

Probióticos y prebióticos en acuicultura

Luz Mariela Mosquera Rentería

Tecnoparque nodo Rionegro, lmosquera48@misena.edu.co

Liliana Maria Cardona Bermúdez

Tecnoparque nodo Rionegro, lilianacardona@misena.edu.co

Catarina Passaro Carvalho

Tecnoparque nodo Rionegro, cpassaro@sena.edu.co

Carlos Mario Rivera Narváez

Tecnoparque nodo Rionegro, cmrivera@sena.edu.co

1. Que son los probióticos?

La palabra se origina de dos vocablos griegos “pro” y “bios” que significan “para la vida” (Castro y Rovetto, 2006; Gismondo et al., 1999). El termino probiótico fue introducido por Parker (1974), y fue definido originalmente como “organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal microbiano”. Fuller 1989, lo define como microorganismos vivos que adicionados en el alimento mejoran el balance microbiano del organismo huésped. Por otro lado los probióticos también pueden definirse como células microbianas que una vez suministradas entran en el tracto gastrointestinal y se mantienen vivas contribuyendo a mejorar la salud de los animales (Gatesoupe et al., 1999).

En términos generales podemos definir los probióticos como suplementos alimenticios con microorganismos vivos que ingeridos periódicamente en las cantidades adecuadas, contribuyen al balance microbiano intestinal, permitiendo controlar el crecimiento de otros microorganismos perjudiciales mediante la estimulación del sistema inmune, acidificando el contenido intestinal y aportando bacterias benéficas, además de levaduras que aportan vitaminas y enzimas bacterianas que contribuyen con la mejor degradación del alimento consumido (Guevara et al., 2001; Eissa y Abou; 2014; Van Hai, 2015).

La aplicación de los probióticos en la acuicultura, se relaciona con el control biológico frente a enfermedades infecciosas, la sobrevivencia, el aumento del crecimiento y la actividad enzimática, la mejora de la respuesta inmunitaria frente al estrés y la mejora de la calidad del agua (Sorroza, 2012; Gupta y Dhawan, 2013; Newaj et al., 2014).

Los probióticos comúnmente usados en acuicultura, pertenecen a diferentes grupos como las bacterias ácido lácticas y los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*. Igualmente, aunque de menor interés los géneros *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Flavobacterium*, entre otros; al igual que algas unicelulares y levaduras (Ringo et al., 2010)

2. Papel de los microorganismos en los organismos vivos

El conjunto de microorganismos intestinales (microbiota) juega un papel importante e influye de manera directa sobre la nutrición y salud de los animales, por lo que su alteración afecta el estatus fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, crecimiento, desarrollo general y la calidad final del producto. La microbiota en animales acuáticos no existe como una entidad absoluta, sino que hay una interacción constante entre el ambiente y el pez, de tal forma que los peces y los microorganismos comparten el mismo ecosistema (Al-Harbi y Uddin, 2005).

La microbiota y la barrera gastrointestinal se desarrolla gradualmente desde el nacimiento, en peces a diferencia de los animales terrestres (la flora microbiana materna es la fuente inicial de colonización bacteriana), la colonización bacteriana está determinada por su contacto con el ambiente circundante y es influenciada por la ingesta de alimento, la secreción hormonal y la absorción de nutrientes, la presencia de proteínas y enzimas digestivas (Isolauri et al., 2001; Escobar et al., 2006; Sorroza 2012).

Inicialmente cepas anaerobias facultativas dominan el intestino y posteriormente la diversidad de la microbiota dependerá del tipo de dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica y el estatus del organismo (Isolauri et al., 2001), así como de los microorganismos presentes en el agua y el sistema de cultivo donde se críen lo que permitirá que se dé un equilibrio entre la gran diversidad de bacterias benéficas y patógenas, cuyos géneros y especies se encuentran directamente afectados por el ambiente (Escobar et al., 2006).

La microbiota presenta funciones metabólicas, tróficas y protectoras. La metabólica tiene como propósito colaborar en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo. La trófica fomenta el crecimiento y diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo; mientras que la función protectora se desarrolla desde el nacimiento, actuando como la primera línea de defensa contra microorganismos

externos patógenos oportunistas (Escobar et al., 2006; Sorroza, 2012). Por lo que se hace necesario conocer la microbiota de los animales de cultivo y el efecto que podrían tener diferentes factores sobre la misma (Escobar et al., 2006).

Se ha demostrado que la microbiota de los peces controla la proliferación bacteriana en el intestino, el desarrollo metabólico de los nutrientes y la respuesta inmune innata a través de la regulación de la expresión de más de 200 genes (Rawls et al., 2004).

Actualmente se considera a la microflora intestinal de los peces como específica, la cual se vuelve estable al llegar a la etapa adulta. En los peces de agua dulce los grupos predominantes en el tracto gastrointestinal pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pleisomonas*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* mientras que en los peces marinos la flora está dominada por los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (Cahill, 1990).

3. Elección de cepas probióticas

La selección de cepas probióticas es un proceso complejo, debido a las constantes alteraciones y cambios en la estructura y funcionamiento de las comunidades microbianas, causado por la interacción de estas con el medio ambiente (Verschuere et al., 2000). Algunas investigaciones sugieren que los probióticos deben ser seleccionados del propio huésped sobre el cual van a ser empleados, minimizando de esta manera los efectos provocados por la diferencias entre los ambientes en que se desenvuelven los organismos (Duwat et al., 2000). Aunque existen trabajos donde se evidencia el efecto benéfico de bacterias aisladas de otros organismos sobre el bienestar de los peces.

Igualmente diversos autores mencionan que la mejor opción para la elección de la cepa probiótica adecuada, es a través del aislamiento del tracto gastrointestinal de la misma especie (Van Hai, 2015), por lo que se hace necesario tener un conocimiento claro de la flora y la ecología microbiana del intestino para así poder identificar aislar y caracterizar los microorganismos presentes, y poder seleccionar aquellos que por sus efectos beneficiosos puedan tener el efecto esperado. Un amplio rango de microorganismos incluidas bacterias gram negativas y gram positivas han sido empleadas como probióticos en acuicultura, tales como, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, and *Saccharomyces species* (Nayak, 2010), para el caso de las tilapias las

bacterias más comunes encontradas son los generos *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteraceae*, *Vibrio*, *Citrobacter*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus farciminis*, y *Streptococcus* (Escobar et al., 2006; Van Hai, 2015). De la misma manera las bacterias ácido lácticas son utilizadas comúnmente en el cultivo de tilapia (Apun et al., 2009).

Para que una cepa sea considerada como probiótica, esta debe cumplir con las siguientes características:

- a. Efecto antagonista frente a diferentes patógenos
- b. Resistencia al pH y a la bilis: capacidad de esta de llegar viva al intestino, mantenerse y proliferar una vez ingerida, las bacterias seleccionadas como probióticos deben resistir las enzimas de la cavidad oral (lisozima, amilasa), el pH bajo del estómago, así como las concentraciones de sales biliares y jugos pancreáticos secretados en el intestino delgado (Escobar et al., 2006; Sorroza, 2012)
- c. Inocuidad: La cepa debe estar exenta de patogenicidad y ser incapaz de ocasionar daño al huésped, ofreciendo efectos beneficiosos en la interacción con el mismo (Irianto y Austin, 2002).
- d. Capacidad de adhesión a células intestinales: La capacidad de adherirse al epitelio intestinal le permitirá competir y sobrevivir en dicho ecosistema (constante movimiento y flujo), ya que solo las que poseen dicha capacidad pueden colonizar el intestino, formando parte de la primera barrera defensiva de los peces frente a los patógenos. Si no se posee esta capacidad, esta se convierte en un organismo transitorio (Escobar et al., 2006; Vine et al., 2006).

4. Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos administrados con el alimento o en el agua de cultivo tienen un efecto beneficioso en el huésped al modificar la comunidad microbiana asociada al mismo o su ambiente, garantizando una mejora en el uso del alimento o un aumento en el valor nutricional del mismo, además de incrementar la respuesta inmune del hospedero a enfermedades (Verschuerer et al., 2000), mejora el crecimiento, reduce las malformaciones, mejora la morfología del intestino y el equilibrio microbiano (Merrifield, 2010). Al colonizar de manera adecuada estos microorganismos al huésped, contrarrestan la proliferación de microorganismos patógenos en el intestino, contribuyendo a estimular el sistema inmune y mantener el ambiente

de cultivo adecuado mejorando la calidad del agua (Nikoskelainen et al., 2001).

El efecto beneficioso de las bacterias dependerá de la exactitud con la que lleguen al lugar donde deben actuar y en el que ejerzan su poder inhibitorio (Verschuere et al., 2000), ejerciendo su acción protectora en el huésped a través del empleo de diferentes mecanismos (Verschuere et al., 2000; Sorroza, 2012). Estos mecanismos pueden presentarse de manera individual o en conjunto, pero las consecuencias para el organismo serán normalmente la supresión de microorganismos patógenos, alteración del metabolismo bacteriano y estimulación del sistema inmunológico (Escobar et al., 2006).

Producción de compuestos inhibidores: La producción de compuestos antibacterianos bactericidas o bacteriostáticos es común entre bacterias y hongos; de ellos solo algunos son de amplio espectro de acción y son utilizados en el control de agentes patógenos. La presencia de microorganismos que producen sustancias inhibitoras en el intestino constituye una barrera a la proliferación de patógenos oportunistas (Naiud et al., 1999). Dichas sustancias pueden ser bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y la producción de ácidos orgánicos de cadena corta y diacetilo que producen alteraciones en el pH (Vine et al., 2006).

Bacteriocinas: Son metabolitos peptídicos de síntesis ribosomal, siendo la nisina y la pediocina producidas por las bacterias ácido lácticas. Estos metabolitos ejercen actividad letal bacteriana a través de receptores definidos ubicados en la superficie externa de las bacterias, seguida por cambios metabólicos, fisiológicos y morfológicos que trae como consecuencia la muerte del patógeno, debido a la destrucción de la membrana citoplasmática por la formación de poros que causan la salida de compuestos o alteran la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Montville y Chen, 1998).

Peróxido de hidrógeno: Las bacterias ácido lácticas utilizan el oxígeno para formar peróxido mediante la flavoproteína oxidasa o peroxidasa, el cual es liberado al medio, siendo altamente tóxico para otras bacterias que comparten su mismo hábitat. El peróxido de hidrógeno puede inhibir o destruir bacterias por medio de la inactivación de enzimas (Bjorn et al., 2003). El efecto bactericida del peróxido se atribuye a su potente poder oxidante en la célula bacteriana y a la destrucción de estructuras moleculares básicas de las proteínas (Jang et al., 2008).

Alteración del pH por la producción de compuestos orgánicos de cadena corta:

Algunas levaduras (*S. cerevisiae* y *D. hansenii*) y bacterias, en su mayoría ácidos lácticos, son evaluadas como probióticos en acuicultura por ser consideradas inocuas y por su capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos de cadena corta (ácidos acético, fórmico y ácido láctico y etanol) a partir de carbohidratos simples, lo cual produce un aumento en la acidez intestinal que limita el crecimiento de bacterias patógenas (Klewicki y Klewicka, 2004; Balcázar et al., 2007). Estos ácidos causan cambios del pH intracelular que 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). Y así, por ejemplo, algunos estudios in vitro han demostrado que el ácido acético y el ácido láctico son los responsables de la disminución del crecimiento de *Carnobacterium piscícola*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio pelagius* y *Vibrio splendidus* (Vázquez et al., 2005).

Diacetilo: Algunos géneros bacterianos como *Enterococcus* pueden producir diacetilo a partir del citrato siguiendo la vía del piruvato, que es el metabolito intermediario. Este compuesto, que es producido en la fermentación no ácida, presenta un potente efecto inhibitorio frente a microorganismos Gram positivos y negativos, siendo muy utilizado en la industria alimenticia (Vallejo et al., 2008).

Producción de ácidos grasos: Algunos microorganismos producen ácidos grasos con actividad antibacteriana, la cual se encuentra relacionada con el grado de insaturación y tamaño de la cadena del ácido producido. Este compuesto inhibitorio produce un desbalance en la membrana celular de las bacterias y le ocasiona la muerte (Midolo et al., 1995; Kao y Frazier, 1996).

Competición por energía disponible o por compuestos químicos:

En un ecosistema abierto como el de los peces, entre los microorganismos existe competencia por los nutrientes que hay en el medio y por la energía que pudiera obtenerse de estos. El compuesto químico más importante para la mayoría de los microorganismos es el hierro, y su captación es a través de sideróforos, por lo que privándoles de este elemento se podría inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables cuya virulencia dependa de la disponibilidad de hierro para su crecimiento. En un ecosistema los colonizadores dominantes presentan sistemas avanzados de sideróforos – hierro que les permite inhibir el crecimiento de otros organismos privándolos de este elemento (O’Sullivan, 2001). Las

bacterias benéficas productoras de sideróforos se pueden usar como probióticos, ya que inhiben el crecimiento de otros microorganismos que dependen de la disponibilidad de hierro para su crecimiento (O'Sullivan, 2001).

El carbono es otro elemento que necesitan los microorganismos para su metabolismo. En la microbiota intestinal de los peces predominan organismos heterotróficos que compiten por sustratos orgánicos como el carbono, pero se necesita un mayor conocimiento de los factores que rigen la microbiota para su manipulación (Verschuere et al., 2000).

Competición por lugares de fijación: el establecimiento de la microbiota es un componente clave para promover la salud de los animales por mecanismos competitivos (Tapia-Paniagua et al., 2010). La mucosa intestinal en los peces representa uno de los principales lugares en los que las bacterias presentes en el medio ambiente interactúan con la microbiota intestinal, y así, los tejidos linfoides asociados al intestino desarrollan mecanismos para diferenciar entre los microorganismos patógenos y comensales (Pérez et al., 2010).

La capacidad de adhesión y posterior colonización de bacterias benéficas al mucus intestinal forma la primera barrera de defensa contra la proliferación de bacterias patógenas. Este fenómeno se conoce como exclusión competitiva, y si esto no se lleva a cabo, las bacterias benéficas son consideradas como microorganismos en tránsito y son eliminadas junto con las heces sin haber ejercido su función probiótica de manera adecuada. Debido a esto, este mecanismo se considera como pre-requisito para seleccionar una cepa como probiótica (Nikoskelainen et al., 2001).

Este mecanismo de adhesión y posterior exclusión de patógenos puede estar basado en factores físico-químico como la hidrofobicidad, o factores específicos donde intervienen las adhesinas que se unen a células receptoras presentes en el epitelio intestinal, y que están presentes en la superficie de las cepas probióticas (Salminen et al., 1996).

Aumento de la respuesta inmune: El sistema inmune de los peces presenta dos tipos de respuesta, la innata y la adquirida. La respuesta inmune innata o sistema de defensa no específico está formado por una serie de factores humorales solubles (mucus, proteínas, etc), células citotóxicas inespecíficas y células fagocíticas, y constituyen la primera barrera defensiva de los peces frente a los patógenos (Nayak et al., 2007). La segunda línea de defensa de los peces es la

inmunidad adquirida o respuesta inmune específica, pudiendo ser una respuesta celular y/o humoral, basada en una serie de cambios adaptativos que tiene lugar dentro de las poblaciones linfoides (linfocitos T y B) (Sorroza, 2012; Eissa y Abou, 2014). 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 (O'Sullivan, 2001, Nayak, 2010)

Muchos de los inmunoestimulantes usados en acuicultura como probióticos son bacterias vivas o inactivadas, esporas, y componentes de la pared celular de bacterias y levaduras (Irianto y Austin, 2002). Estas sustancias tienen un efecto positivo en las funciones que regulan el sistema inmune del hospedador, debido a que las alteraciones de estas funciones por un desequilibrio en la microbiota pueden contribuir al desarrollo de enfermedades (Pérez et al., 2010; Aly et al., 2008).

En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la utilización de varias cepas probióticas como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* administrada en la dieta durante 2 semanas, activó el sistema inmune y protegió a los peces frente a enfermedades bacterianas como la lactococosis y la forunculosis, mostrando porcentajes de sobrevivencia entre 97-100% (Brunt et al., 2007; Vendrell et al., 2007).

Mejora de la calidad del agua: La contaminación del agua ya sea por excretas o por desechos de alimentos son uno de los principales factores que afectan los sistemas productivos, por lo que diferentes estudios resaltan la importancia de mantener la calidad de esta mediante el empleo de cepas probióticas (Biorremediadoras) para garantizar el bienestar de los organismos allí cultivados, convirtiendo la materia orgánica en CO₂, ya que controlan los niveles de amoníaco y nitritos (por lo que reciben el nombre de bacterias nitrificantes). Entre los géneros encontrados se destacan *Bacillus*, *Phenibacillus*, *Nitrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* y *Rhodopseudomonas* (Antony y Philip, 2006; Zhou et al., 2010).

Contribución enzimática para la digestión: Diversos estudios han evaluado bacterias extraídas del sistema digestivo de los peces, en las que se observa que su empleo aumenta la actividad enzimática del hospedador y por tanto la digestibilidad de proteínas, almidón y lípidos, mejorando la calidad de agua (Gupta y Dhawan, 2013). Tovar

et al (2004), observaron un incremento en la actividad enzimática y concentración de tripsina y lipasas en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con levadura viva (*Debaryomyces hansenii*), permitiendo la maduración temprana del sistema digestivo de estas. Así mismo se reporta que el empleo en nutrición acuícola de cepas del genero *Leuconostoc* sp aumenta la actividad enzimática del intestino y contribuye con el crecimiento y sobrevivencia de larvas de esturión (*Acipenser persicus*) (Askarian et al., 2011).

Aporte de macronutrientes: Dentro del aporte de nutrientes y producción de metabolitos secundarios, la producción de vitamina B12 es el más estudiado (Sugita et al., 1991). Esta vitamina ha sido aislada de los microorganismos presentes en el tracto digestivo de especies como trucha (*Oncorhynchus mykiss*), bagre (*Ictalurus punctatus*), carpa (*Cyprinus carpio*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), lo que sugiere que no se requiere la administración de esta en la dieta. Igual sucede con la vitamina K que puede ser suministrada por la microbiota intestinal de trucha (*Salvelinus fontinalis*) (Poston, 1964).

Vine et al (2006), sugiere el empleo de microorganismos probióticos para la producción de ciertos lípidos que contribuyen en la dieta de especies como trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) alterando la morfología del sistema digestivo.

Las bacterias ácido lácticas son las más empleadas como probióticos en acuicultura, debido a la capacidad de inhibir el crecimiento o matar otras bacterias relacionadas estrechamente con ellas (antagonismo láctico), debido a la producción de compuestos inhibitorios como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, al igual que metabolitos como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, con los que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Sorroza, 2012; Escobar et al., 2006).

5. Empleo de probióticos en la prevención de enfermedades

La cada vez más creciente producción en acuicultura y el aumento de los sistemas intensivos de producción han causado que la industria se enfrente a la proliferación de enfermedades causadas en su mayoría por una depresión del sistema inmune de los peces producto del estrés o por la gran cantidad de materia orgánica encontrada en dichos sistemas productivos que afecta la calidad del agua. El incremento de las enfermedades causados por bacterias y

parásitos, se ha intentado resolver empleando desinfectantes y drogas antimicrobianas, produciendo resultados limitados y un elevado costo para los productores (Escobar et al., 2006). El uso indiscriminado de estos medicamento, principalmente los antibióticos ha causado la aparición de bacterias resistentes, al igual que la acumulación de residuos de los mismos en los productos finales que terminan afectando a los consumidores finales y afectando la microflora gastrointestinal de los organismos y la ecología microbiana de los sistemas de cultivo (Verschuerer et al., 2000; Al-Harbi y Uddin, 2005).

Muchos países están regulando el empleo de la mayoría de los antibióticos usados en la acuicultura para la prevención y tratamiento de enfermedades, al igual que los usados como promotores de crecimiento (Swann, 1969; Escobar et al., 2006).

Se ha demostrado que la manipulación de las comunidades microbianas juega un papel importante e influye directamente sobre la nutrición y salud general de los animales reduciendo o eliminando la incidencia de enfermedades y surgiendo como una alternativa al empleo agentes quimioterapéuticos (Sorroza, 2012) antibióticos y drogas, por lo que se han denominado a los probióticos como amigos del medio ambiente (Wang et al., 2008). Aunque es amplia la cantidad de especies de microorganismos con actividad probiótica, dentro de los más empleados podemos encontrar bacterias de los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Roseobacter* y *Zooshikella*, al igual que levaduras, bacteriófagos y algas unicelulares (*Thalassiothrix weissii* y *Skeletonema costatum*) (Ringo et al., 2010), los cuales actúan como fagos o a través de la producción de toxinas que inhiben el crecimiento de especies como *Vibrio anguillarum* entre otros (Nakai y Park, 2002; Sorroza, 2012, Abbass et al., 2010). Aunque es amplia la cantidad de microorganismos empleadas, los beneficios esperados difieren significativamente de una especie a otra, así como la etapa y sistemas del cultivo, afectando el rendimiento de los mismos (Sorroza, 2012).

Estudios en tilapia han aislado e identificado bacterias ácido lácticas del tracto intestinal en condiciones de cultivo, encontrando como genero dominante a *Enterococcus*, de las bacterias ácido láctica aisladas se obtuvo *Enterococcus durans*, la cual en pruebas in vitro presentó acción inhibitoria contra dos bacterias patógenas (*Aeromonas hydrophila* y *Spingomonas paucimobilis*) (Poot, 2001),

mientras que en otra prueba de aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas se obtuvo *Streptococcus* sp como organismo más viable, que al utilizarse como probiótico en dietas para tilapia logro disminuir el estrés, aumentando el crecimiento y causando un efecto benéfico sobre el medio ambiente, al disminuir los microorganismos patógenos circundantes (Lara-Flores, 2003).

Tabla 1. Probióticos usados en acuicultura actúan sobre patógenos específicos (Tomado de Akhter et al., 2015)

Categoría	Genero probiótico (patogeno sobre el que actúa)
Bacterias gram positivas	<i>Arthrobacter</i> (q, s), <i>Bacillus</i> (b, d, q, x), <i>Brevibacillus</i> (m), <i>Brochothrix</i> (a), <i>Clostridium</i> (b, n), <i>Carnobacterium</i> (n, r, x), <i>Enterococcus</i> (e, q, s), <i>Kocuria</i> (n, r), <i>Lactobacillus</i> (c, g, j, l), <i>Lactococcus</i> (n), <i>Leuconostoc</i> (g), <i>Microbacterium</i> (n), <i>Micrococcus</i> (b, c), <i>Pediococcus</i> (h, n), <i>Rhodococcus</i> (n), <i>Streptococcus</i> (q), <i>Streptomyces</i> (q, u), <i>Vagococcus</i> (n) y <i>Weissella</i>
Bacterias gram negativas	<i>Aeromonas</i> (a, c, g, l, w), <i>Agarivorans</i> , <i>Alteromonas</i> (p, t, v), <i>Bdellovibrio</i> (b), <i>Burkholderia</i> , <i>Citrobacter</i> (b), <i>Enterobacter</i> (f), <i>Neptunomonas</i> (p, t, v), <i>Phaeobacter</i> (n, s), <i>Pseudoalteromonas</i> (n, t, v), <i>Pseudomonas</i> (c, h, n, q), <i>Rhodobacter</i> (n), <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Roseobacter</i> (n), <i>Shewanella</i> (i), <i>Synechococcus</i> (q), <i>Thalassobacter</i> , <i>Vibrio</i> (c, n, q, x) y <i>Zooshikella</i> (l)
Candidatos no bacterias	
Bacteriofago	<i>Myoviridae</i> (k) y <i>Podoviridae</i> (k)
Microalgas	<i>Dunaliellasalina</i> , <i>D. tertiolecta</i> , <i>Isochrysisgalbana</i> , <i>Navicula</i> , <i>Phaedactylumtricornutum</i> y <i>Tetraselmisuecica</i>
Levadura	<i>Debaryomyceshansenii</i> , <i>Phaffiarhodozyma</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (b, l), <i>S. exiguous</i> y <i>Yarrowialipolytica</i>

Patógenos: *a / A. bestiarum, b / A. hydrophila, c / A. salmonicida, d / Edw. ictaluri, e / Edw. tarda, f / F. psychrophilum, g / Lc. Garvieae, h / Photobacterium damsela subsp. damsela, i / Ph. damsela subsp. piscicida, j / Ps. fluorescens, k / Ps. plecoglossicida, l / Streptococcus sp. / St. iniae, m / Vibrio spp., n / V. anguillarum, o / V. campbellii, p / V. coralliilyticus, q / V. harveyi, r / V. ordalii, s / V. parahaemolyticus, t / V. pectenicida, u / V. proteolyticus, v / V. splendidus, w / V. tubiashii, x / Y. ruckeri.*

6. Métodos de aplicación y administración

Alimento o aditivos en el agua: Los probióticos pueden ser administrados vía alimento o en el agua de cultivo (Merrifield et al., 2010), la administración de probióticos a peces de cultivo se suministra a través de la alimentación, como aditivo para alimento balanceado, como: pellets, gránulos y microencapsulación, o como bioencapsulación de alimento vivo enriquecido con probiótico. Los aditivos para el alimento balanceado son los más empleados en acuicultura, debido a que la mayoría de probióticos están diseñados para ser mezclados con los alimentos. Los probióticos también pueden ser administrados directamente en el agua de cultivo (Apún et al., 2008). No existe evidencia que pruebe cual método de aplicación es mejor (Van Hai, 2015).

Solo o combinado: Los probióticos pueden ser administrados solos o en combinación (Kesarcodi et al., 2008), la administración de suplementos ya sea solos o mezcla han dado resultados positivos, la mezcla de microorganismos puede brindar beneficios adicionales al hospedero, mientras que los administrados solos son menos efectivos (Verschuere et al., 2000), aunque no siempre la mezcla de microorganismos trae beneficios al hospedero (Iwashita et al., 2015).

Dosificación: Un amplio rango de dosificaciones ha sido aplicado para el uso de probióticos en acuicultura de los cuales la mezcla con alimento en dosis de 105 – 109 UFC g⁻¹ es la manera más común de transmitirlos a los peces (Van Hai, 2015). Mientras que las bacterias probióticas son utilizadas en altas concentraciones, almidones y levaduras son utilizados a razón de unos pocos gramos por kilogramo de alimento. De hecho, el nivel óptimo de levadura de panadería viva fue de un gramo por kilogramo de alimento para el cultivo de tilapia nilotica (Abdel et al., 2008).

Tiempo de duración: Los probióticos administrados en los cultivos de tilapia tienen un rango de duración entre 15 y 94 días, aunque existen experimentos con tiempos de duración prolongados que van desde los 3 a los 8 meses, desafortunadamente no existe evidencia

probada del efecto del tiempo de administración de los probióticos en los sistemas de cultivo (Van Hai, 2015).

7. Que son prebióticos

Se ha definido prebiótico como una serie de ingredientes alimentarios no digestibles como fibras y azúcares (sacáridos) (Akhter, Memon y Mohsin, 2015; Song et al., 2014; Merrifield et al., 2010; Zhou, Buentello y Gatlin, 2010; Talpur, Munir, Mary y Hashim, 2014; Mona et al., 2015), que pueden ser usados en acuicultura con múltiples fines:

- Promover la abundancia de bacterias benéficas en el tracto gastrointestinal o mejorar su actividad
- Contribuir indirectamente a mejorar la producción, a mantener la salud y aumentar la resistencia a enfermedades en animales acuáticos
- Estimular el sistema inmune
- Proveer una fuente de energía para las bacterias intestinales
- Mejorar la sobrevivencia en el cultivo
- Mejorar la ultraestructura de la mucosa intestinal
- Afectar positivamente la concentración de las proteínas del cuerpo
- Aumentar la eficiencia de utilización del alimento y mejorar crecimiento

Merrifield et al. (2010), sugieren que estos prebióticos deben de resistir todas las condiciones del tracto gastrointestinal como acidez, hidrólisis enzimática y la absorción; además permitir ser fermentados por bacterias presentes en el intestino y estimular de manera selectiva el crecimiento de microorganismos que mejoran las condiciones de salud del animal o que aumenten su actividad. Adicionalmente los prebióticos deben de regular la viscosidad del intestino, tener bajo valor calorífico e incorporarse fácilmente en las raciones alimenticias; no producir efectos residuales y generar un ambiente antiadhesivo para microorganismos peligrosos en el intestino (Ganguly, Paul y Mukhopadhyay; 2010).

Los sacáridos pueden ser clasificados dependiendo del tamaño de la molécula o del grado de polimerización que tenga; así, un monosacárido tiene una sola unidad y un oligosacárido o polisacáridos tiene entre 3 y 10 unidades (Akhter, Memon y Mohsin; 2015). Algunos son: fructo-oligosacáridos (FOS), manano-oligosacáridos (MOS), galacto-oligosacáridos (GOS) o transgalacto-oligosacáridos (TOS), lactulosa, inulina y β -glucanos.

Los FOS y la inulina son obtenidos a partir de algunas plantas fanerógamas (es decir, aquellas que tienen flores visibles); entre ellas la cebolla, el ajo, las papas, la banana, el yacón, la chicoria, la alcachofa, trigo y cebada (Lavanda, Saad y Colli, 2011). Son carbohidratos del grupo de los fructanos y poseen polímeros de fructosa con enlaces β -(2,1) y en su extremo una molécula de glucosa. Los FOS son comúnmente obtenidos de manera natural a partir de la chicoria o sintéticamente de la oligofructosa. El método de obtención de la inulina, es similar al utilizado con la remolacha azucarera para la obtención de sacarosa (Velasco y Rebolé, 2014). Ambos compuestos difieren por el grado de polimerización; en el caso de la inulina, varía de 2 a 60 unidades, mientras que los FOS tienen alrededor del 10% de las cadenas de fructanos con un grado de polimerización entre 2 y 5. De esta manera, estos últimos se pueden obtenerse también mediante una enzima indoinulinasa llevando a cabo una hidrólisis parcial de la inulina (Dominguez, Vásquez, Ramos; 2009).

Los MOS son complejos glucomano proteínicos presentes en diferentes formas, que comúnmente tienen un azúcar y enlaces glucosídicos de tipos diferentes alfa-1,6-glucósido, alfa-1,2-glucósido, alfa-1,3-glucósido o beta-1,3-glucósido. Son obtenidos por hidrólisis enzimática de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y de hongos como los *Paecilomyces* y el *Ganoderma lucidum*. Recientemente se ha incluido su uso en salmónidos (Merrifield et al., 2010).

Los galacto-polisacáridos son obtenidos a partir del suero de la industria quesera mediante el empleo de una enzima denominada β -galactosidasa, que es ampliamente estudiada y de fácil disponibilidad. El proceso de transgalactosilación, se presenta bajo condiciones específicas de temperatura, pH, concentración de sustrato y fuente enzimática. Pueden producirse mezclas de tri, tetra o pentasacáridos con enlaces β 1-3, 1-6 y 1-4 (Dominguez, Vásquez, Ramos; 2009). Los GOS son moléculas de bajo peso molecular, solubles, contribuyen a una mejor absorción de calcio y magnesio, son estables a bajos pH y altas temperaturas a diferencia de otros oligosacáridos.

Según Chirido et al. (2011), la lactulosa es un disacárido sintético formado por monosacáridos de galactosa y fructosa. Es de color amarillo. Su ingesta protege de microorganismos patógenos vía disminución del pH por formación de ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético y el ácido láctico.

El β -glucano es un polisacárido no almidonoso de alto peso molecular formado por polímeros de glucosa que forman largas cadenas ramificadas unidas por enlaces β (1-4) y β (1-3). Hacen parte de la pared celular de hongos y levaduras; de bacterias y plantas, abundantes en los cereales como la cebada y la avena (Pizarro, Ronco y Gotteland; 2014)

8. Mecanismo de acción de los prebióticos y su actividad inmunológica

Existe reporte que los prebióticos pueden beneficiar los organismos que los consumen potenciando el crecimiento de biota benéfica que se encuentra en el intestino o estimulando directamente su sistema inmune innato (Seong et al., 2014). En el primero de los casos actúan como un factor de crecimiento específico que impide que otros microorganismos patógenos se adhieran al intestino por competencia por los glucoconjugados que se encuentran a nivel superficial en las células del intestino, modificar el pH intestinal con la producción de ácidos grasos de cadena corta, aumentar la producción de moco e inducir la producción de citoquinas (Akhter, Memon y Mohsin; 2015). Ganguly, Paul y Mukhopadhyay (2010), sugieren que es necesario identificar cuales prebióticos promueven el crecimiento de bacterias específicas en las diferentes especies de importancia comercial. La inducción de los ácidos grasos volátiles de cadena corta, es un indicativo de la presencia de bacterias benéficas y adicionalmente les proporciona energía que pierden en los procesos de inhibición de las bacterias patógenas.

Con respecto al segundo caso, se ha descrito que los compuestos prebióticos cuando son suministrados en peces inducen diferentes tipos de respuesta inmune (Seong et al., 2014):

- **Actividad fagocítica:** El sistema inmunológico de los peces está conformado por los glóbulos blancos llamados leucocitos, que son un grupo de células con diferentes funciones y formas que se encargan de defender el organismo cuando es atacado por agentes infecciosos. Algunas de estas células llevan a cabo el mecanismo conocido como fagocitosis que es el proceso mediante el cual un microorganismo es ingerido por la célula para su destrucción. Cuando el microorganismo ingresa al pez, y alcanza sitios donde están estas células, hay contacto con unos receptores ubicados en la membrana conocidos como TLRs que se encargan de reconocer patrones moleculares que se encuentran en las bacterias identificándolos como “dañinos”;

una vez esto ocurre, son envueltos completamente por los fagosomas y llevados a los lisosomas, que son una organela de la célula que contiene enzimas que son capaces de destruir la bacteria por un mecanismo llamado proteólisis (rompimiento de proteínas). Posteriormente, unas células llamadas macrófagos disponen residuos de este rompimiento denominados antígenos y son dispuestos en la superficie del Complejo Mayor de Histocompatibilidad para que sean reconocidos por las células T y se establezca memoria inmunológica, para que en próximos ataques se dé una respuesta efectiva. Los prebióticos entonces promueven que la actividad fagocítica se haga de manera más eficiente, reflejado en un mejor estado de salud del animal y evitando el uso indiscriminado de antibióticos.

- **Activación de macrófagos:** Los macrófagos son células mononucleadas que se originan de monocitos derivados de la médula ósea y se diferencian en el tejido conectivo. Son encargados de degradar material particulado y del proceso de fagocitosis. Además de matar patógenos, contribuyen al sistema inmune innato para generar las repuestas máximas. El interferón gamma es el encargado de activar los macrófagos y una vez esto sucede, induce la liberación de citoquinas que son proteínas de bajo peso molecular que regulan el mecanismo de la inflamación. Pueden liberar el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) que activa la producción de otros mediadores de respuesta inmune como algunas interleucinas (IL1-IL2 y otras) cuya acción es proinflamatoria o antiinflamatoria. Funciones similares son también llevadas a cabo por las denominadas células dendríticas.
- **Estallido respiratorio:** Los microorganismos patógenos o materiales que son fagocitados, son degradados con la ayuda de sustancias como el peróxido de hidrógeno y los aniones de hipoclorito, que tienen actividad microbicida, que producen los mismos macrófagos. Este proceso involucra un aumento significativo en la demanda de oxígeno y el consumo de energía intracelular que es conocido como el estallido respiratorio o el estallido oxidativo. Como consecuencia hay producción de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales hidroxilo.
- **Fosfatasa ácida:** Es un conjunto de enzimas que se reparten en diferentes órganos y tipos celulares del organismo, cuya actividad se optimiza a pHs ácidos. La también llamada

fosfomonoesterasa, se encarga de eliminar los grupos fosfato de las moléculas fosforiladas activando las proteasas. Vía este mecanismo, es que se lleva a cabo la actividad bactericida. Esta enzima se almacena en los lisosomas de los macrófagos o células dendríticas. Una vez se activan y se fusionan los endosomas de pH bajo con los lisosomas, se activa la enzima y aumenta la acidez interna en la organela. Entre mayor sea la actividad de la fosfatasa ácida, mayor es la activación de los macrófagos, mayor actividad fagocítica y se presenta el estallido respiratorio.

- **Actividad del complemento en suero:** En la respuesta inmune, el sistema del complemento juega un papel especial ya que genera una de las respuestas más potentes, donde el conjunto de moléculas plasmáticas que lo conforman, llevan a cabo diferentes cascadas bioquímicas para potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis celular, una vez son activadas por anticuerpos de antígenos específicos, superficies de algunas células microbianas o lectinas que son compuestos proteicos unidos específicamente a carbohidratos. En su fase efectora, es decir, donde implica destrucción del antígeno; contribuye a la lisis principalmente de bacterias gramnegativas, virus encapsulados, parásitos y células nucleadas; mediante complejos de ataque a la membrana (MAC). El complemento se fragmenta y algunos de estos fragmentos se unen a células específicas y la interacción resulta en la liberación de histamina producto de la degranulación y consecuentemente hay una inflamación en el sitio de la infección. Posteriormente se da el proceso de opsonización, donde algunos antígenos cubiertos con la opsonina se unen a células fagocíticas, mejorando el proceso. Luego se da la neutralización del patógeno y la eliminación de complejos inmunes que se da posterior a su traslado hasta el hígado o el bazo.
- **Actividad fenoloxidasa:** En algunos invertebrados marinos incluyendo el camarón, se diferencian 3 tipos de hemocitos: hialinos, de gránulos pequeños o semigranulados y de gránulos grandes o granulares; los cuales circulan en la hemolinfa y ante un proceso de infección, responden con mecanismos como la fagocitosis, el encapsulamiento y la formación de nódulos (Hernández, 1995). En estos organismos, existe un sistema de reconocimiento de agentes extraños y defensa que se conoce como la profenoloxidasa, la cual se activa mediante una enzima a polifenoloxidasa como respuesta a estímulos que reciben los hemocitos a nivel de membrana celular originados principalmente

por sacáridos, peptidoglucanos y lipopolisacáridos. Este sistema de complemento en invertebrados está compuesto por enzimas tirosinasa, catecolasas y lacasas. Una vez se activa la polifenoloxidasa, hay un potenciamiento de la actividad microbiocida como consecuencia del estallido respiratorio y la fagocitosis a partir de la opsonización.

- **Actividad lisozima:** la lisozima es una enzima que cataliza la hidrólisis de los peptidoglucanos presentes en las paredes celulares de las bacterias rompiendo enlaces β (1-4) del ácido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Los macrófagos son los principales productores de esta pero adicionalmente se puede encontrar de forma abundante en mucus, suero y huevos de animales marinos.
- **Nivel de anticuerpos en suero:** Los anticuerpos son proteínas producidas por los linfocitos B en respuesta al reconocimiento de antígenos microbianos específicos. Estos actúan uniéndose a la superficie del antígeno para prevenir la unión con células blancas; facilitan la fagocitosis a través de la opsonización y se encargan de activar el sistema del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- **Hematocrito y número de leucocitos:** Dado que el conteo de hematocrito incrementa cuando hay una respuesta inmune, este puede ser utilizado como una herramienta para determinar el estatus inmunológico del organismo; reflejando el número total de células de la línea roja, de la línea blanca y las plaquetas. Se deben analizar las variaciones en linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos.

9. Consideraciones finales

Del'Duca et al. (2013) recomiendan el empleo de la técnica de FISH por sus siglas en inglés (hibridación fluorescente “in situ”) como herramienta potencial para caracterizar la dinámica de las bacterias con potencial probiótico y su eficiencia en el control de bacterias patógenas en los sistemas de producción acuícola. Adicionalmente las investigaciones se deben centrar en el empleo de técnica molecular para obtener una mayor comprensión de los modos de acción.

La preparación de los alimentos juega un papel importante, suministrando las condiciones adecuadas a los probióticos,

para un buen desempeño en el huésped. La comprensión de las condiciones adecuadas (temperatura, tiempo de duración) de preparación y almacenamiento son una necesidad fundamental para el entendimiento de las cepas probióticas, por lo que para aumentar la viabilidad o sobrevivencia de los probióticos se deben realizar pruebas de almacenamiento. Adicionalmente se deben realizar más investigaciones acerca de las proporciones de mezcla de probióticos, la capacidad de inhibición entre especies probióticas (cepas) y diferentes condiciones ambientales, si se quieren obtener buenos resultados.

El efecto de los probióticos y los prebióticos se ve potenciado cuando se dan al animal conjuntamente (Simbióticos). Varios trabajos han sido llevados a cabo para evaluarlos. Algunos se mencionan a continuación. Mona et al. (2015), en juveniles de *Procambarus clarkii* encontraron mejoras en crecimiento y parámetros inmunes al suplementar dietas con un probiótico comercial (Biogen), alginato de sodio como prebiótico y *Allium sativum* y *Cynodon dactylon* como inmunoestimulantes. En dedinos de *Channa striata*, fueron evaluados tasa de crecimiento, parámetros inmunológicos y la resistencia a *Aeromonas hydrophila* al suministrar levadura, *L. acidophilus* y β -glucano; encontrándose mejoras en cada una de las variables (Talpur et al., 2014). En el caso de híbridos de lubina a los que se les proporcionó prebiótico comercial GroBioticR-A y levadura de cerveza bajo condiciones de infección con *Mycobacterium marinum*; Li y Gatlin (2005), evidenciaron moderada pero significativa protección contra el patógeno y mejoras en el crecimiento.

Aunque en el mercado existen infinidad de marcas de probióticos y prebióticos, se hace necesario verificar la calidad de cada uno de ellos, idoneidad de los mismos especie específicos y verificación de las condiciones de desempeño de los mismos ya que el empleo de estos no garantiza siempre los resultados deseados.

Con todo esto los probióticos y prebióticos continúan siendo una alternativa viable para el empleo en acuicultura ya que mejora dos factores claves en el cultivo de especies acuícolas, como son crecimiento y resistencia a enfermedades.

Referencias Bibliográficas

Abbass, A., Sharifuzzaman, S. M., y Austin, B. (2010). Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish diseases*, 33(1), 31-37.

Aguirre, G. (1993). Aplicación de probióticos en Acuicultura. Tesis Doctoral. UANI, Monterrey- Nuevo León, 97.

Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A. M., y Ismael, N. E. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280(1), 185-189.

Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., y Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish y shellfish immunology*, 45(2), 733-741.

Al-Harbi, A. H., y Uddin, N. (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3), 566-572.

Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., y Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish y Shellfish Immunology*, 25(1), 128-136.

Antony, S. P., y Philip, R. (2006). Bioremediation in shrimp culture systems. *NAGA*, 29(3/4), 62.

Apún-Molina, J. P., Santamaría-Miranda, A., Luna-González, A., Martínez-Díaz, S. F., y Rojas-Contreras, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8), 887-894.

Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., y Ringø, E. (2011). The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme

activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 488-497.

Budde, B. B., Hornbæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., y Koch, A. G. (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.

Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., y Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30(10), 573-579.

Cahill, M. M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial ecology*, 19(1), 21-41.

Castro, L. Á., y De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4), 308-314.

Chirido, F. G., Menéndez, A. M., Pita Martín de Portela, M. L., Sosa, P., Toca, M. D. C., Trifone, L., y Vecchiarelli, C. (2011). Prebióticos en salud infantil. *Archivos argentinos de pediatría*, 109(1), 49-55.

Del'Duca, A., Cesar, D. E., Diniz, C. G., y Abreu, P. C. (2013). Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture*, 388, 115-121.

Domínguez-Vergara, A. M., Vázquez-Moreno, L., y Montfort, G. R. C. (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo AC Hermosillo, Sonora, México.

Escobar-Briones, L., Olvera-Novoa, M. A., y Puerto-Castillo, C. (2006). Avances sobre la Ecología Microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. Avances de Nutrición acuícola. VII Simposium Internacional de Nutrición acuícola, 15-17.

Eissa, N., y Abou-ElGheit, E. (2014). Dietary Supplementation Impacts of Potential Non-Pathogenic Isolates on Growth Performance, Hematological Parameters and Disease Resistance in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Journal of Veterinary Advances*, 4(10), 712-719.

Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365-378.

Hernández López, J. (1995). Activación del sistema fenoloxidasa de hemocitos de camarón café (*Penaeus californiensis*) y su efecto en la fagocitosis (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).

Ganguly, S., Paul, I., y Mukhopadhyay, S. K. (2010). Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: a review. *The Israeli J Aquacult–Bamidgheh*, 62, 130-138.

Gatesoupe, F. J., Lambert, C., y Nicolas, J. L. (1999). Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of applied microbiology*, 87(5), 757-763.

Gismondo, M. R., Drago, L., y Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International journal of antimicrobial agents*, 12(4), 287-292.

Guevara, J., Mateus, R., y Quintero, L. (2001). Evaluación de la utilización de probióticos en la fase de levante del ciclo producción de la mojarra roja (*Oreochromis sp.*). Universidad Nacional.

Gupta, A., y Dhawan, A. (2013). Probiotic based diets for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Indian Journal of Fisheries*, 60(1).

Van Hai, N. (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. *Fish y shellfish immunology*.

Jang, H. H., Ann, S. H., Kim, M. D., y Kim, C. W. (2008). Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae* (vol 43, pg 225, 2008). *PROCESS BIOCHEMISTRY*, 43(9), 1018-1018.

Irianto, A., y Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6), 333-342.

Isolauri, E., Sütas, Y., KanKaanpää, P., Arvilommi, H., y Salminen, S. (2001). Probiotic: Effect on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 444-450.

Iwashita, M. K. P., Nakandakare, I. B., Terhune, J. S., Wood, T., y Ranzani-Paiva, M. J. T. (2015). Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish y shellfish immunology*, 43(1), 60-66.

Kao, C. T., y Frazier, W. C. (1966). Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Applied microbiology*, 14(2), 251-255.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.

Klewicki, R., y Klewicka, E. (2004). Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnology letters*, 26(4), 317-320.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., y López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1), 193-201.

Lavanda, I., Saad, S. M. I., y Colli, C. (2011). Prebiotics and their effect on calcium bioavailability. *Revista de Nutrição*, 24(2), 333-344.

Li, P., y Gatlin, D. M. (2005). Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*, 248(1), 197-205.

Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøgwald, J., ... y Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1), 1-18.

Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F., y Grayson, M. L. (1995). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), 475-479.

Mona, M. H., Rizk, E. S. T., Salama, W. M., y Younis, M. L. (2015). Efficacy of probiotics, prebiotics, and immunostimulant on growth performance and immunological parameters of *Procambarus clarkii* juveniles. *The Journal of Basic y Applied Zoology*, 69, 17-25.

Montville, T. J., y Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 511-519.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R., y Clemens, R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical reviews in food science and nutrition*, 39(1), 13-126.

Nakai, T., y Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in microbiology*, 153(1), 13-18.

Nayak, S. K., Swain, P., y Mukherjee, S. C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish y shellfish immunology*, 23(4), 892-896.

Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish y Shellfish Immunology*, 29(1), 2-14.

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., y Austin, B. (2014). Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1-11.

Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., y Ouwehand, A. C. (2001). Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2430-2435.

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

Pérez, T., Balcázar, J. L., Peix, A., Valverde, A., Velázquez, E., de Blas, I., y Ruiz-Zarzuela, I. (2011). *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1894-1898.

Pizarro, S., Ronco, A. M., y Gotteland, M. (2014). β -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?. *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 439-446.

Poot-Poot, W. A. (2001). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) bajo condiciones de cultivo (Doctoral dissertation, Tesis de licenciatura. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. México).

Poston, H. A. (1964). Effect of dietary vitamin K and sulfaguanidine on blood coagulation time, microhematocrit, and growth of immature brook trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 26(2), 59-64.

Rawls, J. F., Samuel, B. S., y Gordon, J. I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4596-4601.

Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., y Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41(4), 451-467.

Salminen, S., Isolauri, E., y Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 347-358.

Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., y Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish y shellfish immunology*, 40(1), 40-48.

Sorroza, L. (2012). Propuesta de nuevas cepas probióticas para su uso en acuicultura.

Sugita, H., Miyajima, C., y Deguchi, Y. (1991). The vitamin B 12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, 92, 267-276.

O'Sullivan, D. J. (2001). Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1751-1760.

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.

Talpur, A. D., Munir, M. B., Mary, A., y Hashim, R. (2014). Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture*, 426, 14-20.

Tapia-Paniagua, S. T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., y Moriño, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial ecology*, 60(2), 310-319.

Tovar-Ramírez, D., Infante, J. Z., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., y Vázquez-Juárez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234(1), 415-427.

Vázquez, J. A., González, M., y Murado, M. A. (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245(1), 149-161.

Vendrell, D., Balcazar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., y Muzquiz, J. L. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 31(4), 337-345.

Velasco, I., Rebolé, A. (2014). La inulina y los fructooligosacáridos

en la alimentación del ganado porcino (I). Av. Tecnol. porc XI (1-2): 21-29.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and molecular biology reviews, 64(4), 655-671.

Vine, N. G., Leukes, W. D., y Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. FEMS microbiology reviews, 30(3), 404-427.

Wang, Y. B., Li, J. R., y Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. Aquaculture, 281(1), 1-4.

Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., y Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish physiology and biochemistry, 36(3), 501-509.

Zhou, Q. C., Buentello, J. A., y Gatlin, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture, 309(1), 253-257.