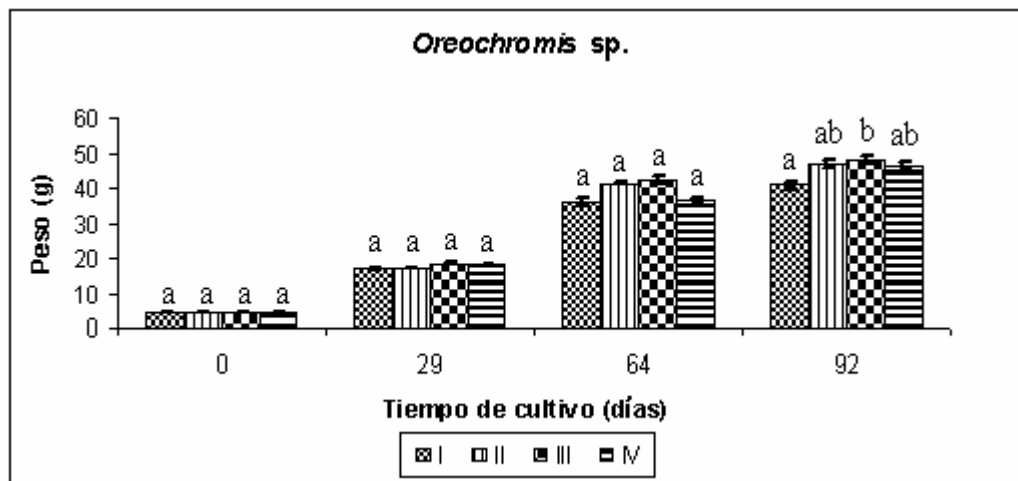


Figura 5. Peso promedio de *Oreochromis sp.* en el día 0, 29, 64, y 92. Tratamientos: I) peces alimentados con alimento comercial + DO; II) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; III) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d y IV) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La grafica muestra el promedio \pm barras de error = error estándar.

7.2.3 Tasa de crecimiento específico de *Oreochromis niloticus*

La TCE (Fig. 6) de *O. niloticus* en los peces alimentados con alimento comercial + DO fue de 2.34 ± 0.05 , en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente fue de 2.47 ± 0.03 , en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) cada 10 d fue de 2.61 ± 0.03 y en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d fue de 2.44 ± 0.01 . Hubo diferencias significativas entre los tratamientos II y III con respecto al tratamiento I y entre ellos mismos ($p < 0.05$).

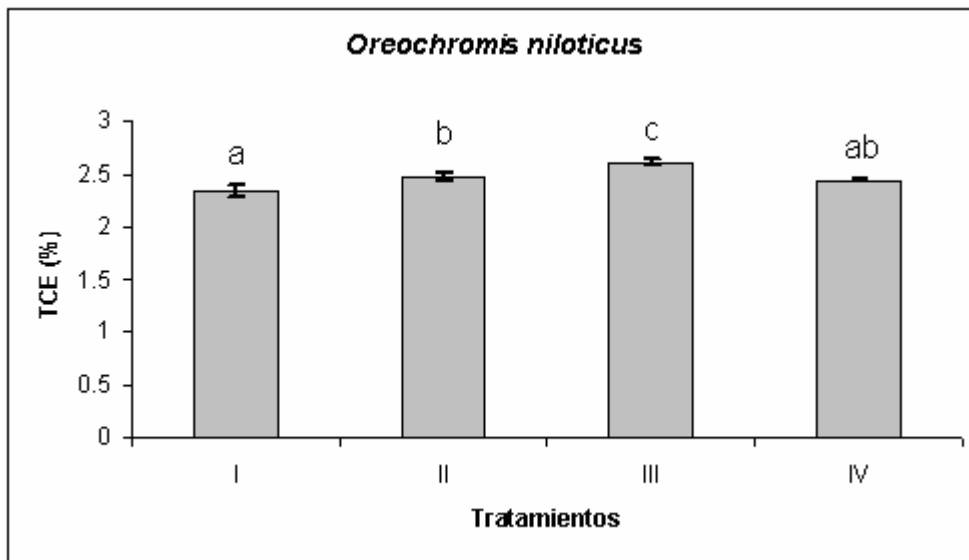


Figura 6. Tasa de Crecimiento Específico del cultivo de *Oreochromis niloticus*. Tratamientos: I) peces alimentados con alimento comercial + DO; II) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; III) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d y IV) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de error = promedio \pm desviación estándar.

7.2.4 Tasa de crecimiento específico en *Oreochromis sp.*

La TCE (Fig. 7) de *O. niloticus* en los peces alimentados con alimento comercial + DO tuvo un promedio de 2.18 ± 0.03 , en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente fue de 2.32 ± 0.04 , en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) cada 10 d fue de 2.34 ± 0.02 y en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) sólo durante los primeros 10 d, la tasa fue de 2.29 ± 0.07 . Hubo diferencias significativas en los tratamientos II y III con respecto al tratamiento I ($p < 0.05$).

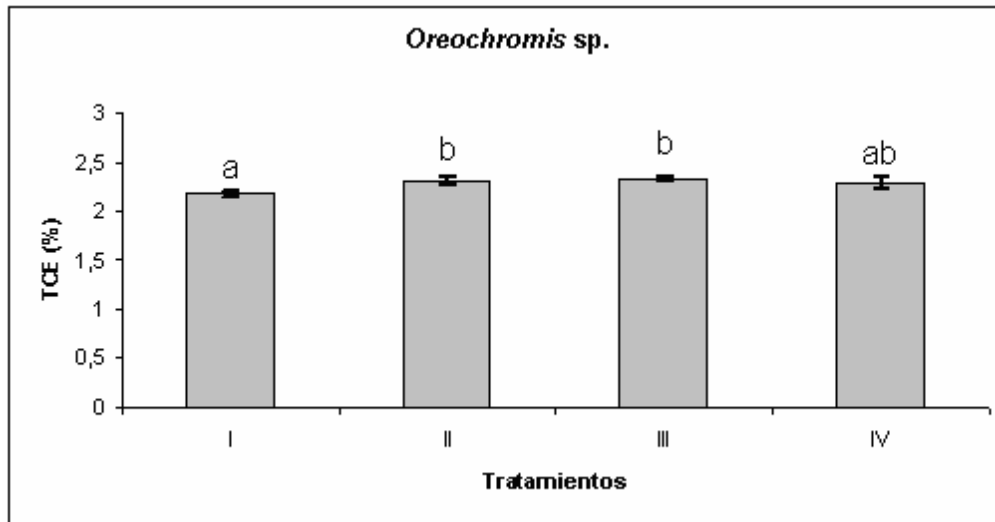


Figura 7. Tasa de Crecimiento Específico del cultivo de *Oreochromis sp.* Tratamientos: I) peces alimentados con alimento comercial + DO; II) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; III) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d y IV) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La grafica muestra el promedio \pm barras de error= desviación estándar.

7.2.5 Supervivencia de *Oreochromis niloticus*

La supervivencia final de *O. niloticus* fue del 100 % en todos los tratamientos. Por este motivo no se presenta ninguna figura.

7.2.6 Supervivencia de *Oreochromis* sp.

La supervivencia final (Fig. 8) de *Oreochromis* sp. fue de 91.6 % en los peces alimentados con alimento comercial + DO, en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente, fue en promedio 96.6 %, en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) cada 10 días fue en promedio 88.3 % y en los peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 días fue en promedio de 95 %. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

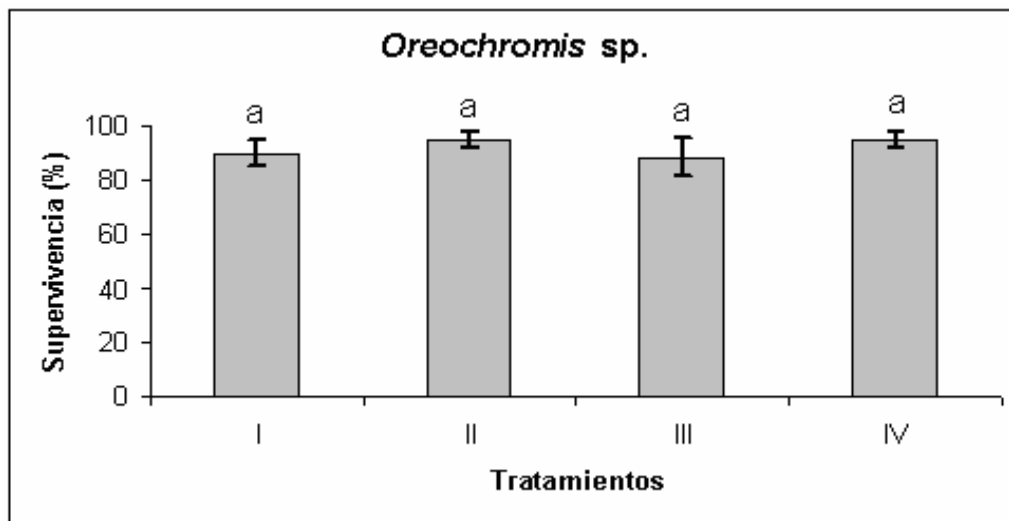


Figura 8. Supervivencia final de *Oreochromis* sp. En el segundo experimento. Tratamientos: I) peces alimentados con alimento comercial + DO; II) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g) diariamente; III) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), cada 10 d y IV) peces alimentados con alimento comercial + DO + mezcla probiótica (5×10^4 UFC/g), sólo durante los primeros 10 d. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). La grafica muestra el promedio \pm barras de error = desviación estándar.

7.2.7 Análisis bacteriológico

La concentración de las bacterias totales y vibrios totales (Cuadro 3) en el agua de los sistemas de cultivo presentó valores promedio entre 6795 y 19887 UFC/ml para bacterias totales y entre 13 y 26 UFC/ml para vibrios totales. Duración del cultivo = 92 días. El cuadro muestra el promedio \pm desviación estándar de los muestreos mensuales.

Cuadro 3. Resultados de la presencia de bacterias totales y vibrios totales presentes en el agua de los tanques de cultivo.		
Tratamientos	Bacterias totales (UFC/ml)	Vibrios totales (UFC/ml)
I	19887 \pm 23	26 \pm 28
II	15541 \pm 3.89	41 \pm 44
III	6795 \pm 4.94	26 \pm 28
IV	13995 \pm 0.40	13 \pm 4

7.2.8 Parámetros fisicoquímicos y nutrientes

En el cuadro 4 se muestra el promedio \pm desviación estándar de los muestreos mensuales del experimento, los valores del pH estuvieron entre 8.1 y 8.3 cerca del valor crítico; los de la temperatura entre 25.0 y 25.2 °C, el oxígeno disuelto entre 7.6 y 8.3 mg/ml dentro del rango óptimo; el amonio entre 0.9 y 2.4 mg/ml; los nitritos entre 0.08 y 0.4 mg/ml y los nitratos entre 0.5 y 0.7 mg/ml, éstos últimos 3 parámetros muy por encima del valor crítico.

Cuadro 4. Resultados de los valores de pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura, amonio, nitritos y nitratos en el agua del sistema de cultivo.						
Tratamientos	pH	T (°C)	OD (mg/ml)	Amonio (mg/ml)	Nitritos (mg/ml)	Nitratos (mg/ml)
I	8.3 \pm 0.03	25.1 \pm 4.0	8.3 \pm 0.6	2.4 \pm 2.5	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3
II	8.1 \pm 0.03	25.0 \pm 0.1	7.7 \pm 1.5	1.3 \pm 1.2	0.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3
III	8.2 \pm 0.09	25.0 \pm 0.1	7.6 \pm 0.9	1.0 \pm 0.2	0.08 \pm 0.07	0.5 \pm 0.2
IV	8.2 \pm 0.04	25.2 \pm 0.1	8.0 \pm 0.7	0.9 \pm 0.3	0.1 \pm 0.08	0.5 \pm 0.2
Intervalos óptimos	6.5 – 7.5	24 - 29	3 – 9.5	< 0.1	< 0.6	< 0.25
Valores críticos	< 6 ->9	29 - 32	< 1.0	> 0.1	> 2.0	> 0.25

7.3 Identificación de las bacterias ácido lácticas

7.3.1 Amplificación con la PCR

En la figura 9 se aprecia el fragmento 16S ADNr de las cepas Lta2, Lta6, Lta8 y Lta10 con un tamaño esperado de 709 pb que se obtuvo de la amplificación con la técnica de la PCR.

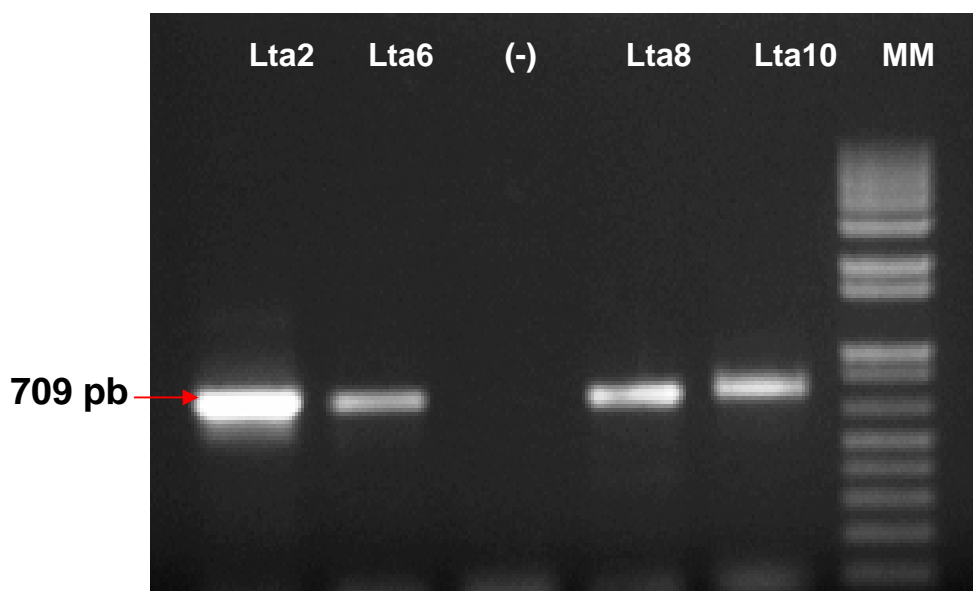


Figura 9. El gel de agarosa muestra los productos amplificados (709 pb) de la PCR. Carriles 1, 2, 4 y 5, cepas Lta2, Lta6, Lta8 y Lta10, respectivamente. Carril 3, control negativo. Carril 6, marcador de peso molecular (100 pb -1.2 kb, Invitrogen).

7.3.2 Clonación y secuenciación del producto amplificado

El fragmento amplificado se clonó con el kit pGEM- Teasy vector[®] (*Promega*) y para confirmar la clonación en las células electro competentes se realizó un corte con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar el fragmento del vector y de esta forma determinar cuales de nuestras células eran positivas para ser utilizadas en la extracción del fragmento y mandarlo a secuenciar. Solamente se logró clonar el ADN de la cepa Lta8 (Fig. 10).

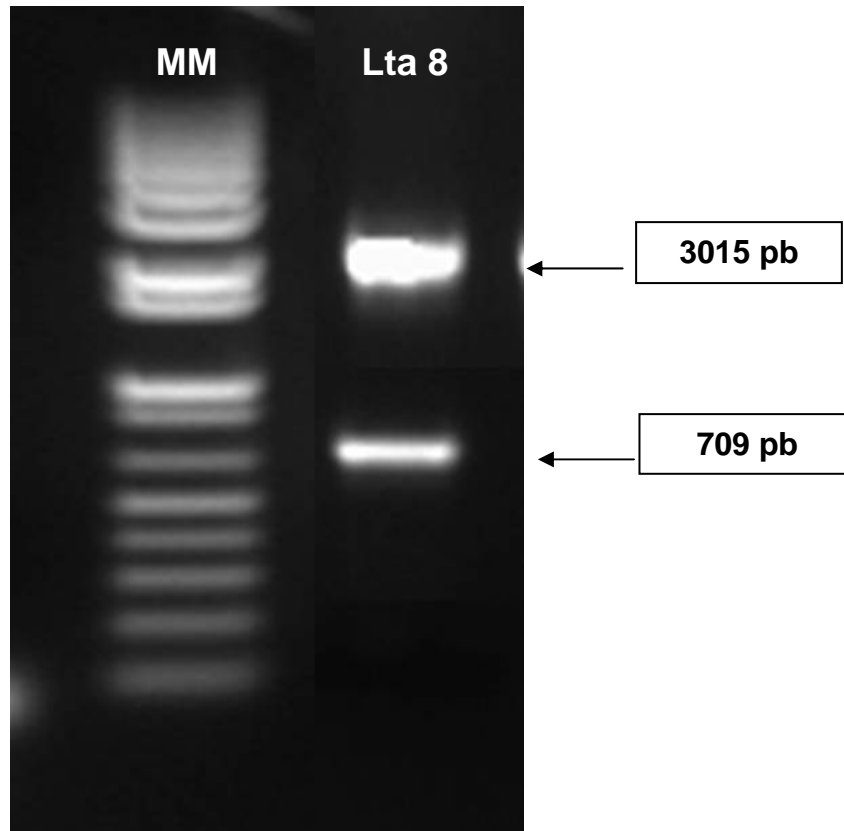


Figura 10. El gel de agarosa muestra el fragmento de la cepa Lta8 en el vector pGEM T-easy. Carril 2, el inserto de 709 pb y el vector de 3015 pb. Carril 1, marcador de peso molecular (100 pb -1.2 kb, Invitrogen).

7.3.3 Comparación de la secuencia de Lta8 con la base de datos de NCBI

En el cuadro 5 se muestra el resultado de la identificación obtenido a partir de la comparación de las secuencias del 16S ADNr de la base de datos del GenBank empleando el programa BLAST-N de la secuencia de 16S ADNr de la cepa Lta8 (Anexo 3). El *score* presentado es el parámetro que asigna el análisis del BLAST de valor representativo del grado de similitud de la secuencia problema y cada una de las secuencias de las BAL presentadas en el cuadro. Así mismo, en el cuadro se muestra la especie que mostró el *score* más alto después de la especie asignada. El porcentaje de identidad fue de 95 %, se eligieron aquellas cepas que presentaron el *score* más elevado en los resultados, cuando un *score* alto correspondía a una cepa con nombre “*uncultured strain*” en el Genbank, se asignó como lo más probable a la siguiente especie de la lista con nombre conocido. Además, se tomó en cuenta la

caracterización previa realizada por Apún-Molina (2007) en la cual menciona que ésta cepa es una bacteria ácido láctica (gram positiva) con forma de coco. Aún cuando en los resultados de la comparación de la secuencia mostró una mayor homología a la especie *Lactobacillus kefir* (score 1236 y 97 % de identidad), con base en la caracterización morfológica con forma de coco y Gram (+), se decidió asignar al género *Pediococcus* como el género con más similitud a la cepa identificada. La técnica utilizada en este estudio ha permitido la identificación a nivel de género. Además se muestra la secuencia obtenida sin la secuencia del vector la cual se utilizó para comparar con la base de datos (Cuadro 6).

Cuadro 5. Identificación de la cepa Lta8 a partir del análisis de comparación de secuencias utilizando el software BLAST.		
16S ADNr <i>Pediococcus</i>	Código de acceso	score
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe260	EU331313.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe243	EU331312.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe294	EU331311.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe283	EU331310.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe263	EU331309.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe238	EU331308.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe233	EU331307.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe230	EU331306.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe226	EU331305.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain Bpe202	EU331304.1	1147
<i>Pediococcus damnosus</i> strain CBS20331 16S	EU331303.1	1147
<i>Pediococcus cellicola</i> strain Z-8	AY956788.1	1147

Cuadro 6.- Secuencia obtenida sin vector utilizada para el análisis de secuencias y la comparación con la base de datos del NCBI.

```
GTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGATATACCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA
GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCTAACCCAAGAGATTGGG
CGTTCCCTTCGGGGACGGAATGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCAT
TTAGTTGGGCACTCTAGCATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGATGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCCTCGTGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGT
ACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTCAAGCTAAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTT
CGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT
CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGGCCTTGTACACACCGC
CCGT
```

8. DISCUSIÓN

El uso de compuestos antimicrobianos para eliminar patógenos y como promotores del crecimiento en la producción de peces es un tema muy controversial, bajo los argumentos de que existen residuos en el ambiente acuático y en los tejidos de los peces, así como un desarrollo de resistencia bacteriana debido al uso no adecuado de ellos (Austin y Austin, 1993). No obstante, en los últimos años se ha intensificado el uso de probióticos en acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000) existiendo pocos reportes sobre el uso de BAL y levaduras como probióticos en acuicultura.

En acuicultura la determinación del crecimiento requiere del conocimiento de la cantidad del tejido ganado en un tiempo determinado y puede ser evaluado mediante parámetros como el incremento en talla y peso en cierto período, los cuales están influenciados por las condiciones del medio en el que se encuentran los organismos. Entre los factores medioambientales, físicos, químicos y biológicos que influyen en el buen desarrollo de los organismos están la temperatura, el pH, amonio, el oxígeno disuelto, la densidad a la que se encuentran y la línea genética de las crías sembradas, así como la cantidad y la calidad del alimento suministrado (Oduleye y Evans, 1982). En el presente trabajo, el oxígeno disuelto y la temperatura se mantuvieron relativamente estables, pues estuvieron dentro de los niveles óptimos para la especie (Wicki & Gromenida, 1997). El pH, nitritos, nitratos y el amonio presentaron valores cercanos a los críticos y a veces muy por encima, esto debido a que muchas veces se observó alimento no consumido por los organismos en el fondo del tanque, lo cual provoca un exceso de materia orgánica que es degradada por procesos biológicos, además de que la densidad utilizada fue alta lo cual provocó cantidades importantes de excretas aportando más nutrientes al agua de cultivo. El producto de la degradación de la materia orgánica se convierte en amonio, nitritos y nitratos, además de aumentar el pH del agua. Aunque la densidad de cultivo fue relativamente alta ($40 \text{ organismos/m}^3$) en el primer experimento con *Oreochromis* sp. y el segundo con *Oreochromis* sp. y *O. niloticus*, el crecimiento fue bueno si lo comparamos con el peso promedio ($15.82 \pm 1.34 \text{ g}$) obtenido por Apún-Molina (2007) para *O. niloticus* quien manejó densidades altas ($200 \text{ organismos/m}^3$) y temperaturas

por debajo de las óptimas. Sin embargo, a pesar de lo expuesto, las diferencias en el peso promedio de los organismos tratados con la mezcla probiótica y el peso promedio del control no fueron distintas en el primer experimento. A pesar de lo anterior, en el experimento 2 el incremento del peso de los organismos del tratamiento con la mezcla probiótica suplementada a diario (*O. niloticus*) y a cada 10 días (*Oreochromis* sp.) tuvo una diferencia significativa con respecto al control al final del experimento. En *O. niloticus* la diferencia fue de 9.06 g y 5.24 g en *Oreochromis* sp. En el experimento de Apún-Molina (2007) hubo diferencias significativas en sus tratamientos con bacterias respecto al control pero tuvo una duración de 134 días. Además, en el caso de *Oreochromis* sp. en el segundo experimento, la supervivencia (Fig. 8) y la TCE (Fig. 7) fue significativamente mejor en el tratamiento con mezcla probiótica suplementada diario y cada 10 d, comparado con el control de ese experimento y con la supervivencia general del primer experimento (Fig. 3) al igual que *Oreochromis niloticus*. Vázquez-Juárez *et al.* (1994) realizaron un experimento con levaduras aisladas de trucha arco iris silvestre y reintroducidas a otros organismos de la misma especie en cultivo, lo que incrementó el crecimiento de los organismos significativamente. En este estudio se utilizaron cepas aisladas de *Oreochromis niloticus* que posteriormente fueron suministradas en el alimento a ambas especies con resultados positivos.

Apún-Molina (2007) encontró diferencias significativas en el crecimiento y supervivencia entre el control y los tratamientos con la mezcla probiótica. Sin embargo, estos resultados positivos con la mezcla probiótica sólo se registraron a partir del día 75 de cultivo. En este trabajo, en el primer experimento, las diferencias no fueron significativas ya que se utilizaron las cepas bacterianas antes de los 75 días de edad de los organismos en cultivo, caso contrario, en el segundo experimento, se evitó utilizar organismos de menos de 75 días de edad y los resultados obtenidos fueron mejores que en el primer experimento, encontrando diferencias significativas de nuestros tratamientos con bacterias, respecto al control. Al parecer la mezcla probiótica tiene un efecto adverso en estadios tempranos del desarrollo de los peces. De hecho, el efecto adverso se manifiesta tanto en el peso, como en la supervivencia, como ocurrió en el trabajo de Apún-Molina (2007). El pH del tracto digestivo de los

alevines en algunas especies es alcalino en edad temprana y se vuelve ácido con la maduración del mismo (Walford & Lam, 1993; Rønnestad *et al.*, 2000; Yúfera *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2005), por lo que la adición de la mezcla probiótica en esta etapa quizás contribuya a que los alevines pudieran sufrir un cambio de pH en la edad temprana y esto probablemente contribuyera al efecto negativo observado en el primer experimento. Esto también pudo determinar los resultados en la TCE del primer experimento en el que no hubo diferencias significativas. En el segundo experimento si se encontraron diferencias significativas. En el caso de *Oreochromis niloticus*, la mejor TCE se dio en el tratamiento donde se aplicó el alimento con probiótico diario y cada 10 días, mientras que para *Oreochromis sp.*, los tratamientos de diario y cada 10 d tuvieron los mejores valores de TCE, sin diferencias entre ellos pero si de ambos contra el control ($p < 0.05$).

Los resultados de crecimiento en peso y supervivencia son similares a los encontrados por Lara-Flores *et al.* (2003) en *Oreochromis niloticus* alimentada con *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Streptococcus faecium* adicionadas en el alimento, obteniendo resultados positivos con la mezcla probiótica utilizada. El-Haroun *et al.* (2006) observaron un beneficio en *O. niloticus* cultivada y alimentada con una dieta con el probiótico comercial Biogen[®] constituido a base de *Bacillus sp.* y *Lactobacillus sp.* Guevara *et al.* (2003) encontraron mejoras en el crecimiento de *Oreochromis sp.* con la inclusión en el alimento de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.* y *Saccharomyces sp.* En contraste, Günther & Jiménez-Montealegre (2004) demostraron que *Bacillus subtilis* adicionado en el alimento de *O. niloticus* no mejora su crecimiento, y de hecho se observó un efecto adverso. Esto corrobora nuestros hallazgos, y de esto se sugiere como ya se mencionó antes, que es importante realizar la caracterización previa de las cepas aisladas, ya que las bacterias podrían tener efectos dañinos para los peces en cultivo (Gildberg *et al.*, 1995).

En cuanto a la supervivencia de ambas especies en el segundo experimento, al tener ambas las mismas condiciones fisicoquímicas de cultivo, nutrientes e igual densidad, podemos asegurar que la supervivencia del 100 % de *O. niloticus* comparada con el 92 % de *Oreochromis sp.* se debió a la genética misma de las

especies y a la mayor resistencia y adaptabilidad al cultivo de *O. niloticus*, siendo *Oreochromis* sp. un poco más susceptible al manejo de cultivo (Castillo, 2000).

Los resultados estadísticos mostraron que para *O. niloticus*, el administrar diario o cada 10 días la mezcla probiótica en el alimento mejora el crecimiento en peso, mientras que para *Oreochromis* sp., el administrarla cada 10 días produce mejores resultados en cuanto al crecimiento en peso. Cabe mencionar que preparar alimento cada 10 d reduce los costos y el manejo en la preparación del alimento lo cual es importante desde el punto de vista de costos de producción.

En este trabajo, la productividad fue alta comparada con la obtenida por Apún-Molina (2007), debido a que los experimentos se realizaron en el exterior y en condiciones de luz solar y temperatura adecuadas, al menos en el primer experimento y en la mayor parte del segundo. Aunque no se estudió el aporte de la productividad natural, parece que fue importante pues se observaron peces alimentándose de las algas que crecían en las paredes y el fondo del estanque, lo que confirma que estas especies omnívoras pueden aprovechar en gran medida la disponibilidad de recursos (Jiménez y Nepita, 2000). Tal vez el alimento natural influyó en parte para que no se observaran diferencias significativas en el crecimiento de los organismos alimentados con BAL y el control del primer experimento. En contraste, el trabajo de Apún-Molina (2007) se desarrolló bajo condiciones controladas dentro del laboratorio y en condiciones subóptimas de temperatura, con producción natural de microalgas y zooplancton insignificante. Sin embargo, a pesar de esto, los peces alimentados con bacterias benéficas crecieron significativamente mejor que el control.

No se encontraron vibrios en el primer experimento y en el segundo fueron muy escasos, presentándose mayor abundancia de bacterias totales. Lo anterior podría deberse a que el agua verde, la cual indica una gran abundancia de *Chlorella* sp., disminuyó en el segundo experimento debido a la disminución de la incidencia de la radiación solar en noviembre y diciembre (final del experimento). Esta microalga tiene importante actividad antibacteriana, especialmente contra vibrios (Tendencia *et al.*, 2004). Se ha demostrado que *Chlorella* puede inhibir el crecimiento de tres cepas de bacterias (*Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. penaeicida*) gracias a que produce la sustancia conocida como clorelina. Además, se ha demostrado que *Chlorella*

produce otra sustancia con capacidad antibiótica llamada clorofilida, un precursor de la clorofila (Direkbusarakom *et al.*, 1997). Por lo tanto, es importante realizar experimentos encaminados a probar esta posibilidad en el cultivo de estas especies y conocer si efectivamente la productividad primaria tiene propiedades antimicrobianas.

La cepa bacteriana marcada como Lta8, tuvo un 95 % de identidad con la secuencia del género *Pediococcus* y la especie *P. damnosus*. Este género bacteriano ha sido utilizado como control para reducir las poblaciones de vibrios, además de mejorar el crecimiento, factor de conversión alimenticia y la supervivencia en el cultivo del camarón de *Penaeus monodon* y *Litopenaeus stylirostris* (Nguyen *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2008). Su efecto en el control de vibrios debe ser estudiado con más detalle.

9. CONCLUSIONES

- 1) En las condiciones de cultivo de este trabajo se observaron diferencias significativas respecto al peso, tasa de crecimiento específica y supervivencia final en los diferentes tratamientos con la mezcla probiótica respecto al control, en los tratamientos donde se alimentaron los animales con bacterias diariamente y cada 10 días.
- 2) Las bacterias ácido lácticas y la levadura adicionadas al alimento, en las concentraciones experimentales de este estudio, afectan negativamente el crecimiento en peso y supervivencia de los alevines de *Oreochromis* sp. durante los primeros 75 días de edad.
- 3) Es posible administrar cada 10 días la mezcla probiótica en el alimento para ambas especies en cultivo con resultados positivos.
- 4) La cepa bacteriana Lta8 de nuestro experimento pertenece al género *Pediococcus*.

10. RECOMENDACIONES

- 1) Evaluar la eficiencia de las cepas en experimentos mas largos (8 meses), como ocurre en una granja comercial.
- 2) Probar experimentalmente concentraciones menores de bacterias ácido lácticas adicionadas al alimento. Por ejemplo: 1×10^3 y 2.5×10^4 UFC/g.
- 3) Evaluar la viabilidad de las cepas al ser incluidas en un alimento peletizado.
- 4) Probar las bacterias (5×10^4 UFC/g) en cultivos hiperintensivos (80-100 organismos/ m^3) y condiciones óptimas respecto a los parámetros fisicoquímicos.
- 5) Evaluar las cepas en experimentos donde se prueben bacterias patógenas para conocer si las BAL evitan que los organismos se enfermen. Se recomienda aislar las bacterias patógenas de peces enfermos y cultivados en la zona, para evitar introducir patógenos externos.
- 6) Determinar si las BAL tienen un efecto inmunoestimulante en las tilapias, como ocurre con las mismas cepas en el camarón.
- 7) Realizar estudios para conocer si el agua verde (abundancia de microalgas) en el cultivo de tilapias tiene importantes propiedades antibacterianas contra vibrios.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, G.I. 1992. Aplicación de probióticos en la Acuicultura. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Memorias de Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Alday, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. *El Mundo Acuícola* 5: 3-7.
- Amores, R., A. Calvo, J.R. Maestre y D. Martínez-Hernández. 2004. Probióticos. Revisión. *Rev. Esp. Quimioterapia*: 131-139.
- Andlid, T. 1995. Ecological physiology of yeasts colonizing the intestine of fish. PhD thesis. University of Goteborg, Sweden. 75 pp.
- Apún-Molina, J.P. 2007. Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linneaus 1758), cultivada en el laboratorio. Tesis de maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. 58 pp.
- Arce-Moreno, B.L. 1989. Growth promoting effect of nicotinic acid and nicotinamide in hybrids of tilapia. *Veterinaria México* 20(4): 415-418.
- Austin, B. y D.A. Austin. 1993. Bacterial fish pathogens—disease in farm and wild fish. 2nd Ed. Ellis Horwood, Ltd. New York. 384 pp.
- Avendaño-Herrera, R., M. Dekovic y C. Riquelme. 2001. Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* en cultivo masivo. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 36: 31-41.
- Axellsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. En: Salmine, S. and Von Wright, A. (ed.) Lactic Acid Bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y. 617 pp.

- Balcázar, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), 877-881.
- Balcázar, J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés y J.L. Múzquiz. 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 122(3-4): 373-380.
- Benetti, D. 2001. Proactive health management, using probiotics in marine fish hatcheries. *The Advocate* 4: 30-32
- Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunestimulación de camarones peneídos. En: Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Olvera, M. y Civera, R., (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Beveridge, M.C. y B.J. McAndrew. 2001. *Tilapias: biology and exploitation*. Kluwer Academic Publishers Fish and Fisheries, Londres- 505 pp.
- Britz, P.J. 1996. The suitability of selected protein sources for inclusion in formulated diets for the South African abalone, *Haliotis midae*. *Aquaculture*: 140: 63-73.
- Buras, N., L. Duek, S. Niv, B. Hopher y E. Sandbank. 1987. Microbiological aspect of fish grown in treated wastewater. *Water Resour.* 21: 1-10.
- Byun, J.W., S.C. Park, Y. Benno y T. K. Oh. 1997. Probiotics effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 305-308.
- Carnevali, O., M.C. Zamponi, R. Sulpizio, A. Rollo, M. Nardi, C. Orpianesi, S. Silvi, M. Caggiano, A.M. Polzonetti y A. Cresci. 2004. Administration of probiotic strain to

improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International* 12: 377–386.

Castillo, L.F. 2000. Tilapia roja 2000: Una evolución de 20 años, de la incertidumbre al éxito. En: Fitzsimmons, K. y J. Carvalho, Editores, Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture, Tilapia Aquaculture in the 21st Century. Rio Janeiro, Brazil, 3-7 September: 607-614.

Castillo, L.F. 2005. Tilapia 2005 ¿México, la nueva alternativa en el mercado de producto fresco? *Panorama Acuícola Magazine* 10(2): 28-33.

Chamberlain, G. 2001. Feed additives. *The Advocate* 4: 61-65.

Costa-Pierce, B.A, y J.-E. Rakocy. 1997. Tilapia Aquaculture in the Americas. Published by: The World Aquaculture Society & The American Tilapia Association. Vol. 1.

Conroy, G. 2004. Importantes enfermedades detectadas en tilapias en América. Revista Panorama Acuícola. 20-25 pp.
http://www.panoramaacuicola.com/ediciones/pam-9-6/pam-9-6_20-25.pdf

Daniels, W. W. 1979. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México, D.F. 485 pp.

Darias, J.M., H.M. Murray, G. Martínez-Rodríguez, S. Cárdenas y M. Yúfera. 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248: 245–252.

Díaz-Cruz, M.S., M.J. López de Ayala y D. Barceló. 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry* 22(6): 340-351.

- Direkbusarakom, S.T., M. Pechmanee, M. Assavaaree y Y. Danayadol. 1997. Effect of *Chlorella* on the growth of *Vibrio* isolated from diseased shrimp. Pages: 355-358. In: T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds.), Disease in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Douillet, P. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture* 182: 241-248.
- El-Haroun, E.R., A.M.A. Goda y M.A. Kabir Chowdhury. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen[®] supplementation as growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquaculture Research* 37: 1473-1480.
- FAO, 2004. Estado de la Pesca Mundial y la Acuicultura 2004 (ROMA: FAO).
- FAO, 2006. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2006. <http://www.fao.org/docrep/009/a0699s/A0699S04.htm>
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology* 66(5): 365-378.
- Gildberg, A., A. Johansen y J. Bogwald. 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: 23-34.
- Guevara, J.E., R.I. Mateus y L.G. Quintero. 2003. Evaluación de la utilización de probióticos en la fase de levante del ciclo de producción de mojarra roja *Oreochromis* sp. Memorias del IV Seminario Internacional de Acuicultura. Bogota Colombia.

- Günther, J. y R. Jiménez-Montealegre. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Biol. Trop.* 52 (4): 937-943.
- Jiménez, B.L. y R. Nepita. 2000. Espectro trófico de la tilapia *Oreochromis aureus* (Perciformes, Cichlidae) en la presa Infiernillo, Mich.-Gro. México. *Rev. Biol. Trop.* 48: 487-494.
- Jiravanichpaisal, P., P. Chuaychuwong y P. Menasveta. 1997. The use of *Lactobacillus* sp. as the probiotic bacteria in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Poster session of the 2nd Asia-Pacific marine biotechnology conference and 3rd Asia-pacific conference on algal biotechnology. 7-10 May 1997 Phuket Thailand. P16.
- Kautsky, N., P. Ronnback, M. Tedengren y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.
- Lara-Flores, M., L. Briones y M.A. Olvera-Novoa. 2002. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). En: L.E. Cruz-Suárez., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, G.M. Gaxiola-Cortés y N. Simoes (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Lara-Flores, M., M.A.Olvera-Novoa, B.E.Guzmán-Mendez y W. Lopez-Madrid. 2003. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216: 193-201.
- Maeda, M.1994. Biocontrol of the larval rearing biotope in aquaculture. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 1: 71-74.

- Mathieu, C., C. Liet, P. Dominique, L. Pierrette, W. Nelly, N. Jean-Louis, S. Philippe y M. Catherine. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275(1-4): 182-193.
- Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life: optimistic studies. Putnam and Sons. New York, NY.
- Moriarty, D. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. En: Proceedings of the 8 International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C., Brylinsky, M. and Johnson, G., (Eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.
http://ag.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia_shrimp/moriarty.PDF
- Newman, S. 2000. Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. *Panorama Acuícola* 5: 22-23.
- Nguyen, T.N.T., T.H.C. Huynh, T.K.V. Nguyen, J. Delforgeb y V. Usacheb. 2004. Use of the bacteria *Pediococcus acidilacti* MA18/5M as a probiotic feed additive in postlarvae and juveniles of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. International Society for Animal Hygiène - Saint-Malo.
- Nieto, T.P., A.E. Toranzo, y J.L. Barja. 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the northwest of Spain. *Aquaculture* 42: 193– 206.
- Nikoskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund y A.C. Ouwehand. 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2430-2435.
- Ochoa, J.L. y R. Vázquez-Juárez. 2004. Las levaduras marinas como herramienta científica y biotecnológica. *Universidad y Ciencia. No. especial I*: 39-50.

- Oduleye, S.O. y D.H. Evans.1982. The isolated, perfused head of the toadfish, *Opsanus beta*. II. Effects of vasoactive drugs on unidirectional water flux. *J. comp. Physiol.* 148B: 115-120.
- Parker, D. 1974. Probiotics, the other half of antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 29: 4-14.
- Phillips, 1996. The Use of Chemicals in Carp and Shrimp Aquaculture in Bangladesh, Cambodia, Lao PDR, Nepal, Pakistan, Sri Lanka and Viet Nam. En: JR Arthur, CR Lavilla-Pitogo, RP Subasinghe(Eds). Use of Chemicals in Aquaculture in Asia. Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals In Aquaculture in Asia. 20-22 May 1996; Tigbauan, Iloilo, Philippines.
- Ringø, E. y F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.
- Riquelme, C.E., R. Araya y R. Escribano. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.
- Riquelme, C.E., M.A. Jorquera, A.I. Rojas, R.E. Avendaño y N. Reyes. 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192: 111-119.
- Rodríguez-Méndez, N., S. Gaitán y N. Chaparro. 2006. Evaluación del crecimiento de juveniles del Bagre *Ariopsis bonillai* utilizando alimento con probióticos en condiciones de laboratorio Revista AquaTIC, nº 24, pp. 3-12. Año 2006 ISSN 1578-4541 <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=193>.
- Rønnestad, I., R. Pérez Domínguez y M. Tanaka. 2000. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo

microinjection: pH and assimilation of free amino acids. *Fish. Physiol. Biochem.* 22: 225–235.

Sallenave-Namont, C., Y.F. Pouches, T. Robiou, P. Lassus y J.F. Verbist. 2000. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia* 149: 21-25.

Sauer, P., J. Gallo, M. Kesselova, M. Kolár y D. Koukalová. 2005. Universal primers for detection of common bacterial pathogens causing prosthetic joint infection. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 149(2): 285-288.

Sorum, H. y T. M. L’Abee-Lund. 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria. A result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology* 78: 43-56.

Sotomayor, M.A. y J.L. Balcázar. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Revista Aquatic* 19: 9-15.
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic>.

Strickland, J.D. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis, 2nd. *Fisheries Research Board, Canada.*

Tendencia, E.A., M.R. de la Peña, A.C. Fermin, G. Lio-Po, C.H. Choresca y Y. Inui. 2004. Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 232(1-4): 145-152.

Vaughan, E.; E. de Vries; M.C., Zoetendal; E.G. Ben-Amor; K. Akkermans; A.D. y W.M de Vos. 2002. The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 341-352.

- Vázquez-Juárez, R., F. Ascensio, T. Andlid y L. Gustafsson. 1994. Cell surface hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2: 199-208.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* .64(4):655-671.
- Walford, J. y T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic activity in sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109: 107–205.
- Wicki, G.A. y N. Gromenida. 1997. Estudio de desarrollo y producción de Tilapia. Dirección de Acuicultura. Buenos Aires, Argentina.
- Yúfera, M., C. Fernández-Díaz, A. Vidaurreta, J.B. Cara y F.J. Moyano. 2004. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* L. (Pisces: teleostei). *Mar. Biol.* 144: 863–869.
- Zamora-Rodríguez, L.M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral Universidad de Girona. 255 pp.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. 210 pp.

12. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de adición de alimento comercial para la alimentación en el cultivo de tilapia.

PESO DEL PEZ (g)	PRODUCTO	TAMAÑO DE PARTÍCULA RECOMENDADO	RACIONES AL DÍA	ALIMENTACIÓN (%del peso corporal /día)1/
De 0.1 a 0.2 De 0.2 a 1.5 De 1.5 a 5.0 De 5.1 a 12.0	TILAPIA INICIADOR IMU	Harina #0 Etts #2 Etts #2 Etts #4	10 a 12 10 a 12 10 a 12 8 a 10	10.0 9.0 8.0 7.0
De 12.1 a 22.9 De 23.0 a 39.9 De 40.0 a 50.0	TILAPIA CHOW 35%LPA Y/O T.CHOW 30%SLOW SINKING Y/O TILAPIA CHOW AD 30%	Pellet 3/32 Extruído	6 a 8 6 a 8 6 a 8	6.0 5.0 4.0
De 50.1 a 65.0 De 65.1 a 90.0 De 90.1 a 150 De 150 a 200 De 200 a 300 De 300 a 500	T.CHOW 30%SLOW SINKING Y/O T.CHOW AD 30%Y/O T.CHOW 25%	Extruído 1/8",ó 3/16" Extruído	4 a 6 4 a 6 4 a 6 4 a 6 4 a 6 4 a 6	4.0 3.5 3.0 2.5 2.3 2.0

Fuente: Agribrands Purina de México

<http://www.agribrands.com/Countries/Mexico/acuacultura8.htm>

Anexo 2. Resultados de la comparación de la secuencia de la cepa LTa8 16S ADNr obtenida con el programa BLAST-N y comparada con el GenBank del NCBI.

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
AB271039.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-19	1242	1242	100%	0.0	97%	
AB271037.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-17	1242	1242	100%	0.0	97%	
AB271035.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-15	1242	1242	100%	0.0	97%	
AB271034.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-14	1242	1242	100%	0.0	97%	
AB271032.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-12	1242	1242	100%	0.0	97%	
AB271031.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-11	1242	1242	100%	0.0	97%	
AB271030.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-10	1242	1242	100%	0.0	97%	
EU688976.1	Lactobacillus kefir strain F3201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	100%	0.0	97%	
AB262735.1	Lactobacillus parafarraginis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0680	1236	1236	100%	0.0	97%	
AB262734.1	Lactobacillus parafarraginis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0677	1236	1236	100%	0.0	97%	
AB271038.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-18	1236	1236	100%	0.0	97%	

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
AB271036.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-16	1236	1236	100%	0.0	97%	
AB271033.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-13	1236	1236	100%	0.0	97%	
AY758380.1	Uncultured bacterium clone m-OTU5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	100%	0.0	97%	
AY579585.1	Lactobacillus sp. CIDCA 8325 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	100%	0.0	97%	
AY579584.1	Lactobacillus kefir strain JCM 5818 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	100%	0.0	97%	
AJ621553.1	Lactobacillus kefir partial 16S rRNA gene, strain LMG 9480T	1236	1236	100%	0.0	97%	
AB024300.1	Lactobacillus kefir gene for 16S rRNA, strain:NRIC 1693	1236	1236	100%	0.0	97%	
AY363303.1	Lactobacillus kefir 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1232	1232	100%	0.0	97%	
AB271040.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-20	1230	1230	100%	0.0	97%	
AY758378.1	Uncultured bacterium clone m-OTU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1230	1230	100%	0.0	97%	
AY579586.1	Lactobacillus sp. CIDCA 8348 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1230	1230	100%	0.0	97%	
AY278619.1	Lactobacillus genomsp. C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1230	1230	100%	0.0	97%	
AB362680.1	Lactobacillus kefir gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0585	1227	1227	100%	0.0	97%	
AY278620.1	Lactobacillus genomsp. C2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	97%	
AB368914.1	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: T9-11	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB368913.1	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: T12-7	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB370879.1	Lactobacillus parakefir gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 8573	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB300611.1	Lactobacillus buchneri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F-32	1225	1225	100%	0.0	97%	
EF535231.1	Lactobacillus parabuchneri strain 2173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB220014.2	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-37	1225	1225	100%	0.0	97%	
DQ987924.1	Lactobacillus buchneri strain NRRL B-30929 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB271041.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: OTU-21	1225	1225	100%	0.0	97%	
AJ970317.1	Lactobacillus parabuchneri 16S rRNA gene, type strain: LMG 11457	1225	1225	100%	0.0	97%	
AY026752.1	Lactobacillus sp. ACD7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AF264701.2	Lactobacillus sp. JKD6 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB205056.1	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB205055.1	Lactobacillus buchneri gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AF275311.1	Lactobacillus ferintoshensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	97%	
AB370877.1	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S	1221	1221	100%	0.0	96%	

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	ribosomal RNA, partial sequence, strain: DSM 5707						
AY363377.2	Lactobacillus sp. rennanqilfy19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1221	1221	100%	0.0	96%	
EU789397.1	Lactobacillus hilgardii strain M0113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1219	1219	100%	0.0	96%	
AB368911.1	Lactobacillus hilgardii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: T3-12	1219	1219	100%	0.0	96%	
AB262733.1	Lactobacillus farraginis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0679	1219	1219	100%	0.0	96%	
AB262732.1	Lactobacillus farraginis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0678	1219	1219	100%	0.0	96%	
AB262731.1	Lactobacillus farraginis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0676	1219	1219	100%	0.0	96%	
AB262962.1	Lactobacillus hilgardii gene for 16S rRNA, partial sequence	1219	1219	100%	0.0	96%	
DQ812548.1	Lactobacillus sp. Probio-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1219	1219	100%	0.0	96%	
DQ812547.1	Lactobacillus sp. Probio-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1219	1219	100%	0.0	96%	
AY241664.1	Lactobacillus hilgardii IOEB0204 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1219	1219	100%	0.0	96%	
AB362681.1	Lactobacillus kefirii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0586	1218	1218	100%	0.0	96%	
AM266587.1	Lactobacillus faeni partial 16S rRNA gene, type strain TMW 1.1303T	1214	1214	100%	0.0	96%	
AY496039.1	Lactobacillus sp. MD-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1214	1214	100%	0.0	96%	
AY026750.1	Lactobacillus parakefirii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1194	1194	97%	0.0	97%	
AB362984.1	Lactobacillus sp. NGRI 0130 gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence	1192	1192	100%	0.0	96%	
M58821.1	Lactobacillus hilgardii 16S ribosomal RNA	1190	1190	100%	0.0	95%	
M58811.1	Lactobacillus buchneri 16S ribosomal RNA	1179	1179	99%	0.0	95%	
EU678893.1	Lactobacillus sp. DCY31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1164	1164	100%	0.0	95%	
M59295.1	Lactobacillus vermiforme 16S ribosomal RNA	1158	1158	100%	0.0	94%	
EF187239.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331313.1	Pediococcus damnosus strain Bpe260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331312.1	Pediococcus damnosus strain Bpe243 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331311.1	Pediococcus damnosus strain Bpe294 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331310.1	Pediococcus damnosus strain Bpe283 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331309.1	Pediococcus damnosus strain Bpe263 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331308.1	Pediococcus damnosus strain Bpe238 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331307.1	Pediococcus damnosus strain Bpe233 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331306.1	Pediococcus damnosus strain Bpe230 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331305.1	Pediococcus damnosus strain Bpe226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
EU331304.1	Pediococcus damnosus strain Bpe202 16S	1147	1147	100%	0.0	95%	

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequence						
EU331303.1	Pediococcus damnosus strain CBS20331 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
AB362687.1	Lactobacillus faeni gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0609	1147	1147	100%	0.0	94%	
AJ621552.1	Lactobacillus homohiochii partial 16S rRNA gene, strain LMG 9478T	1147	1147	100%	0.0	95%	
Y11374.1	Lactobacillus kunkeei rRNA gene	1147	1147	100%	0.0	95%	
AY956788.1	Pediococcus cellicola strain Z-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	95%	
AJ318414.1	Pediococcus damnosus 16S rRNA gene, strain DSM 20331	1147	1147	100%	0.0	95%	
X61139.1	L.buchneri 16S rRNA gene	1147	1147	100%	0.0	94%	
AB362983.1	Lactobacillus sp. NGRI 0001 gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence	1146	1146	100%	0.0	94%	
DQ400914.1	Pediococcus ethanodurans strain Z-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	95%	
AM113780.1	Lactobacillus homohiochii partial 16S rRNA gene, strain type strain:DSM 20571	1142	1142	100%	0.0	95%	
AY681128.1	Lactobacillus sp. 68 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1142	1142	100%	0.0	95%	
AJ271383.1	Pediococcus inopinatus 16S rRNA gene, strain DSM 20285	1142	1142	100%	0.0	95%	
EU461852.1	Uncultured bacterium clone Saki_aaj62c06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1136	1136	100%	0.0	94%	
AY956789.1	Pediococcus sp. Z-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1136	1136	100%	0.0	94%	
X76330.1	L.fructivorans (DSM 20203 T) 16S rRNA gene	1136	1136	100%	0.0	94%	
EU794739.1	Lactobacillus brevis strain M3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU777783.1	Uncultured bacterium clone PB1_aai28h06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU331259.1	Pediococcus parvulus strain Bpe301 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU331258.1	Pediococcus parvulus strain Bpe299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU331257.1	Pediococcus parvulus strain Bpe290 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU331256.1	Pediococcus parvulus strain Bpe207 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU331255.1	Pediococcus parvulus strain Bpe184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
EU331253.1	Pediococcus parvulus strain Bpe149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
AF371493.1	Uncultured bacterium clone p-3000-9F2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
AF371489.1	Uncultured bacterium clone p-2997-9F2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	94%	
AJ534844.1	Lactobacillus spicheri 16S rRNA gene, type strain LTH 5753T	1131	1131	100%	0.0	94%	
AB033209.1	Lactobacillus algidus gene for 16S rRNA	1131	1131	100%	0.0	94%	
AY324630.1	Lactobacillus murinus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1127	1127	100%	0.0	94%	
EU461925.1	Uncultured bacterium clone Saki_aaj63g08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1125	1125	100%	0.0	94%	
EU508810.1	Uncultured bacterium clone MD4_aap51d11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1125	1125	100%	0.0	94%	

