

Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones

Laura Escobar-Briones, Miguel A. Olvera-Novoa, César Puerto-Castillo

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida. Km 6 antigua carretera a Progreso, 97310 Mérida, Yucatán, México.

E-mail: lescobar@mda.cinvestav.mx, molvera@mda.cinvestav.mx.

Resumen

Los métodos empleados para el cultivo intensivo de peces provocan en los organismos problemas derivados del estrés al que se someten, especialmente por las altas densidades y alimentos artificiales utilizados, lo cual afecta su estado inmunológico propiciando una mayor proliferación de enfermedades bacterianas oportunistas. A fin de mejorar el crecimiento y evitar o controlar dichas enfermedades se utilizan diferentes drogas incluyendo antibióticos, contribuyendo a la aparición de cepas microbianas resistentes a esos fármacos. Como una alternativa a los antibióticos y promotores de crecimiento se ha venido proponiendo la utilización de probióticos, microorganismos que colonizan el tracto digestivo de animal y que tienen efectos benéficos sobre el mismo incluyendo mejoras en la digestión, inmunidad y la resistencia a las enfermedades. Diversos estudios demuestran que la mejor opción para la selección de microorganismos con propiedades probióticas, es su aislamiento del tracto gastrointestinal del mismo hospedero, para lo cual es necesario en primer término conocer la flora y la ecología microbiana del intestino, a fin de identificar, aislar y caracterizar a los microorganismos presentes y por último seleccionar aquellos que por sus efectos benéficos puedan tener el efecto esperado. En el caso de la tilapia, se han hecho diversos estudios de los que se desprende que su microflora, al igual que la de los demás especies de peces, está influida por los microorganismos presentes en el agua, señalándose que de acuerdo con el tipo de sistema de cultivo, en su intestino se encuentra en equilibrio una gran diversidad de bacterias benéficas y patógenas, cuyos géneros y especies se encuentran directamente afectados por el medio ambiente. En el caso de este pez, se mencionan como bacterias más comunes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteraceae*, *Vibrio*, *Citrobacter* y *Streptococcus*. En este documento se describen resultados de estudios realizados para definir su microflora y caracterizarla de acuerdo con su potencial probiótico, de los cuales se seleccionaron dos cepas de bacterias ácido-lácticas por su capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias estrechamente relacionadas con ellas, atribuida a su capacidad de producir ácidos orgánicos de cadena corta, así como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, con los que impiden el crecimiento de otros microorganismos. Estas bacterias se enfrentaron contra 10 cepas de bacterias patógenas de peces (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio campbellii*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas auroginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Serrattia marcescens*, *Streptococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*). La capacidad de inhibición de las cepas seleccionadas contra los patógenos se midió por el tamaño de los halos obtenidos. Las bacterias ácido lácticas aisladas del tracto digestivo de la tilapia inhibieron el crecimiento de la mayoría de los patógenos con excepción de *Vibrio campbellii*, *Escherichia coli* y *Serrattia marcescens*. Considerando el potencial probiótico de estas cepas, se estudió su inocuidad al inyectarse a la tilapia por vía intraperitoneal o intramuscular, sin observarse efectos adversos mediante indicadores inmunológicos, histopatológicos y microbiológicos. Actualmente se trabaja en la evaluación de su efecto en el crecimiento y en el sistema inmune de tilapias alimentadas con dietas conteniendo las bacterias seleccionadas. Los resultados preliminares indican que las tilapias que recibieron una de las dos cepas tuvieron un mayor crecimiento y mejor eficiencia alimenticia, en comparación a peces en tratamientos con un probiótico comercial y una dieta control sin probióticos, indicando un efecto positivo de esta cepa como posible probiótico nativo. De estos estudios se concluye que algunos de los microorganismos presentes en la flora intestinal de la tilapia tienen un amplio potencial para ser utilizados como probióticos en este organismo.

Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones

Laura Escobar-Briones, Miguel A. Olvera-Novoa, César Puerto-Castillo

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida. Km 6 antigua carretera a Progreso, 97310 Mérida, Yucatán, México. E-mail: lescobar@mda.cinvestav.mx, molvera@mda.cinvestav.mx.

Abstract

The methods used for intensive fish culture, including high densities and artificial feed, affect the immunological system of the animals and promote the proliferation of diseases caused by opportunistic bacteria. In order to improve the growth and to avoid the appearing of such diseases, producers use different drugs including antibiotics, contributing with this to the appearing of resistant strains of pathogenic bacteria. To avoid this practice, it has been proposed the use of probiotics, microorganisms that colonize the gastro-intestinal tract and exhibit beneficial effects in the host, improving digestibility, immunity and resistance to diseases. Several studies demonstrate that the best option for the selection of probiotic microorganisms is their isolation directly from the gut of the same host, for which it is necessary first to know the composition of the micro-flora, and the microbiological ecology of the intestine, in order to identify, isolate and characterize the resident microorganisms and finally to select those with potential positive effects. Studies with tilapia indicate that, as in the other species of fishes, its micro-flora is affected by the bacteria present in the surrounding water, and according with the culture system, a high diversity of beneficial and pathogenic bacteria can be found in complete equilibrium in its intestine, whose genera and species are directly related with those found in the surrounding environment. In the case of tilapia, the most common bacteria found in its intestine belong to the genera *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteraceae*, *Vibrio*, *Citrobacter* and *Streptococcus*. In this document it is described the results of some studies made to define its micro-flora, and to characterize it according with its probiotic potential. After a screening, two strains of lactic acid bacteria were selected by its capacity to inhibit the growth of ten fish-pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio campbellii*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas auroginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus faecalis* and *Klebsiella pneumoniae*). The selected strains inhibited the growth of these bacteria except *V. campbellii*, *E. coli* and *S. marcescens*. Considering the probiotic potential of this two bacteria, it was studied their innocuity via intramuscular and intraperitoneal injection, without any adverse effect after immunological, histopathological and microbiological indicators. By the moment, we are working on the evaluation of their effect on growth and immunological system, feeding tilapia with diets containing both strains, and comparing them with other treatments with commercial probiotics or without any additive. The results indicate that at least one of the two lactic acid strain support a better growth and feeding efficiency, in comparison with the other treatments, indicating a positive effect with the use of this bacteria as possible native probiotic. It is concluded that some of the microorganisms belonging to the intestinal flora of tilapia, have potential to be used as probiotics for tilapia.

Situación actual de la acuicultura

El cultivo de organismos acuáticos para consumo humano es una de las actividades productoras de alimento con mayor crecimiento a nivel mundial. En su último informe del estado actual de las pesquerías y acuicultura, la FAO (2004) señala que la producción del año 2002 fue 6.1% mayor a la del 2000, tendencia que se ha mantenido durante los últimos años. Una de las principales razones por las que la acuicultura se ha expandido de manera vertiginosa es debido al bajo crecimiento de la producción de las pesquerías comerciales en todo el mundo, aunado a la intensificación y mayor eficiencia productiva acuícola (Klaenhammer y Kullen, 1999).

La producción piscícola mundial está principalmente sustentada por organismos dulceacuícolas (FAO, 2004), entre los que destaca el cultivo de tilapia, el cual se ha convertido en los últimos años en el de mayor importancia en la acuicultura tropical, por ser una fuente importante de proteína y de divisas, principalmente en los países menos desarrollados. En esta última década, México se ha distinguido como uno de los principales consumidores y productores de tilapia, generando más de 80,000 toneladas por año (Fitzsimmons, 2000).

El éxito de la tilapia se atribuye a diversos factores, entre los que destacan el presentar un crecimiento rápido además de que acepta sin problemas dietas artificiales. Asimismo soporta altas densidades dentro de los sistemas de cultivo y resiste condiciones ambientales adversas como bajas concentraciones de oxígeno, niveles altos de amonio y valores bajos de pH. Puede ser manipulada genéticamente y es considerada un organismo altamente resistente a muchas de las enfermedades que afectan a los peces, sin embargo, microorganismos tales como *Streptococcus*, *Columnaris* y *Aeromonas* pueden provocar serias enfermedades y pérdidas considerables en los cultivos.

Las especies de tilapia que se cultivan actualmente con éxito son *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* y *O. mossambicus* entre otras (Stoskopf, 1993). En particular, la tilapia nilótica es la especie más ampliamente utilizada en cultivos extensivos e intensivos, debido principalmente a su alta tolerancia a densidades elevadas, rápido crecimiento y presentar buena resistencia a las enfermedades infecciosas. Sin embargo, bajo condiciones altamente estresantes como las que predominan en los cultivos intensivos, esta especie es susceptible de ser infectada por patógenos oportunistas pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flexibacter* y *Edwardsiella* principalmente (Fouz *et al.*, 2002).

Efecto del alimento en los cultivos

La exigente demanda de alimentos ricos en proteína animal, principalmente en los países en desarrollo, ha generado la necesidad de intensificar los procesos productivos en la acuicultura. Esto ha incrementado el interés en los avances científicos y tecnológicos relacionados con los factores que influyen directamente en su rentabilidad económica, incluyendo la eficiencia alimenticia, la velocidad de crecimiento, así como la salud y la resistencia a enfermedades (Burr y Gatlin, 2005).

La eficiencia operativa de un cultivo está altamente influenciada por la dependencia existente hacia los alimentos comerciales, mismos que constituyen el costo variable más elevado en la producción intensiva, con niveles que oscilan entre el 40% y 70% de los costos de operación. Además las dietas influyen de manera determinante en los atributos constitutivos del producto final obtenido, así como en la cantidad de nutrientes no asimilados que se liberarán al medio ambiente (O'Sullivan *et al.*, 1992; Makridis *et al.*; 2005).

Hasta hace unos años, la principal finalidad de los alimentos era proveer los nutrimentos necesarios para la obtención de un crecimiento máximo, sin embargo, actualmente las dietas tienen el propósito de fungir además como alimentos funcionales, esto es, que su influencia no solo comprenda el crecimiento de los organismos, sino que ésta se extienda a incrementar la salud y la resistencia al estrés y a los agentes causantes de enfermedades dentro de los sistemas de cultivo (Burr y Gatlin, 2005).

Este cambio radical en la producción y uso de los alimentos, se debe a la alta incidencia de enfermedades generalmente causadas por microorganismos y parásitos oportunistas, que aprovechan la disminución de la inmunidad de los animales provocada por las condiciones poco favorables que se generan en los sistemas de cultivo intensivo (Whitman y Mac Nair, 2004).

Se ha intentado de muchas maneras contrarrestar las deficiencias causadas a los organismos en los cultivos, sin embargo condiciones tales como la alta densidad de siembra y la mala calidad del agua, el uso de alimentos artificiales o la inadecuada alimentación, el manejo y manipulación excesiva de los animales, la falta de higiene y el estrés, así como las variaciones en temperatura y salinidad, favorecen la proliferación de microorganismos patógenos (Makridis *et al.*, 2005).

El incremento de las enfermedades causadas por bacterias y parásitos en los animales de cultivo, se ha intentado resolver utilizando diversos métodos como desinfectantes y drogas antimicrobianas, lo que ha dado resultados limitados y representa un alto costo para el acuicultor. Muchas de las drogas, principalmente los antibióticos, se han utilizado de manera indiscriminada. A nivel mundial, estos medicamentos se han distribuido en la biosfera durante aproximadamente 60 años. En Estados Unidos se calcula que se producen aproximadamente 18,000 toneladas antibióticos para uso médico y agrícola, y 12,600 toneladas para uso no terapéutico como es el caso de los promotores de crecimiento (Balcázar, 2006).

Esta cantidad de antibióticos y su uso intensivo ha provocado la aparición de bacterias resistentes a los mismos, y la transferencia de sus genes a otras bacterias nunca antes expuestas a estos medicamentos (Verschuerer *et al.*, 2000), así como la acumulación de residuos de antibióticos en los productos alimenticios que llegan al consumidor final (Uma *et al.*, 1999), esto además de su efecto adverso muchas veces irreversible sobre la microflora gastrointestinal de los organismos y sobre la ecología microbiana de los sistemas de cultivo (Austin y Al-Zaharani, 1988).

Por lo anterior, es que en muchos países, incluido México, se ha regulado y normado el uso de antibióticos en la acuicultura (Directiva 96/23/CE, 1996, FFDCA; 21 U.S.C., Guidance No. 78, 2003; NOM-EM-006-PESC-2004). En los reglamentos y normas que se han elaborado, tanto a nivel nacional como internacional, se prohíbe el uso de la mayoría de los antibióticos para la

Laura Escobar-Briones, Miguel A. Olvera-Novoa, César Puerto-Castillo. 2006. Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puella Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

prevención y tratamiento de enfermedades, así como su utilización para promover el crecimiento de los animales (Swann, 1969).

El medio ambiente y la flora intestinal en los organismos acuáticos

La microflora gastrointestinal juega un papel importante e influye de manera directa sobre la nutrición y la salud de los animales en general. Por esto mismo, al alterarla se afectan el estatus fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, el crecimiento, su desarrollo general y la calidad final del producto (Al- Harbi y Uddin, 2005)

En los animales acuáticos, la microflora intestinal no existe como una entidad absoluta sino que hay una interacción constante entre el ambiente y la del pez, de tal forma que los hospederos y los microorganismos comparten un mismo ecosistema y estos últimos tienen la opción de vivir en asociación o bien de manera independiente. Los organismos en sistemas de cultivo viven bajo condiciones controladas para promover su crecimiento y desarrollo, sin embargo, se encuentran rodeados por microorganismos patógenos que comparten su mismo ambiente (Verschuerer *et al.*, 2000; Al- Harbi y Uddin, 2005).

El tracto gastrointestinal de peces dulceacuícolas y marinos, se caracteriza por ser un nicho ecológico favorable para el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos ya que la población de bacterias benéficas y patógenas observada en el intestino de los animales es normalmente más abundante comparada con la que se encuentra en el medio ambiente que los rodea. Sin embargo, los microorganismos del medio ambiente y sus variaciones estacionales, influyen de manera determinante en los géneros y las especies que se puedan encontrar en la microflora de los animales (Cahill, 1990).

El desarrollo de la microflora y la barrera gastrointestinal es un proceso gradual que comienza después del nacimiento. En los animales terrestres, la flora microbiana materna es la fuente inicial de colonización bacteriana, mientras que en los animales acuáticos, esta acción está determinada por su contacto con el ambiente circundante, e influida por la ingesta de alimento, la secreción de hormonas y la absorción de nutrientes, así como la aparición de proteínas y enzimas digestivas. Inicialmente, cepas anaerobias facultativas dominan en el intestino y posteriormente la variabilidad poblacional dependerá del tipo de dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica, los tratamientos con medicamentos y el estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri *et al.*, 2001).

En este sentido, la microflora intestinal de los peces se considera como autóctona o nativa cuando los microorganismos son capaces de colonizar la superficie epitelial del intestino del hospedero, o en su defecto, alóctona o transitoria si los microorganismos presentes en el medio circundante no logran permanecer dentro del intestino (Ringo y Olsen, 2003).

Actualmente se acepta que los peces tienen una microflora intestinal específica que se vuelve estable al llegar a la etapa adulta. En los peces de agua dulce los grupos dominantes presentes en el tracto gastrointestinal pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pleisomonas*, *Enterobacteriaceae*

y *Pseudomonas* (Trust, 1975; Cahill, 1990) mientras que en los peces marinos la flora está dominada por los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (Cahill, 1990).

Durante toda la vida del animal, esta flora intestinal presenta funciones metabólicas, tróficas y protectoras. La función metabólica tiene como finalidad ayudar en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo, mientras que la función trófica fomenta el crecimiento y la diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo. Su función protectora se desarrolla desde el nacimiento, ya que actúa como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos exógenos u oportunistas, creando el efecto barrera. Además, la mucosa intestinal provee al huésped de protección en contra de la constante presencia de antígenos provenientes del alimento y de microorganismos presentes en el ambiente circundante (Isolauri *et al.*, 2001).

El tracto gastrointestinal de la tilapia es un órgano complejo y multifuncional que absorbe y regula de manera endocrina la digestión de metabolitos. Además mantiene el balance de electrolitos y del agua, e interviene en el proceso inmunológico del organismo (Ringo y Olsen, 2003); se divide en intestino anterior, medio y posterior y cada una de estas regiones son funcionalmente diferentes. Se caracteriza por ser largo y delgado, típico de los peces herbívoros y omnívoros y presenta un pH entre 7.5 y 9.0. La longitud total en los adultos es de cinco a siete veces el largo total de su cuerpo.

El tracto gastrointestinal de la tilapia nilótica sigue un curso complejo que incluye múltiples irregularidades acompañadas de vueltas, anillos y roscas anidadas una sobre la otra. Se identifican cinco regiones principales designadas como región hepática (RH), anillo proximal mayor (APM), irregularidad gástrica (IG), anillo distal mayor (ADM) y segmento terminal (ST) (Smith *et al.*, 2000)

Se considera que la tilapia tiene una flora gastrointestinal comensal abundante y bien establecida. Debido a su capacidad de adaptación a un medio ambiente dulceacuícola o salino, su microflora tiene la capacidad de variar de acuerdo al ambiente en el que se desenvuelva (Cahill, 1990).

Dada su condición omnívora, la tilapia nilótica presenta un tracto gastrointestinal diferente al que se observa en peces carnívoros o herbívoros. Sklan *et al.* (2004) realizaron una investigación relacionada con la estructura y funcionamiento del intestino de la tilapia (*O. niloticus* x *O. aureus*). Ellos observaron que su intestino era similar al de los mamíferos, tanto en estructura como en funcionamiento, y que debido a esta característica se encontraba más evolucionado en la región proximal, donde se realizan la mayoría de las actividades enzimáticas y de absorción. Sin embargo, al comparar la morfología intestinal de la tilapia con la de los humanos, se observó que este organismo presentaba una capacidad de absorción menos desarrollada y mayor capacidad de secreción de mucosidades. Así mismo, como es común en la mayoría de las especies de peces, las vellosidades en el intestino de esta especie eran menos densas y con menor organización que en los humanos.

Diferentes estudios han ayudado al conocimiento de la microflora intestinal de distintas especies de peces, lo cual permite desarrollar medidas de prevención contra agentes patógenos que causan infecciones, así como un mejor manejo en los sistemas de cultivo.

Estudios específicos de la microflora intestinal de tilapia han sido elaborados por diferentes investigadores, Sakata *et al.* (1980) aislaron microorganismos anaerobios obligados y facultativos así como aerobios estrictos del contenido intestinal de la trucha arco iris (*Salmo gairdneri*), del ayu (*Plecoglossus altivelis*), de la tilapia nilótica, de la carpa común (*Cyprinus carpio*) y de la carpa dorada (*Carassius auratus*). Observaron que en la tilapia y en el ayu, la cantidad de microorganismos anaerobios obligados resultó ser mayor que el de anaerobios facultativos, mientras que en las demás especies resultó ser a la inversa. Así mismo en todas las especies la comunidad microbiana de anaerobios y aerobios fue igual.

En otro estudio, Sakata *et al.* (1984) investigaron la microflora aeróbica dominante en el intestino de tilapia nilótica cultivada en agua dulce, encontrando que los géneros dominantes fueron *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Enterobacteraceae*. Por su parte, Belman (1999) analizó la flora intestinal de juveniles de tilapia nilótica y concluyó que su flora intestinal estaba constituida principalmente de bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas, con familias predominantes entre las que figuraban las *Vibrionaceae* y la *Enterobacteraceae*.

Igualmente, Lara-Flores (2003) realizó un estudio con el objetivo de caracterizar la microflora intestinal de la tilapia cultivada en tanques de concreto, de acuerdo a su abundancia, géneros y especies presentes. Él encontró que los géneros más abundantes eran *Pseudomonas*, seguido de *Vibrio* y *Citrobacter*. Adicionalmente Al-Harbi y Uddin (2005), estudiaron la diversidad bacteriana de la tilapia nilótica cultivada en agua salina, y encontraron que los géneros predominantes en el tracto gastrointestinal de esta especie bajo esas condiciones fueron *Vibrio* y *Streptococcus*.

De los estudios realizados para caracterizar la flora intestinal de la tilapia nilótica, se puede concluir que este organismo tiene una microflora, que como en la mayoría de los demás animales acuáticos, está sujeta principalmente a las variaciones atribuidas a la alimentación y al medio ambiente circundante, sin embargo, los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* y los pertenecientes a la familia de las *Enterobacteraceae* se encuentran presentes y predominan normalmente.

Variaciones y manejo de la microflora intestinal

El principal factor que influye en la variación de la flora gastrointestinal de los animales de cultivo es el estrés, el cual generalmente se relaciona con fluctuaciones en la salinidad y temperatura (Lea Mayer *et al.*, 1997), con la concentración de oxígeno, calidad y cantidad de alimento así como con la densidad del cultivo (Suzuki *et al.*, 1989), además del manejo, higiene y contaminantes en los sistemas de cultivo (Pal, 1992). Como consecuencia del estrés, el sistema inmunológico se ve afectado y debilitado, lo cual es aprovechado por patógenos en general para proliferar de manera acelerada dentro del huésped. Si el organismo no se ajusta de manera adecuada a estas condiciones o si estas no son corregidas, los animales dentro del cultivo comenzarán a presentar enfermedades (Verschuerer *et al.*, 2000).

Laura Escobar-Briones, Miguel A. Olvera-Novoa, César Puerto-Castillo. 2006. Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

El conocimiento de la flora intestinal de los animales de cultivo permite establecer nuevas estrategias para el manejo de las enfermedades, partiendo del criterio de inicialmente prevenirlas y posteriormente tratarlas, para lo cual se ha recomendado el uso de vacunas y promotores de crecimiento. Las vacunas utilizadas para la inmunización de los animales generalmente son caras y en la mayoría de los casos no previenen el desarrollo de enfermedades en animales jóvenes y en recién nacidos, por lo que estos organismos deben ser protegidos utilizando otros métodos (Austin *et al.*, 1995; Garriques y Arévalo, 1995; Ringo y Gatesoupe, 1998; Verschuerer *et al.*, 2000; Spanggaard *et al.*, 2001; Sullivan, 2001).

Por esta razón la utilización de bacterias antagónicas, como una medida precautoria en contra de los microorganismos patógenos que provocan enfermedades en los sistemas de cultivo ha recibido últimamente mucha atención. En este sentido, los probióticos se presentan como una alternativa potencial y efectiva, tanto como promotores de crecimiento así como sustancias que previenen la proliferación de enfermedades en los sistemas de cultivo, con la ventaja de que pueden ser incluidos directamente en los alimentos y promover la funcionalidad de los estos últimos (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Adicionalmente, los probióticos provocan modificaciones en la microflora intestinal en los peces, lo cual influye positivamente en numerosos procesos incluyendo la digestión, la inmunidad y la resistencia a las enfermedades, de tal manera que funcionan adecuadamente como promotores de crecimiento. Actualmente su aplicación en la acuicultura tiene un alto potencial (Austin *et al.*, 1995; Garriques y Arévalo, 1995; Verschuerer *et al.*, 2000; Sullivan, 2001).

Microorganismos benéficos en la Acuicultura

El concepto de ingerir microorganismos vivos, con el propósito de manipular la microflora y mejorar la salud intestinal y el bienestar general de un organismo, tiene sus primeras raíces al comienzo del siglo XX. Esta práctica actualmente se encuentra sujeta a mucha investigación con la finalidad de obtener probióticos efectivos contra microorganismos patógenos, así como para establecer los beneficios generales en el huésped. La mayoría de los probióticos que se han propuesto para uso en la acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y a los géneros *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, principalmente (Austin *et al.*, 1995; Garriques y Arévalo, 1995; Ringo y Gatesoupe, 1998; Verschuerer *et al.*, 2000; Sullivan, 2001).

Los probióticos son microorganismos vivos que al administrarse con el alimento o en el agua de cultivo, tienen un efecto benéfico sobre el huésped (Fuller, 1989). Al modificar la comunidad microbiana asociada al mismo o a su ambiente, garantizan una mejora en el uso del alimento o un aumento en el valor nutricional del mismo, además de incrementan la respuesta inmune del hospedero a las enfermedades (Verschuerer *et al.*, 2000). Así mismo, al colonizar de manera adecuada a los organismos y contrarrestar la proliferación de microorganismos patógenos en el intestino, contribuyen a estimular el sistema inmunológico del huésped y mantener un ambiente de cultivo adecuado al mejorar la calidad del agua (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

En años recientes, se han llevado a cabo una serie de investigaciones para demostrar los efectos favorables que los probióticos inducen en sus hospederos. La mayoría de los estudios se realizaron inicialmente en vertebrados terrestres, principalmente cerdos (Sakata *et al.*, 2003), pollos (Netherwood *et al.*, 1999), ratas (Suzuki *et al.*, 1989) y humanos (Tannock, 1997). Las investigaciones en peces son recientes (Gatesoupe, 1999, Verschuerer *et al.*, 2000). En la Tabla 1 se presenta una síntesis de los principales efectos obtenidos con el uso de probióticos en distintas especies de peces cultivados.

En el caso de la tilapia nilótica se han realizado pocas investigaciones para determinar si la ingestión de un probiótico produce variaciones en su comunidad bacteriana y si genera efectos benéficos en el organismo. Lara-Flores *et al.* (2002) realizaron un estudio comparativo de un probiótico comercial contra microorganismos aislados del tracto gastrointestinal de la tilapia. Ellos observaron resultados favorables especialmente con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual dio lugar a un mayor crecimiento y mejor eficiencia alimenticia en comparación con los peces que ingirieron un probiótico comercial o con los que no recibieron ningún aditivo.

Entre los microorganismos que más se utilizan como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas, ya que representan una parte importante en la flora gastrointestinal de los animales y juegan un papel importante en la inhibición o eliminación de microorganismos patógenos (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Estas son bacterias cocoides o bacilares inmóviles, que pueden tener un hábitat muy variado. Obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares y carecen de Ciclo de Krebs funcional, son anaerobios facultativos, Gram-positivas y catalasa negativas. Entre estas bacterias se encuentran dos grupos, las homofermentativas que comprenden los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Pediococcus*, y las heterofermentativas con los géneros *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Ringo y Gatesoupe, 1998).

Debido a que estas bacterias requieren una gran cantidad de nutrientes (aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas), y a que tienen posibilidades anabólicas muy limitadas, el rendimiento de su crecimiento es reducido y forman colonias pequeñas. Presentan tolerancia a concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias, por lo que pueden desplazarlas fácilmente de los hábitat que colonizan (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981).

Tabla 1. Respuesta obtenida en peces a la utilización de diversos probióticos (adaptada de Burr y Gatlin, 2005)

Probiótico	Especie	Dosis y tiempo	Respuesta encontrada	Referencias
Bacteriofagos vivos	Ayu	10 ⁷ CFU/g dieta	Resistencia <i>Pseudomonas plecoglossida</i>	Park <i>et al.</i> (2000)
<i>Aeromonas</i> cepa A199	Anguila	10 ⁵ CFU/g ml de agua diario	Resistencia <i>Saprolegnia parasitica</i>	Lategan <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	Trucha arco iris	4x10 ⁴ esporas/g dieta por 42 días	Resistencia a <i>Yersinia ruckeri</i>	Raida <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Brema marina	0.5x10 ⁷ CFU/g a 1.0x10 ⁷ CFU/g en la dieta por 21 días	Aumento en la respuesta inmune innata celular	Salinas <i>et al.</i> (2005)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Bacalao	Dosis desconocida x 21 días	Resistencia a <i>Vibrio anguillarum</i> y aumento en supervivencia	Gildberg <i>et al.</i> (1995), Gildberg y Mikkelsen (1998)
<i>Carnobacterium inhibibins</i>	Trucha arco iris	10 ⁶ -10 ⁸ células/g dieta de 7-14 días	Resistencia a <i>Aeromonas salmonicida</i> y aumento en respuesta inmune	Irianto y Austin (2002)
<i>Debaromyces hansenii</i>	Lubina	7x10 ⁵ CFU/g dieta	Mayor secreción de amilasa, aumento supervivencia, menor crecimiento	Tovar <i>et al.</i> (2002)
<i>Enterococcus faecium</i>	Anguila europea	0.1% dieta x 14 días	Resistencia <i>Edwardsiella tarda</i>	Chang y Liu (2002)
<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lactococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp</i>	Lenguado	Enfrentamiento <i>in vivo</i> bacterias patógenas	Resistencia <i>Vibrio anguillarum</i>	Vázquez <i>et al.</i> (2005)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Trucha arco iris	10 ⁹ células/g dieta x 51 días	Resistencia a <i>Aeromonas salmonicida</i>	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Trucha arco iris	9x10 ⁴ , 2.1x10 ⁶ , 2.8x10 ⁸ , 9.7x10 ¹⁰ CFU/g dieta	Mayor respuesta inmune	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2003)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Trucha arco iris	10 ¹¹ CFU/g dietax30días	Mayor respuesta inmune	Panigrahi <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa AH2	Salmón (Salmo salar)	1x10 ⁵ to 1x10 ⁶ CFU/ml agua	Resistencia neutral a <i>Aeromonas salmonicida</i>	Gram <i>et al.</i> (2001)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tilapia nilótica	0.1% dieta x63días	Aumento en ganancia de peso y eficiencia alimenticia	Lara-Flores <i>et al.</i> (2002)
<i>Vibrio fluvialis</i>	Trucha arco iris	10 ⁶ -10 ⁸ células/g dieta por 7-14 días	Resistencia neutral a <i>Aeromonas salmonicida</i>	Irianto y Austin (2002)

Una de las principales causas por la que las bacterias ácido lácticas son utilizadas como probióticos en la acuicultura, es porque presentan la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias estrechamente relacionadas con ellas, lo que se conoce como antagonismo láctico. Entre las causas de este antagonismo están la producción de compuestos inhibitorios como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, así como metabolitos como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y bacteriocinas, con los que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981; Vandenberg, 1993; Ringo y Gatesoupe, 1998).

Debido a las características benéficas que presentan las bacterias ácido lácticas, ha aumentado el interés entre los investigadores para utilizarlas como probiótico. Inicialmente se utilizaron en humanos, pollos y lechones, y sólo recientemente se han usado en la acuicultura. Gildberg y Mikkelsen (1998) incluyeron bacterias ácido lácticas en dietas para bacalao (*Gadus morhua*) obteniendo un aumento en la supervivencia al enfrentarlo con el patógeno *Vibrio anguillarum*. Otra investigación fue la que llevaron a cabo Vázquez *et al.* (2005) en la que demostraron que la producción de acetato y lactato por parte de bacterias ácido lácticas inhibía el crecimiento de diversas especies del género *Vibrio*.

Entre los estudios realizados con tilapia utilizando bacterias ácido lácticas como probióticos se encuentra el de Poot (2001), quien aisló e identificó bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de la tilapia nilótica bajo condiciones de cultivo. El género dominante encontrado en la microflora de la tilapia fue *Enterococcus*. De las bacterias ácido lácticas aisladas que obtuvo, *Enterococcus durans* presentó acción inhibitoria *in vitro* contra dos bacterias patógenas *Aeromonas hydrophila* y *Spingomonas paucimobilis*.

Igualmente, Lara-Flores (2003) realizó un estudio con el objetivo de aislar e identificar bacterias ácido lácticas como posibles probióticos de la flora nativa de la tilapia nilótica. De las bacterias aisladas, *Streptococcus sp.* se presentó como el microorganismo nativo más viable a utilizarse como probiótico en dietas para tilapia debido a los resultados positivos que obtuvo en bioensayos de crecimiento. Así mismo, observó una disminución en el estrés y un efecto benéfico sobre el medio ambiente de cultivo al disminuir los microorganismos patógenos circundantes.

Selección e identificación de cepas probióticas

La selección de cepas de bacterias individuales como probióticos para la acuicultura es un proceso complejo, ya que el conocimiento que se tiene de la interacción entre las bacterias con el intestino de los peces es escaso. Investigaciones recientes sugieren que los probióticos deben ser seleccionados de manera específica de los hospederos en los cuales se van a usar, ya que de esta manera se minimizan los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos (Dywat *et al.*, 2000).

Para realizar una selección apropiada de una cepa probiótica, es importante analizar inicialmente si la candidata es capaz de proliferar de manera eficiente en el intestino del huésped una vez que ha sido ingerido, ya que será improbable observar efectos a largo plazo, a menos que el microorganismo sea adicionado regularmente con la dieta. De acuerdo con Duwat *et al.* (2000), algunas consideraciones importantes para la selección de una cepa probiótica son las siguientes:

- a) **Tolerancia a ácidos y bilis.** La habilidad para sobrevivir el tránsito a través del tracto intestinal es una capacidad que presentan pocos microorganismos, debido a las variaciones en el pH que presenta el tracto gastrointestinal. La cepa probiótica debe resistir las enzimas de la cavidad oral (lizosima, amilasa), el pH bajo del estómago, así como a las concentraciones de sales biliares y jugos pancreáticos segregadas en el intestino delgado.

- b) **Adherencia a las células intestinales.** Para sobrevivir y competir en un ecosistema complejo como es el intestino de los organismos, el cual se encuentra en constante movimiento y flujo, un microorganismo necesita ser capaz de adherirse al epitelio intestinal. Si el microorganismo no presenta esta habilidad, entonces se convertirá en un organismo transitorio, limitando sus efectos positivos.
- c) **Asentamiento en un nicho.** Es la medida de adaptación de un organismo para sobrevivir y competir en un ecosistema que en este caso es el intestino del organismo. Esta medida de adaptación de la cepa probiótica dependerá principalmente de los posibles modos de acción de estos microorganismos.

Modos de acción de las cepas probióticas

La capacidad de los probióticos para ejercer su acción depende fundamentalmente de la exactitud con la que alcancen el lugar específico donde deben actuar y en el que ejercerán su poder inhibitorio (Verschuerer *et al.*, 2000). También tienen que presentar diversos modos de acción por los cuales ejercen efectos positivos en el hospedero como son: a) producción de compuestos inhibidores (Naidu *et al.*, 1999), b) competencia por compuestos químicos o por energía disponible (Sullivan, 2001) y, c) competencia por los sitios de adhesión con respecto a los microorganismos patógenos (Andlid, 1995). Estos mecanismos pueden presentarse de manera individual o en conjunto, pero las consecuencias en el huésped serán normalmente la supresión de microorganismos patógenos, alteración del metabolismo bacteriano y estimulación del sistema inmunológico.

Producción de compuestos inhibidores

Algunas cepas de bacterias producen sustancias bactericidas o que tienen un efecto bacteriostático, que afecta el desarrollo y crecimiento de otros microorganismos. Estas cepas pueden alterar la relación entre el grupo de bacterias presentes, ya que influyen en la competencia por la disponibilidad de energía y sustancias químicas. La presencia de microorganismos que producen sustancias inhibitorias en el intestino, constituyen una barrera en contra de la proliferación de patógenos oportunistas (Naidu *et al.*, 1999). En general el efecto antibacteriano se presenta bajo las siguientes condiciones (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981):

- a. Producción de antibióticos y de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas, lisozimas, proteasas y H₂O₂. Entre los principales compuestos antimicrobianos se encuentran las bacteriocinas, metabolitos peptídicos de síntesis ribosomal producidos por distintos tipos de bacterias, entre las que se encuentran las ácido lácticas. Estos antibióticos peptídicos se encuentran altamente distribuidos en la naturaleza. Fueron aislados por primera vez en *Escherichia coli* y desde entonces se han observado en muchos otros microorganismos. Son agentes antimicrobianos considerados especie-específicos, que ejercen su actividad letal a través de receptores definidos localizados en la superficie externa de la bacteria, seguido de cambios metabólicos, biológicos y morfológicos que traen como consecuencia la muerte de la bacteria. Géneros como *Streptococci* y *Leuconostoc* producen generalmente la bacteriocina niacina, la cual ha sido empleada ampliamente en el procesamiento de alimentos. (Klaenhammer, 1988; Naidu *et*

al., 1999). Otro metabolito antimicrobiano importante es el H₂O₂; la capacidad de su producción la presentan ciertas cepas de bacterias lácticas, las cuales utilizan el oxígeno para formar peróxidos mediante flavoproteína-oxidasa o peroxidasa. El H₂O₂ producido y liberado al medio resulta extremadamente tóxico para otras bacterias que comparten el hábitat y que son así eliminadas del tracto intestinal (Bruno y Montville, 1993; Bjorn *et al.*, 2003).

- b. Alteraciones del pH por la producción de ácidos orgánicos como ácido láctico y acético. Los ácidos orgánicos de cadena corta son compuestos inhibitorios que causan alteraciones del pH dentro de la célula, y son altamente tóxicos para los microorganismos, porque atraviesan la membrana bacteriana en forma no ionizada y se acumulan en forma ionizada en el interior de la célula (Aguirre, 1993).
- c. Producción de ácidos grasos. Algunos microorganismos producen ácidos grasos con acción antibacteriana, la cual se encuentra relacionada con el grado de instauración y el tamaño de la cadena del ácido producido. Este compuesto inhibitorio produce un desbalance en la membrana celular de la bacteria en cuestión y le ocasiona la muerte (Midolo *et al.*, 1995; Kao y Frazier, 1996).

En organismos acuáticos se han realizado varios estudios en los que se ha demostrado la presencia de cepas bacterianas que presentan inhibición *in vitro* contra patógenos conocidos (Bruno y Montville, 1993; Naidu *et al.*, 1999; Bjorn *et al.*, 2003), sin embargo no se ha demostrado la producción de compuestos inhibitorios bajo condiciones *in vivo* y la relevancia ecológica en la producción de compuestos inhibitorios contra otras bacterias también se desconoce.

Competencia por compuestos químicos o por energía disponible

Los compuestos químicos y la energía disponible son factores que determinan la coexistencia y dominancia de las distintas poblaciones microbianas en un mismo ecosistema (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Entre los microorganismos existe competencia por los nutrientes que hay en el medio y por ende por la energía que pudiera obtenerse de estos. Un compuesto químico importante para la mayoría de los microorganismos es el hierro, ya que las principales funciones reguladas por este elemento en las bacterias son aquellas que involucran la asimilación del mismo. Los organismos secretan sideróforos, agentes hierro-específicos de bajo peso molecular que permiten la disolución del hierro precipitado y lo hacen disponible para el crecimiento de los microorganismos. En un ecosistema, los colonizadores dominantes presentan sistemas más avanzados de sideróforos – hierro que les permite inhibir el crecimiento de otros microorganismos privándolos de este elemento (Sullivan, 2001).

Las bacterias benéficas productoras de sideróforos se pueden usar como probióticos, ya que inhiben el crecimiento de microorganismos cuya patogenicidad depende de la disponibilidad de hierro para su crecimiento (Sullivan, 2001).

Competencia por sitios de adhesión

La habilidad de adhesión a la mucosa entérica y paredes intestinales es necesaria para que una bacteria se establezca en el tracto gastrointestinal de los peces (Andlid, 1995). Durante la utilización de bacterias probióticas, la adhesión es importante para que la colonización por parte de estas bacterias se lleve a cabo, y de esta manera inhiban la fijación y proliferación de bacterias patógenas dentro del intestino. Este fenómeno se conoce como exclusión competitiva, y si esto no se lleva a cabo, las bacterias benéficas se consideran como microorganismos en tránsito y se eliminan junto con las heces, sin haber ejercido su función probiótica de manera adecuada (Gatesoupe, 1999).

Sistema inmune en los peces

Los peces se encuentran en contacto continuo con microorganismos patógenos. El primer paso para que se desarrolle un proceso infeccioso es la invasión y penetración de estos patógenos, lo que depende del estado físico y fisiológico del animal, así como de la virulencia y cantidad del patógeno presente. Una vez que las bacterias, parásitos o virus se han establecido dentro del organismo, el pez puede morir, recuperarse de la enfermedad gracias a un sistema de defensa eficiente y/o puede permanecer como un portador de la enfermedad sin presentar síntoma alguno.

Durante la vida de un organismo, se presentarán situaciones en las que se encuentra infectado por algún patógeno y su sistema inmunológico tiene que actuar inmediatamente para liberarlo de la enfermedad. La función esencial del sistema inmune en los vertebrados es la defensa contra las infecciones, la supervivencia del individuo y la preservación del medio adecuado para la realización de sus funciones corporales. El sistema inmunológico de los peces se encuentra bien desarrollado y funciona como un mecanismo de defensa celular y humoral inducido por un agente extraño llamado antígeno (Ag). Las células que intervienen en este mecanismo son leucocitos (B y T), linfocitos, granulocitos, trombocitos, macrófagos y las células citotóxicas inespecíficas. Así mismo, son necesarias células accesorias para el procesamiento y presentación antigénica y los mediadores fisiológicos para la proliferación, interacción y regulación (Anderson, 1974). Este sistema de defensa se divide en dos tipos de mecanismos:

1. **Sistema de defensa innato o natural:** lo poseen todos los seres vivos desde el nacimiento y está formado por componentes celulares y humorales. En los peces este sistema se encuentra conformado por dos factores: los factores humorales solubles (mucus, proteínas varias, etc.) y las células inespecíficas (células citotóxicas inespecíficas y células fagocíticas).
2. **Sistema inmune adquirido o específico:** involucra la producción de anticuerpos a través de un reconocimiento específico del antígeno; en él participan también elementos celulares. En los peces este sistema se encuentra conformado por la inmunidad humoral, la cual incluye anticuerpos (Ac) e inmunoglobulinas (Igs) del tipo IgM exclusivamente, y la inmunidad mediada por células que incluye linfocitos y células inmunocompetentes.

Todos los órganos linfoides y las células sanguíneas juegan un papel importante en la defensa general del organismo; sin embargo, la microflora intestinal es un elemento indispensable para la eliminación de patógenos, tanto del intestino como del organismo en general, ya que participa y mantiene tolerancia oral y actúa como un estímulo antigénico importante para la maduración del

tejido linfático del intestino. La capacidad de generar células IgA aumenta en respuesta a la estimulación antigénica, particularmente al establecimiento de esta microflora (Uma *et al.*, 1999).

Se ha determinado que las bacterias ácido lácticas pueden influir en el sistema inmune del huésped, ya que la interacción de ciertas cepas probióticas en lugares específicos del intestino puede estimular la inmunidad general del huésped, así como ciertos anticuerpos contra microorganismos patógenos. La ingestión de ciertas bacterias ácido lácticas aumenta la secreción de los niveles de IgA en los organismos actuando como inmunoestimulantes (Sullivan, 2001).

Al respecto, Bricknell y Dalmo (2005) señalan que un inmunoestimulante es “un compuesto que se presenta naturalmente y modula el sistema inmune incrementando la resistencia del hospedero en contra de enfermedades, que en la mayoría de los casos son causadas por patógenos”. En este sentido, los probióticos cumplen plenamente con este postulado, ya que las bacterias probióticas promueven los mecanismos endógenos de defensa del huésped, al mismo tiempo que la defensa no inmunológica del intestino se encuentra estabilizada por la microflora intestinal modulada a su vez por los mismos probióticos. Esto trae como resultado mejoras en las respuestas humorales inmunológicas y la formación de una barrera intestinal más persistente y eficiente. La introducción oral de microorganismos probióticos puede incrementar y mejorar la resistencia del huésped contra los microorganismos patógenos y facilitar la exclusión de los mismos del epitelio intestinal (Isolauri *et al.*, 2001; Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios con el fin de determinar la influencia que ejercen los probióticos en el sistema inmune; entre ellos se encuentra la investigación realizada por Irianto y Austin (2002), quienes alimentaron truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con dietas que contenían cepas probióticas (*Vibrio fluvialis* y *Carnobacterium sp*) y los enfrentaron posteriormente con un patógeno (*Aeromonas salmonicida*). Además de la supervivencia, midieron los cambios en el número de células blancas en sangre e intentaron identificar la presencia de suero o moco producidos para contrarrestar al microorganismo patógeno. Encontraron un aumento en el número de células blancas, sin embargo no hubo indicación de producción de ninguna de las dos sustancias esperadas.

En otra investigación, Gullian *et al.* (2004) seleccionaron cepas probióticas (*Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64), y probaron su efecto inmunoestimulante en el camarón (*Penaeus vannamei*). Las cepas elegidas mostraron antagonismo *in vitro* contra la bacteria patógena *Vibrio harveyi*. Al realizar el enfrentamiento *in vivo*, observaron que los animales alimentados con dietas que contenían *Bacillus* P64 presentaron un índice inmunológico significativamente más alto con respecto al control, y todos los animales que fueron alimentados con dietas que contenían probiótico presentaron mejores resultados en los parámetros de crecimiento.

Existen pocos estudios realizados en tilapia, sin embargo, Chen *et al.* (2004) realizaron un estudio comparativo de química sanguínea e histopatología en tilapia nilótica después de infectarla con *Vibrio vulnificus* y *Streptococcus iniae*, y exponerla a sustancias tóxicas. Después de la infección, observaron daños a nivel histopatológico sobre todo en el hígado y el riñón. En cuanto a los análisis sanguíneos realizados que incluyeron hematocrito, niveles de hierro, glucosa, sodio y

cloro como indicadores inmunológicos, se obtuvieron resultados claros que indicaron serio deterioro en la salud de los animales.

Selección de probióticos nativos para tilapia

Las investigaciones relacionadas con la ecología microbiana del tracto gastrointestinal de la tilapia nilótica y sus implicaciones son escasas, aún cuando esta especie es considerada de alta prioridad en la alimentación y desarrollo de la acuicultura nacional e internacional.

La tilapia nilótica presenta características únicas como el de soportar altos niveles de estrés en los cultivos intensivo y elevada resistencia a contraer enfermedades. Sin embargo, aún teniendo estas cualidades, actualmente en los sistemas intensivos se utilizan antibióticos para prevenir a los animales de enfermedades causadas por patógenos diversos. El uso indiscriminado de estos antimicrobianos trae como resultado un deterioro severo a la biosfera, así como un daño al consumidor final, además de afectar directamente a la economía del acuicultor debido a que la mayoría de los países han prohibido la comercialización de productos que contengan estas sustancias.

Los probióticos se han planteado como potenciales sustitutos de los antimicrobianos utilizados en cultivos intensivos, sin embargo, hasta la fecha se considera difícil establecer y atribuir los mecanismos específicos de acción de los probióticos y la manera en que afectan estos, tanto a la tilapia como al hombre. Por lo anteriormente expuesto es que en el laboratorio de Acuicultura y Nutrición Acuícola del CINVESTAV-Mérida, actualmente se realizan estudios con la finalidad de seleccionar y caracterizar bacterias aisladas del tracto gastrointestinal de la tilapia nilótica, que pudieran tener potencial como probióticos de acuerdo a sus modos de acción, para que generen efectos benéficos en el uso del alimento, en el crecimiento, en la supervivencia y en el sistema inmune de la tilapia nilótica.

Para cumplir con este objetivo, inicialmente se aislaron e identificaron bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal de tilapia nilótica. Los animales fueron sacrificados con el método de choque por enfriamiento y posteriormente se les extrajo el intestino completo de manera aséptica, el cual se pesó y se homogeneizó en una solución salina estéril al 0,85% (Sugita *et al.*, 1988). De este homogeneizado se tomaron alícuotas, se inocularon en tubos con caldo TSA y se incubaron por un período de 24 horas a 30°C. Las muestras enriquecidas se sembraron en agar De Man Rogosa (MRS; Difco) y se incubaron nuevamente a la misma temperatura para la obtención de las bacterias (Mac Millan y Santucci, 1990).

Las bacterias purificadas se identificaron con métodos tradicionales de pruebas bioquímicas y de ellas se seleccionaron dos cepas, denominadas LAC0104 y LAC0204, las cuales se utilizaron para la evaluación de antagonismos bacteriano *in vitro* contra 10 cepas de bacterias patógenas. Para tal fin se utilizó el método modificado de Dopazo de doble capa propuesto por Sugita *et al.* (1997), y posteriormente el protocolo estandarizado por el National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Alderman y Smith, 2001). Los microorganismos patógenos utilizados para evaluar el potencial antagonístico de estas bacterias fueron *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio campbellii*, *Bacillus subtilis* *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas*

Laura Escobar-Briones, Miguel A. Olvera-Novoa, César Puerto-Castillo. 2006. Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

auroginosa, Staphylococcus aureus, Serratia marcescens, Streptococcus faecalis and *Klebsiella pneumoniae*.

Para la realización de los estudios, las bacterias ácido lácticas seleccionadas se cultivaron inicialmente en caldo TSA o caldo Müller-Hinton (Difco), y se incubaron a 30°C por 48 horas. Posteriormente se centrifugaron y se separaron en solución salina estéril con una concentración de 10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC g^{-1}) para la obtención de los metabolitos inhibidores. Los niveles de inhibición de las cepas seleccionadas contra los patógenos se midieron por el tamaño de los halos obtenidos. Se utilizó tetraciclina como control positivo para la comparación de resultados.

En ambos métodos se observó que las bacterias ácido lácticas aisladas del tracto digestivo de la tilapia presentaron habilidad para inhibir el crecimiento de los diferentes patógenos al observarse halos claros y amplios en la mayoría de las placas, en especial de la cepa LAC0104. Esta bacteria fue la que inhibió *in vitro* el crecimiento de la mayor cantidad de los microorganismos a los que se expuso, sin embargo no pudo inhibir en un 100% a *Vibrio campbelli*, *Escherichia coli* y *Serratia mercescens*. Se concluyó que esta cepa produce una cantidad considerable de metabolitos antibacterianos para inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas estudiadas. En las placas control se observó un crecimiento de 100% de las nueve cepas patógenas.

Una vez establecido que existen cepas ácido lácticas en la microflora nativa de la tilapia con alta capacidad de inhibición en contra de bacterias patógenas, se procedió a determinar los efectos dañinos que pudieran tener las bacterias seleccionadas como posibles probióticos en la tilapia nilótica. Para tal fin, ambas cepas se cultivaron en caldo TSA y se incubaron a 30° C por 48 h. Posteriormente se separaron por centrifugación a 5000g por 10 minutos y se resuspendieron en solución salina estéril al 0.85% con una concentración de 10^6 UFC g^{-1} .

Dos lotes de peces se inyectaron de manera intraperitoneal e intramuscular con las suspensiones bacterianas y un lote más, utilizado como control, se inyectó también de ambas formas con solución salina estéril al 0,85%. Los tres lotes se mantuvieron en estanques separados con condiciones ambientales y de alimentación adecuadas y bajo observación.

Al comienzo y a las tres semanas después de la inyección se realizaron análisis sanguíneos (conteo de células blancas, hematocrito, proteína total y albumina), histopatológicos (hígado, páncreas, músculo e intestino) y microbiológicos (intestino) en los tres lotes de peces sin observarse ninguna diferencia significativa con respecto a los animales del control, por lo que se concluyó que ambas cepas no causaban daño a los animales inyectados.

En la industria alimenticia, farmacéutica y de transformación, en la que se utiliza el proceso de la fermentación, es importante conocer la cinética de crecimiento de un microorganismo para determinar la estabilidad de un cultivo y para obtener la mayor producción de biomasa en el menor tiempo posible. Es por ello que se evaluó la temperatura óptima de crecimiento, la estabilidad del cultivo y el tiempo mínimo de crecimiento de ambas cepas ácido lácticas. Para tal fin se utilizó el protocolo propuesto por Henebry *et al.* (1988). Se observó que ambas bacterias

Laura Escobar-Briones, Miguel A. Olvera-Novoa, César Puerto-Castillo. 2006. Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puella Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

presentaron un crecimiento máximo entre las 10 y las 14 horas y que las variaciones de temperatura realmente no afectan de manera significativa el crecimiento de estas cepas.

Actualmente se trabaja en la evaluación de parámetros de crecimiento, y variaciones generadas en el sistema inmune y en los órganos de la tilapia alimentada con dietas conteniendo las bacterias LAC0104 y LAC0204. Se realizaron bioensayos paralelos en sistemas formados por estanques con aireación. En cada estanque se colocaron 15 peces juveniles y cada tratamiento, incluidos los controles se evaluaron por triplicado.

En un bioensayo se evaluaron los parámetros de crecimiento y supervivencia, mientras que en un segundo se determinaron las variaciones generadas en el sistema inmune y en los órganos de los animales. Ambos bioensayos se realizaron simultáneamente y bajo las mismas condiciones ambientales, utilizando tilapias nilótica provenientes de un mismo lote. Los animales se acondicionaron por siete días en el sistema experimental y se alimentaron con una dieta convencional.

Se elaboraron dietas isoprotéicas, isolipídicas e isocalóricas a partir de harina de pescado como fuente proteica, aceite de pescado y aceite de soya como fuente lipídica. Las cepas probióticas se adicionaron al alimento en concentraciones entre 10^6 y 10^8 UFC g^{-1} . Como control negativo y control positivo se utilizó la misma dieta, una sin probiótico y otra con un probiótico comercial respectivamente. Se elaboró una dieta más a la que se le agregó el antibiótico tetraciclina. A todas las dietas se les realizaron análisis químicos y proximales para determinar el contenido de humedad, proteína cruda, extracto etéreo y cenizas.

Al inicio y durante el tiempo que duró el estudio, se evaluó la presencia y la viabilidad de las cepas probióticas en las dietas. La evaluación de los parámetros de crecimiento y el registro de la supervivencia, se midió mediante la realización de biometrías semanales en donde se contaron y pesaron los organismos. Para medir la digestibilidad de las dietas, a partir de la tercera semana de experimentación, se colectaron las heces de los peces mediante la técnica de sifoneo.

La evaluación de los cambios generados en los órganos de los peces por la ingestión de las dietas con probióticos se realizó sacrificando semanalmente tres organismos de cada tratamiento, incluidos los controles y el tratamiento con tetraciclina y procesándolos con técnicas histopatológicas. La evaluación de los cambios asociados a la ingestión de probióticos en el sistema inmune se realizó con pruebas de conteo diferencial de células blancas, índice de hematocrito y concentración de proteína en plasma.

Actualmente los resultados de crecimiento y las muestras de órganos y sangre se encuentran en proceso de revisión. De acuerdo con los resultados preliminares, las tilapias alimentadas con la dieta que contenía la bacteria LAC0104 presentaron un mayor crecimiento y eficiencia alimenticia, mientras que las que recibieron el probiótico comercial y la dieta control, tuvieron los resultados más bajos, indicando un efecto positivo de esta cepa como posible probiótico nativo. Se pretende que para el año 2007 se tenga una evaluación completa de estas cepas como posibles probióticos para ser utilizados en las dietas para tilapia nilótica.

Conclusiones

Existen muchas preguntas que aún necesitan respuesta, para poder tener una mejor comprensión del funcionamiento y de las manipulaciones que se pueden realizar en la flora gastrointestinal de los animales de cultivo y más específicamente en la tilapia nilótica. Existen áreas en las cuales la información es muy escasa y a la vez necesaria para poder utilizar a las bacterias como compuestos antimicrobianos, como en el modo de acción de los probióticos, en la respuesta inmune a estos microorganismos, consecuencias de las variaciones en la flora intestinal de los animales generadas por la ingestión de estos antimicrobianos y principalmente cuales son las razones o circunstancias por las que los probióticos no presentan un comportamiento igual y uniforme en los cultivos.

¿Qué se espera para el futuro? En animales terrestres se ha logrado establecer un manejo estable y adecuado de la microflora intestinal y de las bacterias benéficas, por lo que investigaciones futuras pudieran ayudar a establecer patrones firmes en el uso de los probióticos en la acuicultura. Nuevos retos surgen día con día sin embargo la odisea continúa.

Referencias

- Aguirre, G., 1993. Aplicación de probióticos en la Acuicultura. UANL, Monterrey, Nuevo León, 97 pp.
- Alderman, D. J., Smith, P., 2001. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture* 196, 211-243.
- Al-Harbi, A., Uddin, N., 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250, 566-572.
- Anderson, D. P., 1974. Immunology, Diseases of Fishes. T.F.H. Publications, 239 pp.
- Andlid, T., 1995. Ecological Physiology of Yeast Colonizing the Intestine of Fish. Department of General and Marine Microbiology, Sweden. 75pp.
- Austin, B., Al Zaharani, A.M.J., 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 33, 1-14.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I., Griffith, D.R.W., 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18, 93-96.
- Balcázar, J. L., Blas de, I., Ruíz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The roll of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114,173-186.
- Belman, A. G. R., 1999. Efectos de inclusión de una mezcla prebiótica sobre el comportamiento productivo y la flora bacteriana en la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tesis de licenciatura. CINVESTAV-IPN U Mérida, Yucatán. 1-41.
- Bjorn, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., Granly, A., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* 83 (2), 171-184.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 457-472.
- Bruno, M.E C., Montville, T.J., 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 59, 3003-3010.
- Burr, G., Gatlin, D., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 36, 425-436.
- Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology* 19, 21-41.

- Chang C., Liu, W., 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strain, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing Edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 25, 311-315.
- Chen, C.Y., Wooster, G.A., Bowser, P.L., 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture* 239, 421-443.
- Directiva 96/23/CE, 1996. Medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. Diario Oficial No. L/25 de 23/05/1996, Comunidad Europea, Bruselas, pp 0010-0032.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S., Gruss, A., 2000. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *International Journal of Food Microbiology* 55, 83-86.
- FAO, 2004. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma, Italia, 168 pp.
- FFDCA; 21 U. S. C., 2003. Guidance No. 78: Consideration of the Human Health Impact of the Microbial Effects of Antimicrobial New Animal Drugs Intended for Use in Food-Producing Animals. Federal Food Drug and Cosmetic Act, USA. pp 301-392
- Fitzsimmons, K., 2000. Tilapia aquaculture in Mexico. In: Costa-Pierce, B.A., Rakocy, J.E. (eds.), *Tilapia Aquaculture in the Americas*, Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, pp.171-183.
- Fouz, B., Alcaide, E., Barrera, R., Amaro, C., 2002. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Aquaculture* 212, 21-30.
- Fredrickson, A.G., Stephanopoulos, G., 1981. Microbial competition. *Science* 213, 972-979.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Garriques, D., Arévalo G., 1995. An evaluation of the production and use of live bacteria isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post larvae in Ecuador. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA United States, 53-59.
- Gatesoupe, F. J., 1999. The use of probióticos in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gildberg, A., Johansen, A., Bogald, J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysed and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 138, 23-34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Ghadus mohua*) fry with lactic acid bacteria and inmuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 167, 103-113.
- Gram, I., Lovold, T., Nielsen, J., Mechiorson, J., Spanggaard, B., 2001. *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199, 1-11.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodríguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Henebry, M.S., Gorden, R.W., Buck, D.H., 1988. Bacterial population in the gut of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *The Progressive Fish-Culturist* 50, 86-92.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25, 333-342.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S., 2001. Probiotics: Effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (suppl), 444S-450S.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemist* 70, 337-349.
- Klaenhammer T.R., Kullen, M.J., 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.
- Kao, C.T., Frazier, W.C., 1996. Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology* 14, 251-255.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W., 2002. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216, 193-201.

- Lara-Flores, M., 2003. Aislamiento e identificación de microorganismos nativos del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con potencial probióticos. Tesis de doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. México, 135 pp.
- Lategan, M., Torpy, J.F.R., Gibson, L.F., 2004. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture* 240, 19-27.
- Lea Mayer, B.R., Walsh, M.A., Brock, J.A., Fujioka, R.S., 1997. Cold stress-induced changes in the aerobic heterothropic gastrointestinal tract bacteria flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology*, 770-780.
- Mac Millan, J.R., Santucci, T., 1990. Seasonal trends in intestinal bacterial flora of farm-raise channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 2, 217-222.
- Makridis, P., Martins, S., Tsalavouta, M., Catalão Dionisio, L., Kotoulas, G., Magoulas, A., Dinis, M.T., 2005. Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. *Aquaculture Research* 36, 1619-1627.
- Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F., Grayson, M.L., 1995. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acids bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 475-479.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 13-126.
- Netherwood, T.H., Gilbert, J., Parker, D.S., O'Donnell, G., 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in avian gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5134-5138.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198, 229 – 236.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lillius, E., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology* 15, 443-452.
- NOM EM-006-PESC-2004. Norma Oficial Mexicana de Emergencia que Establece los Requisitos de Sanidad Acuicola para la Producción de Crustáceos Acuáticos Vivos, Muertos, sus Productos y Subproductos, así como para su Introducción a los Estados Unidos Mexicanos . Diario Oficial de la Federación, tercera sección, México.
- O'Sullivan, M.G., Thornton, G., O'Sullivan, G., Collins, J.K., 1992. Probiotic bacteria: Myth or reality? *Trends of Food Scientist Technology* 309-314.
- Pal, D., Gupta, C.D., 1992. Microbial pollution in water and its effect on fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 4, 32-39.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satho, S., Sugita, S., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 243, 241-254.
- Park, S. C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K., Nakai, T., 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1416-1422.
- Poot-Poot, W. A., 2001. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) bajo condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. México, 46 pp.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177-203.
- Ringo, E., Storm, E., 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture and Fisheries Management* 25, 623-629.
- Ringo, E., Olsen, R. E., 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227, 395-415.
- Robertson, P.A.W., Dowd, C.O., Burrells, C., Williams, P., Austin, B., 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243.
- Sakata, T., Sugita, H., Mitsuoka, T., Kakimoto, D., Kadota, H., 1980. Isolation and distribution of obligate anaerobic bacteria from the intestines of the freshwater fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46, 1249-1255.
- Sakata, T., Kakimoto, D., 1984. Dominant bacteria of the aerobic microflora in tilapia intestine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50, 489-493.

- Sakata, T., Kojima, T., Fujieda, M., Takahashi, M., Michibata, T., 2003. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria *in vitro*. *Proceeding of Nutrition Society* 62, 73-80.
- Salinas, I., Cuesta, A., Ángeles-Esteban, M., Meseguer, J., 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbruekii* and *Bacillus subtilis*, single or combined on gilthead sea bream cellular innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 67-77.
- Sklan, D., Prag, T., Lupatsch, I., 2004. Structure and function of the small intestine of the tilapia *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus* (Teleostei, Cichlidae). *Aquaculture Research* 35, 350-357.
- Smith, B. J., Smith, S. A., Tengjaroenkul, B., Lawrence, T. A., 2000. Gross morphology of the adult intestinal tract of the tilapia fish *Oreochromis niloticus* L. *Cells Tissues Organs* 166, 294-303.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E.B., Phipper, C.B., Martinussen A., Slierendrech, W. J., Gram, L., 2001. The probiotic potential against vibriosis indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3(12), 755-765.
- Stoskopf, M.K., 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company. U.S.A. 882 pp.
- Sugita, H., Tsunohara, M., Ohkoshi, T., Deguchi, Y., 1988. The establishment of an intestinal microflora in developing Goldfish (*Carassius auratus*) of culture ponds. *Microbial Ecology* 15, 333-334.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., Deguchi, Y. 1997. *Vibrio* sp. strain NM 10 isolated from the intestine of a Japanese coastal fish has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4986-4989.
- Sullivan, D.J.O., 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 49, 1751 -1760.
- Suzuki, K., Kodama, Y., Mitsuoka, T., 1989. Stress and intestinal flora: a review. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 8, 23-38.
- Swann, M.M., 1969. *Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine*. H.S.M.S.O., London, U.K.
- Tannock, G.W., 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents and probiotics. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. (eds.), *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. Chapman and Hall, International Thomson Publishing, New York, pp. 434-455.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, J., Vázquez-Juárez, R., Lesel, R., 2002. Effect of yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Disebtrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204, 113-123.
- Uma, A.J., Abraham, M.J., Prince, J., Sundararaj, V., 1999. Effect of probiotic feed supplement on performance and disease resistance of Indian white shrimp *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Journal of Aquaculture of the Tropics* 14(2), 159-164.
- Vandenbergh, P., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products, and interference with microbial growth. *FEMS Microbiological Review* 2, 221 -238.
- Vázquez, J. A., González, M.P., Murado, M. A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245, 149-161.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64, 655-671.
- Whitman, A. K., MacNair, N.G., 2004. *Finfish and shellfish bacteriology manual, techniques and procedures*. Blackwell Publishing Company, USA, 258 pp.