

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS
(BAL) OBTENIDAS DE *Oreochromis niloticus* (TILAPIA) CULTIVADAS EN
JAULAS FLOTANTES EN EL LAGO DE ILOPANGO EL SALVADOR

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
JOSE ROBERTO PALACIOS QUINTANILLA
ENRIQUE ALEXANDER RIVAS HERNANDEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

JULIO 2019

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORAS DE AREA EN: MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

DOCENTES ASESORES

MSc. Norma Esthela Molina Velásquez

Lic. Juan Salvador Gaviota González Olmedo

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo de graduación realizado en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador ha sido una meta que hemos superado gracias a todas las personas que nos han guiado y asesorado en el largo recorrido de nuestra investigación.

Agradecemos en primer lugar a nuestros asesores de tesis: MSc. Norma Esthela Molina Velásquez y Lic. Juan Salvador Gaviota González Olmedo, por el conocimiento brindado y por su dedicación a esta investigación que sin su ayuda no se hubiese llegado al final.

Agradecemos también al tribunal calificador por brindarnos su ayuda en cada una de las etapas de este proyecto. Gracias por sus opiniones honestas y acertadas.

Para finalizar, agradecemos a nuestra familia y amigos por habernos apoyado siempre, por no perder la fe en nosotros y siempre confiar en que podíamos superar los obstáculos que se presentaran.

DEDICATORIA.

Gracias a Dios por darme la oportunidad de concluir mi carrera académica, pues él ha sido quien nos ha dado las fuerzas para llegar hasta este momento, doy gracias también a mi madre Verónica Quintanilla y mi padre Nazario Palacios quienes nos apoyaron en cada etapa de este logro y de igual forma a mi amigo Alexander Rivas por su apoyo incondicional a pesar de las muchas dificultades que se nos presentaron él siempre se mantuvo firme y me daba ánimos para seguir.

Roberto Palacios.

DEDICATORIA.

Esta tesis está dedicada primeramente a Dios por haberme guiado en el camino y haberme brindado las fuerzas necesarias para culminar con la meta. A mi madre Deysi Hernández por haberme apoyado desde el inicio hasta el final en todos los aspectos de mi vida, por hacer hasta lo imposible para que no me faltara nada y sobre todo porque les demostramos a todos que pudimos. Mami, sin usted nada de esto fuera posible. A mi papá José Rivas por aconsejarme y creer en mí siempre. A mis hermanos gracias por todo lo brindado siempre, pero en especial a mi hermano Oscarito que tanto apoyo me ha brindado.

A mi compañero de tesis Roberto, gracias por todos estos años de amistad, por ser un gran compañero, amigo y hermano. Gracias por ayudarme siempre en los momentos difíciles que pasamos y darme palabras de aliento para seguir adelante. Sin duda no me equivoqué al elegirte como compañero.

A mis primos y familia que siempre me han dado su apoyo. Karlita, siempre te querré a pesar de la distancia. A todos mis amigos y colegas que están y estuvieron para mí siempre. Anyo, Oscar, Prix, Nidi, Karla los quiero mucho.

Por último, agradecer a todas las personas que de una u otra forma me ayudaron a culminar mi carrera de manera directa o indirecta. Gracias a todos.

Alexander Rivas.

INDICE GENERAL

	Pág. N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xxi
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	24
CAPITULO III	
3.0 Marco Teórico	26
3.1 Generalidades de la especie <i>Oreochromis niloticus</i>	26
3.2 Taxonomía	27
3.3 Origen y distribución	27
3.3.1 Distribución como especie invasora	28
3.4 Impacto ecológico	29
3.5 Situación actual del cultivo de tilapias a nivel mundial	31
3.6 Situación actual de la tilapia en la economía nacional	32
3.7 Características biológicas de la tilapia	33
3.7.1 Anatomía de la tilapia	33
3.7.2 Hábitat	34
3.7.3 Clima	34
3.7.4 Hábitos Alimenticios	35
3.8 Cultivo en jaulas	35
3.9 Generalidades de las principales bacterias patógenas en la tilapia	36
3.9.1 <i>Streptococcus</i>	36
3.10 Enfermedades de la tilapia producidas por bacterias	36
3.10.1 Estreptococosis	37

3.11 Género lactobacilo	38
3.11.1 Características de las bacterias acidolacticas (BAL)	38
3.11.2 Características morfológicas	39
3.11.3 Pared celular	39
3.11.4 Bacteriocinas producidas por bacterias ácidolacticas	40
3.11.4.1 Clasificación de las bacteriocinas	41
3.11.4.2 Mecanismo de acción	41
3.11.5 Características de las colonias	43
3.11.6 Condiciones ambientales	44
3.11.6.1 pH	44
3.11.6.2 Oxígeno	44
3.11.6.3 Temperatura de crecimiento	45
3.12 Métodos de análisis	45
3.12.1 Prueba de hemólisis en sangre humana	45
3.12.2 Cinética de crecimiento	46
3.12.3 Recuento de UFC ml ⁻¹	46
3.12.4 Tinción de Gram	46
3.12.5 Tolerancia a pH	47
3.12.6 Actividad antibacteriana	48
3.12.7 Determinación actividad enzimática extracelular	48
3.12.7.1 Prueba de degradación de la caseína (proteasas)	48
3.12.7.2 Prueba de hidrólisis de la gelatina (proteasas)	48
3.12.7.3 Prueba de hidrólisis de tween 80 (lipasas)	49
3.12.8 Requisitos a cumplir para considerar una bacteria como probiótica.	50
3.13 Probióticos	51

3.13.1 Mecanismo de acción de los probióticos.	52
3.13.1.1 Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal	52
3.13.1.2 Producción de antibióticos.	53
3.13.1.3 Producción de compuestos benéficos.	53
3.13.1.4 Estimulación de la inmunidad.	53
3.13.2 Mejora de la calidad de agua	54
3.13.3 Bacterias ácidolácticas como probióticos	54
3.13.4 Caracterización de cepas candidatas a probióticos	54
3.13.5 Efectos benéficos de los probióticos	55
3.13.6 Desventajas de los probióticos	56
3.14 Georreferenciación del lugar	56
3.14.1 Datos geográficos	56
3.14.2 Antecedentes de la calidad del agua en el lago de Ilopango	57
3.15 Calidad del agua	57
3.15.1 Microorganismos indicadores de contaminación del agua	58
3.15.2 Principales bacterias utilizadas como indicadores	58
3.15.2.1 Coliformes totales	58
3.15.2.2 Coliformes fecales	59
3.15.2.3 <i>Escherichia coli</i> .	59
3.15.2.4 Bacterias heterótrofas	60
3.16 Métodos de análisis	60
3.16.1 Número más probable (NMP)	60
3.16.2 Prueba de coliformes fecales	60

3.16.3 Recuento en placa	61
CAPITULO IV	
4.0 Diseño Metodológico	63
4.1 Tipo de Estudio	63
4.2 Investigación Bibliográfica.	63
4.3 Investigación de campo	64
4.3.1 Universo	64
4.3.2 Muestras	64
4.3.3 Método estadístico para la determinación del número de muestras.	64
4.3.4 Muestreo	65
4.3.4.1 Muestreo para el análisis microbiológico de las tilapias.	65
4.3.4.2 Muestreo para el análisis microbiológico del agua	65
4. 4 Parte experimental	66
4.4.1 Para muestras de tilapias	67
4.4.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)	67
4.4.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica de los microorganismos aislados.	67
4.4.3 Caracterización de los microorganismos aislados.	68
4.4.3.1 Prueba de hemólisis en sangre humana	68
4.4.3.2 Cinética de crecimiento bacteriano de los aislados de BAL	69

4.4.3.3	Conteo de UFC ml ⁻¹ de BAL	69
4.4.3.4	Tinción de Gram, morfología microscópica, arreglo Celular	70
4.4.3.5	Prueba de tolerancia a pH.	70
4.4.3.6	Actividad antibacteriana	71
4.4.3.7	Determinación actividad enzimática extracelular	71
4.4.3.8	Prueba de degradación de la caseína (Proteasas)	72
4.4.3.9	Prueba de degradación de la gelatina (Proteasas)	72
4.4.3.10	Prueba de hidrólisis de Tween 80 (Lipasas)	73
4.4.3.11	Adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo	73
4.4.4	Para muestras de agua	74
4.4.4.1	NMP (número más probable)	74
4.4.4.2	Interpretación de resultados	75
4.4.4.3	Recuento en placa	75
4.4.4.4	Determinación de <i>Streptococcus</i> en agua	76
CAPITULO V		
5.0	Resultados y Discusión de Resultados	77
5.1	Aislamiento de bacterias acidolácticas a partir del tracto Gastrointestinal de <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilapia), recolectadas de jaulas flotantes del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango, El Salvador	78
5.2	Características macroscópicas, microscópicas, y pruebas	81

realizadas de bacterias acidolacticas aisladas.	
5.3 Identificación de cepas aisladas mediante el sistema de galerías estandarizado API 50 CHL.	83
5.4 Caracterización de bacterias ácidolácticas aisladas del tracto intestinal de la tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> por diferentes procedimientos microbiológicos (prueba de hemólisis en sangre humana, cinética de crecimiento bacteriano, prueba de tolerancia a pH, actividad antibacteriana, actividad enzimática extracelular y conteo de UFC/mL.	86
5.4.1 Prueba de hemólisis en sangre humana	86
5.4.2 Cinética de crecimiento.	87
5.4.3. Conteo de unidades formadoras de colonias UFC/mL.	89
5.4.4 Prueba de tolerancia a pH.	91
5.4.5 Actividad antibacteriana.	92
5.4.6 Determinación de actividad enzimática extracelular.	94
5.4.7 Adhesión adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo.	95
5.4.8 Resumen de la caracterización probiotica.	96
5.5 Análisis del agua	99
5.5.1 Determinación de coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por el método de número más probable (NMP).	99

5.5.2	Conteo de bacterias heterótrofas.	100
5.5.3	Determinación de <i>Streptococcus</i> en agua.	103
CAPITULO VI		
6.0	Conclusiones	105
CAPITULO VII		
7.0	Recomendaciones	108
	Bibliografía	
	Glosario	
	Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	26
2. Distribución geográfica original de <i>Oreochromis niloticus</i>	28
3. Distribución geográfica como especie invasora	29
4. Producción de tilapias a nivel mundial.	32
5. Anatomía de <i>Oreochromis niloticus</i>	34
6. Morfología microscópica de <i>Lactobacilos spp.</i>	39
7. Mecanismos de acción de las bacteriocinas.	43
8. Diferencias estructurales las bacterias Gram (+) y Gram (-).	47
9. Mecanismos de adhesión de las bacterias probióticas.	52
10. Representación gráfica de la cinética de crecimiento	89
11. Representación gráfica del conteo de UFC/mL realizados a las cepas aisladas.	90
12. Porcentaje de adhesión de los aislados a los diferentes solventes.	87
13. Representación de grafica de la tolerancia a diferentes pH que poseen cada microorganismo aislado.	88
14. Gráfica de valores registrados de Coliformes Totales, Fecales y <i>Escherichia coli</i> a partir de muestras de agua recolectadas del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango.	90
15. Gráfica de valores registrados de Bacterias Heterótrofas a partir de muestras de agua recolectadas del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango.	102

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Producción anual (kg) de tilapia por acuicultura en El Salvador.	33
2. Pesos obtenidos de las tilapias por talla.	79
3. Pesos de vísceras y porción de tubo digestivo de las tilapias.	80
4. Muestras con crecimiento de Lactobacilos.	81
5. Morfología macroscópica, microscópica y pruebas para Lactobacilos	82
6. Resultados fermentación de azúcares cepa J14T13 y J19T37 (Test API 50 CHL a 24 y 48 horas)	84
7. Tipo de hemólisis de los aislados bacterianos.	87
8. Recopilación de las absorbancias de las cepas aisladas.	88
9. Resultados obtenidos de la actividad antibacteriana evaluada contra <i>Streptococcus</i> .	93
10. Resultados obtenidos de la actividad extracelular de los microorganismos aislados.	95
11. Porcentaje de adhesión de los aislados a diferentes solventes	96
12. Tabla resumen de las pruebas realizadas para la caracterización probiótica a las cepas aisladas.	97
13. Resultados de coliformes totales, fecales, <i>E. coli</i> por NMP y recuento de bacterias heterótrofas por placa vertida. Bedalton en el lago de Ilopango.	101

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°	Pág. N°
1. Ubicación geográfica del cantón San Agustín, San Pedro Perulapán, Cuscatlán.	115
2. Esquema de muestreo de tilapias del lago de Ilopango	117
3. Esquema de Aislamiento de bacterias ácidolácticas (BAL)	119
4. Esquema de caracterización de los microorganismos aislados	121
5. Esquema de prueba de hemólisis en sangre	123
6. Esquema de cinética de crecimiento bacteriano de los aislados de BAL.	126
7. Esquema de conteo de UFC mL ⁻¹ de BAL.	128
8. Esquema de tinción de Gram, morfología microscópica, arreglo celular.	130
9. Esquema de prueba de tolerancia a pH	132
10. Esquema de actividad antibacteriana.	134
11. Esquema de determinación de actividad enzimática extracelular	136
12. Prueba de determinación enzimática.	138
13. Adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo.	142
14. Esquema de Número Más Probable.	146
15. Esquema de recuento en placa.	149
16. Esquema de determinación de <i>Streptococcus</i> en agua.	151
17. Recolección de tilapias en proyecto "Bedalton", lago de Ilopango.	153
18. Toma de pesos de muestras de tilapia, posterior extracción de vísceras e inoculación en medio MRS.	155
19. Colonias características de <i>Lactobacillus</i> en agar MRS.	157
20. Tinción de Gram, morfología y arreglo celular.	159

21. Cosecha de bacterias acidolácticas.	161
22. Proceso realizado en la prueba de hemólisis.	163
23. Proceso realizado en la prueba de cinética de crecimiento	165
24. Esquema de diluciones utilizado para determinar la cantidad de UFC en una suspensión de microorganismo estandarizada.	167
25. Resultado de conteo bacteriano.	169
26. Proceso realizado en prueba de actividad antibacteriana.	171
27. Resultados obtenidos en prueba de actividad enzimática extracelular.	173
28. Resultados de prueba de adhesión a xileno, tolueno y cloroformo.	175
29. Resultado de prueba de tolerancia a pH.	177
30. Identificación de bacterias ácidolácticas por el sistema API.	179
31. Resultados del número más probable de las muestras de agua.	181
32. Pruebas confirmativas para determinar la presencia de E. coli.	183
33. Resultados de la identificación con el sistema API.	185

ABREVIATURAS

S.S:	Solución salina
mos:	Microorganismos
St:	<i>Staphylococcus</i>
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
mg:	Miligramos
Kg:	Kilogramos
kDa:	Kilo Dalton
H₂S:	Ácido sulfhídrico
CO₂:	Dióxido de carbono
UFC:	Unidad formadora de colonia
BAL:	Bacterias acidolácticas
NMP:	Número más probable
NaCl:	Cloruro de sodio
MRS:	Medio Man, Rogosa y Sharp
TSB:	Tryptic Soy Broth
TSA:	Trypticase Soy Agar
TSC:	Tryptose Sulfite Cycloserine
rpg:	Revoluciones por gramo
rpm:	Revoluciones por minuto
g/L:	Gramos por litro
Ab:	Absorbancia
nm:	Nanómetros
UV:	Ultravioleta

RESUMEN

En El Salvador el cultivo de tilapias es fuente de empleo, especialmente para la población residente del Cantón San Agustín, jurisdicción de San Pedro Perulapán a orillas del Lago de Ilopango. Sin embargo la presencia de patógenos oportunistas induce al uso desmedido de antibióticos en los medios de cultivo de las tilapias, contribuyendo a la resistencia bacteriana. Esto traería como consecuencia una alta tasa de muerte de las tilapias y por ende pérdidas económicas para el productor. En la presente investigación se aislaron y caracterizaron bacterias acidolácticas del tracto gastrointestinal de tilapias para ser utilizadas como probióticos como alternativa del fortalecimiento y mejoramiento de la salud de las tilapias. La investigación se realizó en un periodo comprendido de junio y julio del 2017, y consistió en capturar 24 tilapias de diferentes tallas, que se procesaron y analizaron en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, y de estas solamente el 20.83% de las muestras se logró aislar bacterias acidolácticas; cultivadas, cosechadas y sometidas a pruebas específicas como: grado de hemólisis en sangre humana, cinética de crecimiento bacteriano, conteo de UFC/ mL de BAL, tolerancia a pH, actividad antibacteriana, determinando el potencial probiótico. La cepa con código J14T13 en condiciones *in vitro* fue la que cumplió con todas las pruebas características para ser utilizada como probiótica. La bacteria identificada fue el *Lactobacillus rhamnosus*, ampliamente utilizada en la industria como probiótica y se empleará para el mejoramiento de la resistencia a enfermedades de las tilapias; como beneficio de la implementación sería una disminución de muertes por patógenos y mejores ganancias para los acuicultores. Se recomienda promover y realizar investigaciones en el país utilizando otros patógenos que puedan encontrarse en condiciones de cultivo de tilapia en jaulas flotantes, y aislar y caracterizar bacterias con potencial probióticos, ya que en la actualidad no existe mucha información de este tema a nivel nacional.

CAPITULO I.
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

En El Salvador en los últimos años ha aumentado el cultivo de tilapia, debido a las excelentes características que presenta la tilapia como: adaptabilidad al medio donde se encuentran, alta productividad y resistencia a enfermedades.

Los acuicultores de tilapia en jaulas flotantes se enfrentan a diferentes problemas que hacen que el nivel de productividad esperado no sea alcanzado durante los ciclos de cultivo, es por eso que se debe considerar varias alternativas que permiten mejorar la productividad. Una de ellas es incorporar en la dieta alimenticia los probióticos (microorganismos vivos) que ayudan al estado nutricional de éstas, y al mismo tiempo adicionarlos en el agua donde se cultiva las tilapias para que contribuyan a reducir la materia orgánica y no sea fuente de contaminación al medio ambiente.

La investigación se realizó en el proyecto Bedalton ubicado en San Agustín, Cuscatlán, El Salvador a las riveras del Lago de Ilopango, durante los meses de junio y julio del año 2017. La cual se fundamentó en el aislamiento y la caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) del tracto intestinal de la tilapia a través de diferentes procedimientos microbiológicos como: prueba de hemólisis en sangre humana, cinética de crecimiento bacteriano, conteo de UFC/ mL de BAL, tinción de Gram, prueba de tolerancia a pH, actividad antibacteriana, y la determinación de la actividad enzimática extracelular, entre otros. Dichas pruebas permitieron identificar las características propias de los microorganismos aislados de interés y brindaron información para la selección de cepas con potencial probiótico. Al mismo tiempo, se realizó un análisis bacteriológico del agua del lago donde se cultivan las tilapias, determinando los siguientes parámetros: Conteo de Coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, por el método de Número Más Probable (NMP) conteo de bacterias heterótrofas por

método de placa vertida y la prueba de hemólisis para el *Streptococcus sp* todo esto con el fin de buscar fuentes primarias de contaminación microbiana y evaluar la calidad del agua utilizada en el cultivo y manejo de las tilapias cultivadas en jaulas flotantes en el Lago de Ilopango.

Para el muestreo de las tilapias fueron tomadas en cuenta tres tallas (113 g, 227 g y 302 g) recolectadas de tres jaulas flotantes diferentes; una talla por jaula, haciendo un total de 24 muestras de tilapias. Las muestras de agua fueron recolectadas de cada una de las tres jaulas seleccionadas para el muestreo de las tilapias.

Los análisis microbiológicos tanto de las tilapias como las muestras de agua se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador.

Al finalizar esta investigación, se entregaron las bacterias acidolácticas que cumplieron los requisitos de probióticas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador para ser utilizadas en futuras investigaciones.

CAPITULO II.
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento y caracterización de bacterias ácidolácticas (BAL) de *Oreochromis niloticus* (tilapia) cultivada en jaulas flotantes en el lago de Ilopango, El Salvador.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Aislar bacterias ácido lácticas del tracto intestinal de *Oreochromis niloticus* (tilapia) recolectadas de jaulas flotantes del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango, El Salvador.
- 2.2.2 Caracterizar las bacterias ácido lácticas aisladas del tracto intestinal de *Oreochromis niloticus* (tilapia) por diferentes procedimientos microbiológicos (prueba de hemólisis en sangre humana, cinética de crecimiento bacteriano, prueba de tolerancia a pH, actividad antibacteriana, entre otros).
- 2.2.3 Determinar la calidad microbiológica del agua utilizada para cultivar las tilapias según la guía CONAMA para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficial y marina.
- 2.2.4 Proporcionar las bacterias ácido láctico que cumplan como probióticas a la facultad de Química y Farmacia para ser utilizadas en futuras investigaciones.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

VI. MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE *Oreochromis niloticus*. (7)

Nombre de la especie: *Oreochromis niloticus*.

Sinónimos: Tilapia del Nilo, Tilapia Nilotica.

Las tilapias, como se les conoce a un grupo de peces de origen africano, habitan principalmente en regiones tropicales del mundo, donde existen las condiciones necesarias para su reproducción y crecimiento (Ver Figura N°1).

La tilapia en comparación con otros peces, posee extraordinarias cualidades para el cultivo, como: crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación a cautiverio, aceptación de una amplia gama de alimentos, alta resistencia a enfermedades, además de contar con algunos atributos para el mercado, como: carne blanca de buena calidad, buen sabor, poca espina, buena talla y precio accesible, que le confiere una preferencia y demanda comercial en la acuicultura mundial. (14)

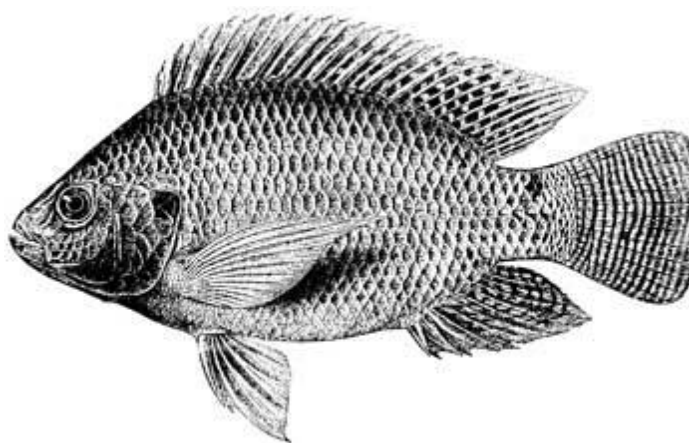


Figura N° 1. Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

3.2 TAXONOMÍA. (2) (11)

En el cuadro N°1 se observa la clasificación taxonómica de *Oreochromis niloticus* que es parte del Reino Animal, de la clase de peces óseos *Actinopterygii*, pertenecientes al género *Oreochromis* y a la especie *Oreochromis niloticus*.

Cuadro N°1. Clasificación taxonómica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia del Nilo)

Reino	Animalia
Filo	<i>Chordata</i>
Clase	<i>Actinopterygii</i> : peces óseos.
Subclase	<i>Neopterygii</i> : Peces con aletas más evolucionadas
Orden	<i>Perciformes</i> : Peces marinos teleósteos, provistos de radios espinosos en las aletas.
Familia	<i>Cichlidae</i> : mayoritariamente son peces de agua dulce
Género	<i>Oreochromis</i> : Tilapia
Especie	<i>Oreochromis niloticus</i> : Tilapia del Nilo

3.3 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN. (2)

Esta especie de tilapia es originaria de África; la diseminación de la tilapia del Nilo más apreciada ocurrió durante la década de 1960 y hasta los años 80s. La tilapia del Nilo procedente de Japón se introdujo en Tailandia en 1965, y de ahí se envió a Filipinas. (Ver Figura N°2)

La tilapia del Nilo procedente de Costa de Marfil se introdujo a Brasil en 1971 y de Brasil también se envió a Estados Unidos en 1974. En 1978, la tilapia del Nilo se introdujo a China, actualmente el principal productor mundial y que continuamente ha producido más de la mitad de la producción global de 1992 a 2003.

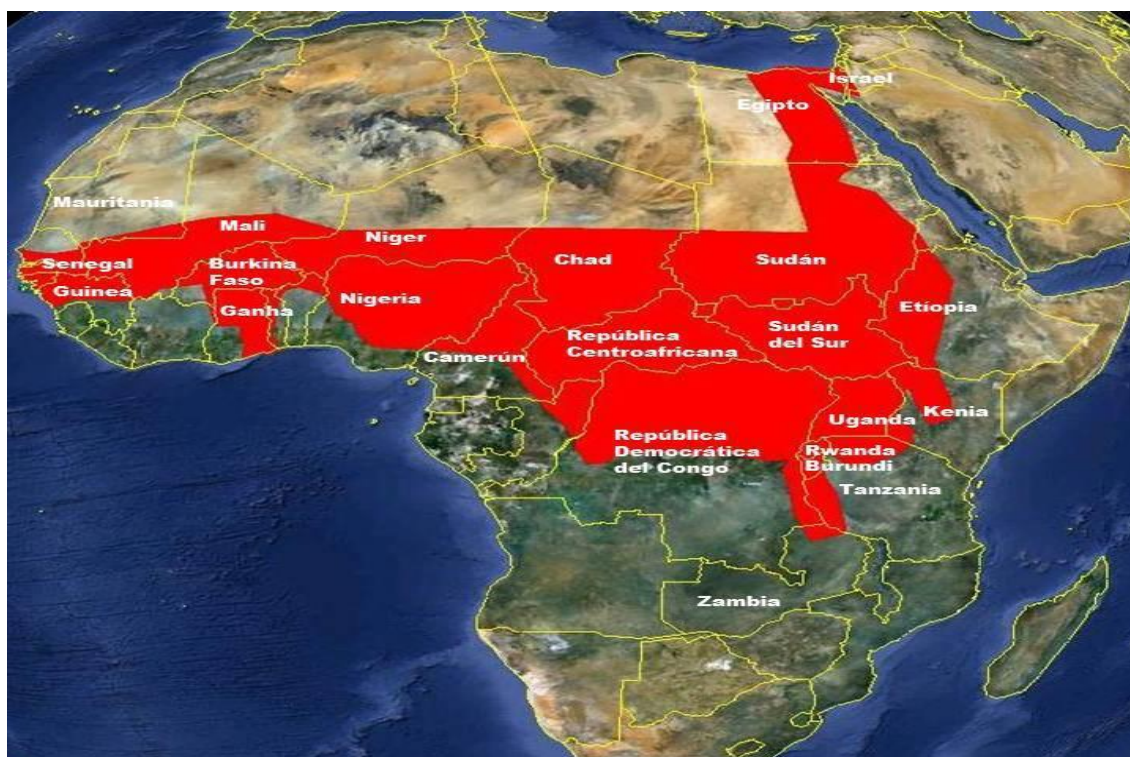


Figura N°2. Distribución geográfica original de *Oreochromis niloticus*.

3.3.1 DISTRIBUCIÓN COMO ESPECIE INVASORA. (2)

La tilapia nilótica fue ampliamente introducida para la acuicultura (incluyendo todas las especies), constituyendo el segundo grupo más importante de peces cultivados más intensamente a nivel mundial. (Ver Figura N° 3).

La siembra en cuerpos de agua y los escapes eventuales de los cultivos en estanques de manto freático y jaulas durante las épocas de lluvias, han permitido su colonización en las aguas dulces. Las tilapias liberadas en Lagunas son

invasoras exitosas por ser omnívoras oportunistas, muy prolíficas y adaptables en diversos tipos de cuerpos de agua. En corto tiempo se han convertido en especies dominantes en muchos cuerpos de agua desplazando y presuntamente depredando a los alevines de especies nativas. La población de tilapia se ha incrementado rápidamente debido a que es una especie muy prolífica y versátil tanto que llegó a ser pronto la especie dominante en estos ambientes y ahora es la principal especie pesquera en los sistemas de agua dulce. Se encuentra naturalmente distribuida por América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, el sudeste asiático, medio oriente y África.

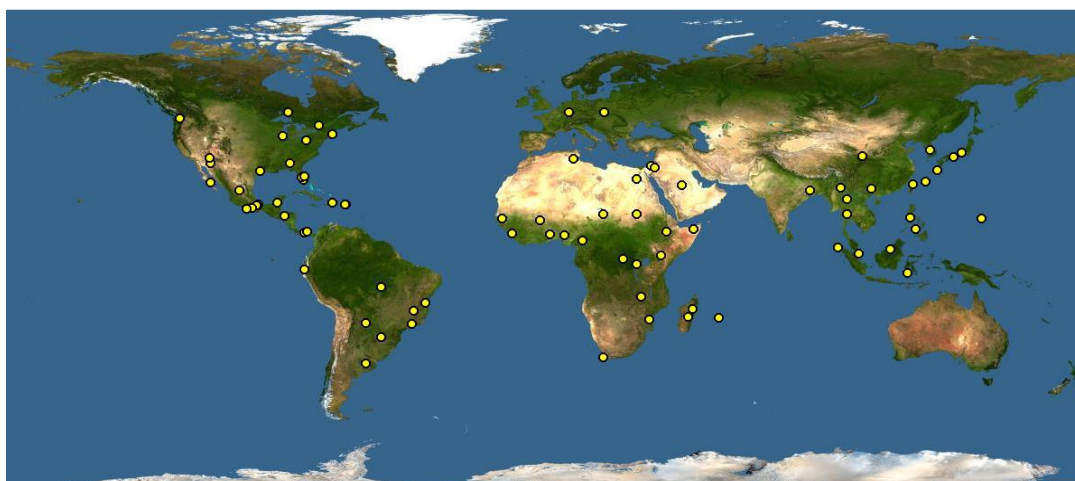


Figura N°3. Distribución geográfica como especie invasora.

3.4 IMPACTO ECOLÓGICO. (2)

Los problemas ambientales pueden incrementarse sobre todo en los ambientes acuáticos después de la introducción de *Oreochromis niloticus* en áreas con proporciones de renovación lentas. Condiciones del agua eutróficas frecuentemente son un resultado la producción intensiva de *O. niloticus*.

En ausencia de limitantes ambientales, la tilapia del Nilo puede impactar negativamente la ictiofauna nativa como lo ha hecho en varios ecosistemas alrededor del mundo. En el Lago Victoria de Africa por ejemplo, esta especie

desplazado a varias especies de tilapias nativas. Varias especies de tilapias, incluyendo *O. niloticus*, han impactado las comunidades de peces nativos en varios lagos de Nicaragua, donde han eliminado el hábitat de algunos peces nativos por el consumo de plantas acuáticas nativas. Adicionalmente compite con los peces nativos por sitios de desove y parecen ser responsables de la introducción de un parásito trematodo que probablemente causa ceguera a los cíclidos nativos. Se debe la atención en contra de la extensa expansión e introducción de este pez en las áreas costeras debido a su rápida proliferación y alto potencial para competir con sitios de desove con los peces nativos.

Las tilapias en cultivo intensivo pueden llevar a la eutrofización, por el aumento de los niveles de nitrato y fosfato (de las heces o alimento sin comer) puede causar crecimientos algales (incluyendo algunas especies tóxicas) y eventos de mortalidad masiva de peces. En el Lago Paranoá, Brasil, un número elevado de *O. niloticus* se han ligado a aumentos en las concentraciones de fósforo total, clorofila a y densidades de cianobacterias (Starling *et al.* 2002). Otra fuente de contaminación que puede estar presente en los efluentes de las granjas de *O. niloticus* son las hormonas artificiales.

La tilapia *Oreochromis niloticus* tan comúnmente utilizada en la acuicultura mundial comporta un considerable riesgo ecológico en la regiones donde se cultivan, dado que las introducciones accidentales y las deliberadas son frecuentes, más aun en países en desarrollo, en los que décadas atrás, las políticas locales eran insuficientes para predecir el impacto a los ecosistemas por parte de especies invasoras, por lo que incluso existieron proyectos para su introducción deliberada en varios ríos, lagos y lagunas en varios países de América del Sur y Asia. Los impactos ambientales producto de su introducción varían según región geográfica y ecosistema en el que se introduce. Generalmente dada sus resistencia, voracidad y elevada tasa de crecimiento,

representa un competidor de las demás especies de peces. Se sospecha que también es un reservorio u hospedero de una serie de parásitos y enfermedades a los que las especies locales no están acostumbradas.

3.5 SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE TILAPIAS A NIVEL MUNDIAL. (1)

De acuerdo a la FAO, a nivel mundial, la acuicultura ha crecido a un ritmo promedio del 9,2% anual desde la década de 1970, comparado con el 1,4% de la pesca de captura y el 2,8% de los sistemas de producción de carne terrestres (Figura N°4). Este crecimiento ha sido impulsado principalmente por el cultivo de peces, los cuales ocupan actualmente el quinto lugar como producto agrícola más importante y el mayor recurso de proteína animal disponible para los humanos, proveen el 25% de la proteína animal en países desarrollados y más del 75% en los países en vías de desarrollo.

Se estima que más de 1000 millones de personas en el mundo dependen del pescado como fuente de proteína animal, por lo que se prevé que el consumo per cápita se incremente de los 16 kg actuales hasta los 19 a 21 kg en el 2030. Una de las especies consideradas clave para el crecimiento de la acuicultura es la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

En lo que respecta a peces dulceacuícolas, en los últimos 20 años se ha registrado un incremento espectacular en la proporción de peces cultivados, impulsado principalmente por el rápido desarrollo de las especies de tilapia. Actualmente más del 85% de la producción mundial de tilapia corresponde a la tilapia del Nilo (*O. niloticus*), mientras que el 15% restante corresponde a las demás especies, entre las que se destacan la tilapia mossambica (*O. mossambicus*), la tilapia aurea (*O. aureus*) y la tilapia hornorum (*O. hornorum*) y sus híbridos de colores rojo, naranja, azul, rosado, blanco, gris o negro.

Las tilapias son hoy el segundo grupo de peces más producido por la acuicultura mundial después de la carpa, con una contribución a la producción de aproximadamente el 20% del volumen total de peces, la cual se incrementa cada año. La producción de tilapia tiene una amplia distribución; el 72% se cría en Asia (sobre todo en China y el sudeste asiático), el 19% en África y el 9% en América (Ver Figura N° 4) Actualmente, el cultivo de tilapia o tilapicultura comprende el cultivo de más de 100 subespecies agrupadas en seis géneros. Por lo anterior, las tilapias recibieron el nombre popular de “pollos acuáticos”, debido a las características de su filete y a su aparente facilidad de su cultivo.

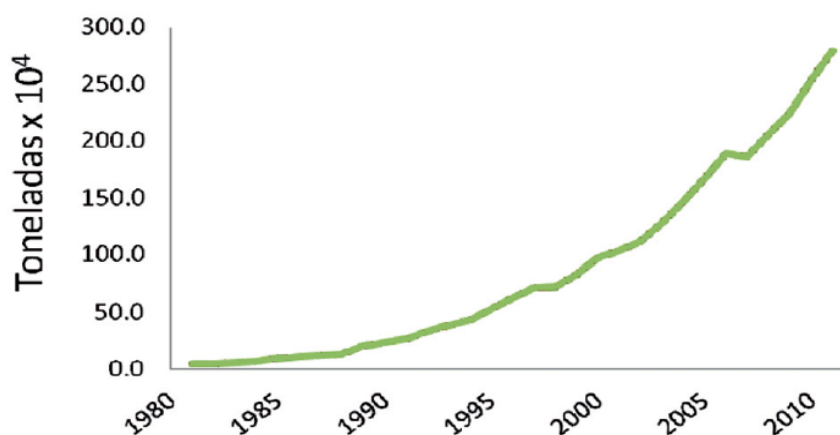


Figura N°4. Producción de tilapias a nivel mundial.

3.6 SITUACIÓN ACTUAL DE LA TILAPIA EN LA ECONOMÍA NACIONAL. (5)

“Los principales recursos que sustentan la producción salvadoreña son el atún, la pesca de escama, el cultivo de tilapia y el camarón. La producción no tuvo una tendencia constante de crecimiento o descenso, pero presenta un promedio 27,560 Tm anuales con una tasa ponderada del 34.4% de incremento anual”.

El volumen de la producción pesquera y acuícola en el período 2000-2007 fue de 220,474.5 TM, de este gran total la acuicultura participo con 13,796.7 TM (6.3%)

que se desglosa de la siguiente manera: tilapia 11,221.3 TM (5.1%) y camarón marino con 2,575.4 Tm (1.2%).

Durante el período de los años 2000-2007, la pesca y la acuicultura aportaron el 0.93% a la economía nacional (PIB) y 10.78% al sector primario, el aporte modesto se debe a la participación de otros sectores altamente dinamizadores como café, azúcar, servicios, construcción, maquila y minería. Sin embargo, es evidente que el crecimiento de la acuicultura en El Salvador está directamente relacionado con el incremento de la producción de tilapia.

La producción de tilapia por acuicultura crece alrededor de 20% anual en el país (período 2005-2008), pero ese crecimiento puede ser superado si se dieran condiciones favorables para el desarrollo de la actividad (Ver tabla N° 1)

Tabla N° 1. Producción anual (kg) de tilapia por acuicultura en El Salvador.

Especies	Años			
	2005	2006	2007	2008
<i>Oreochromis niloticus</i> (Principalmente)	1,955,199 Kg	2,738,858 Kg	3,563,343 Kg	3,930,689 Kg

Se reconoce que la acuicultura crece a un ritmo sostenido de 20% anual, pero hay factores que actúan en contra de la visibilización de este aporte a la economía nacional, uno de estos elementos es la falta de estadísticas nacionales.

3.7 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA TILAPIA. ⁽¹⁴⁾

3.7.1 ANATOMÍA DE LA TILAPIA. ⁽¹⁴⁾

El cuerpo de estos peces es robusto comprimido, a menudo discoidal, raramente alargado, con aleta dorsal que tiene de 23 a 31 espinas y radios; la boca es

proctatil, mandíbula ancha, a menudo bordeada por labios gruesos con dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos, en otros casos puede presentar un puente carnosos (freno) que se encuentra en el maxilar inferior, en la parte media debajo del labio.

La línea lateral es bifurcada: la porción superior se extiende desde el opérculo hasta los últimos radios de la aleta dorsal, en la porción inferior, aparecen varias escamas por debajo de donde termina la línea lateral de la parte superior hasta la terminación de la aleta caudal; la aleta caudal truncada redondeada. (Ver Figura N°5)

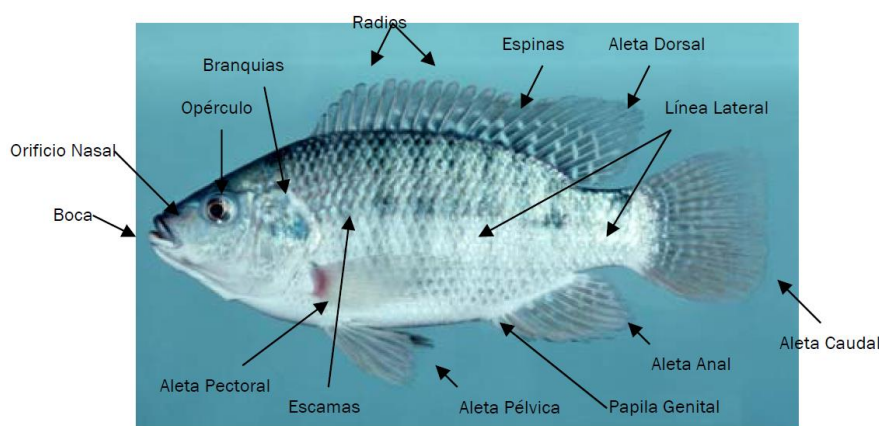


Figura N°5. Anatomía de *Oreochromis niloticus*

3.7.2 HABITAT. (2)

La tilapia tiene una gran adaptabilidad, se encuentra en una amplia variedad de hábitats dulceacuícolas como ríos, lagos, canales de desagüe y de irrigación. Es un pez tropical. Especies diurnas. Prefiere aguas poco profundas.

3.7.3 CLIMA. (2)

Tropical; 14°C - 33°C. El rango de temperatura extendido es de 8 - 42 °C, el rango de temperatura natural es de 13.5 - 33 °C. Las temperaturas letales son: inferior

11-12 °C y superior 42 °C, en tanto que las temperaturas ideales varían entre 31 y 36 °C.

Del grupo de las tilapias es la menos tolerante al frío por lo que prefiere climas subtropicales y tropicales; posee habilidades que le permiten sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y soportar un amplio rango de salinidades.

3.7.4 HABITOS ALIMENTICIOS. (21)

El género *Oreochromis* se clasifica como Omnívoro, por presentar mayor diversidad en los alimentos que ingiere, variando desde vegetación macroscópica hasta algas unicelulares y bacterias, tendiendo hacia el consumo de zooplancton. Las tilapias son peces provistos de branqui-espaldas con los cuales los peces pueden filtrar el agua para obtener su alimentación consistiendo en algas y otros organismos acuáticos microscópicos. Los alimentos ingeridos pasan a la faringe donde son mecánicamente desintegrados por los dientes faríngeos. Esto ayuda en el proceso de absorción en el intestino, el cual mide de 7 a 10 veces más que la longitud del cuerpo del pez. Una característica de la mayoría de las tilapias es que aceptan fácilmente los alimentos suministrados artificialmente. Para el cultivo se han empleado diversos alimentos, tales como plantas, desperdicios de frutas, verduras y vegetales, semillas oleaginosas y cereales, todos ellos empleados en forma suplementaria. La base de la alimentación de la tilapia la constituyen los alimentos naturales que se desarrollan en el agua y cuyo contenido proteico es de un 55% (peso seco) aproximadamente.

3.8 CULTIVO EN JAULAS. (14)

El cultivo en jaulas se define como la engorda de peces, desde estadios juveniles hasta tallas comerciales en un área restringida y delimitada por mallas que permiten el flujo de agua libremente. Su ventaja principal es que se pueden

aprovechar mantos acuíferos tanto en movimiento (como los ríos) como los estacionarios (lagos). Este tipo de cultivo se puede efectuar tanto como nivel de subsistencia individual o familiar, hasta una escala comercial, en lugares tropicales donde la temperatura del agua sea superior a los 20 °C.

3.9 GENERALIDADES DE LAS PRINCIPALES BACTERIAS PATÓGENAS EN LA TILAPIA. ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁰⁾

3.9.1 STREPTOCOCCUS. ⁽¹⁶⁾

El género *Streptococcus* es un grupo de bacterias formado por cocos Gram positivos pertenecientes al filo firmicutes y al grupo de las bacterias ácidolácticas. Estas bacterias crecen en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje. De allí que su nombre, significa que se dobla o retuerce con facilidad, como una cadena. Los *Streptococcus* son oxidasa- y catalasa-negativos. Son anaerobios facultativos, y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono. Sus exigencias nutricionales son complejas, y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico.

3.10 ENFERMEDADES DE LA TILAPIA PRODUCIDAS POR BACTERIAS. ⁽¹⁶⁾

Uno de los inconvenientes que presenta el cultivo de tilapia la aparición de enfermedades causadas diferentes organismos, entre ellos, un gran número de bacterias, por lo cual se ve afectado el desarrollo y crecimiento del pez. Actualmente las tilapias se cultivan en densidades cada vez mayores y con diferentes técnica de cultivos; y aunque la tilapia crece de manera importante en

estos sistemas, los patógenos también ⁽¹⁰⁾. Algunas de las enfermedades producidas por bacterias en la tilapia son:

3.10.1 ESTREPTOCOCOSIS. ⁽¹⁰⁾

La estreptococosis suele producir en las tilapias, una enfermedad crónica caracterizada por la presencia de granulomas, que daña el bazo, cerebro, hígado y riñón, a la vez que genera un exudado purulento en tejido muscular, con encapsulamiento melanizado cerca de la línea lateral.

Dentro de los signos que muestra dicha enfermedad está la hemorragia en la base de las aletas, intumescencia ocular y ojo blanco. Las tilapias afectadas pueden mostrar movimientos natatorios desorientados y erráticos. La estreptococosis ha sido confirmada en poblaciones de tilapias y sus híbridos con mortalidades de hasta un 50%. Según observaciones personales, al parecer la especie *Oreochromis niloticus* es más resistente a la estreptococosis que *Oreochromis aureus*, así como la manifestación de los signos clínicos son algo diferentes.

La prevención de la estreptococosis se relaciona con un excelente manejo de las poblaciones ícticas, ambiente e higiene, incluyendo la remoción y destrucción de los ejemplares enfermos en los estanques. Es importante que cualquier alimento húmedo que haya sido incorporado - pescado molido o vísceras de pescado, sea precocido (pasteurizado), antes de ser suministrado a los peces cultivados. El uso de antibióticos para el control de la estreptococosis, suelen ser difícil de dar resultados efectivos inmediatos, por la resistencia que han desarrollado las cepas. Sólo da resultados positivos, el uso de antibióticos a bases de ampicilina, a una ración de 20 mg/día/kg (pez) miligramo x día x kilogramo de carne de pez. Se sugiere mezclarlo con el alimento, durante 3 a 5 días (período de eliminación del medicamento es de 5 días). También es recomendable el uso de

Erythromycin de 50 mg/kg (pez), durante 3 a 5 días (período de eliminación del medicamento es de 20 días).

3.11 GENERO LACTOBACILO. ⁽²¹⁾

3.11.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS (BAL). ⁽²¹⁾

Las bacterias ácido-lácticas se ubican en la familia *Lactobacillaceae*, la cual se caracteriza porque sus miembros pueden ser bacilos largos o cortos, aunque también cocos que se dividen como los bacilos, solamente en un plano, produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados. Estas bacterias son normalmente no mótils, aunque también pueden serlo.

Las especies mótils presentan flagelación períttrica. Son Gram positivas, con rara producción de pigmentos, aunque unas pocas especies los producen de color amarillo, naranja, rojo o pardo. Las especies microaerófilas raras veces licúan la gelatina, sin embargo, las anaerobias estrictas lo hacen más comúnmente. Presentan pobre o ningún crecimiento superficial en cualquier medio. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues los fermentan para dar lugar a ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como subproductos.

No producen nitritos a partir de los nitratos, pero entre los anaerobios estrictos hay algunas especies que reducen los nitratos y otras que no se han probado con esta reacción. Son microaerófilas hacia la anaerobiosis. Se encuentran regularmente en la boca y en el tracto intestinal del hombre y otros animales, en alimentos y productos lácteos y en jugos vegetales fermentados. Unas pocas especies son altamente patógenas.

3.11.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS. (21)

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes. (Ver figura N°6)

Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no mótiles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno.

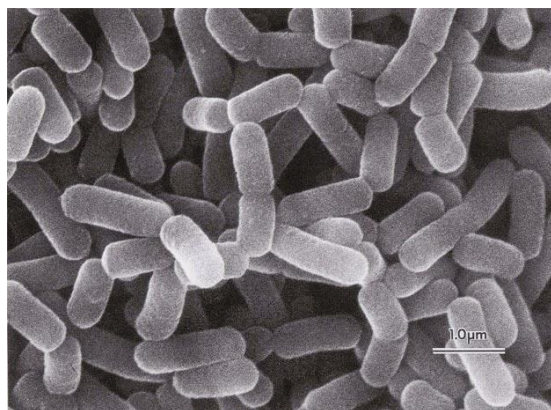


Figura N°6. Morfología microscópica de *Lactobacilos spp.*

3.11.3 PARED CELULAR. (21)

La pared celular de los lactobacilos, contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina-D-Asparagina sea

el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies.

3.11.4 BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDOLACTICAS.

(13)

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, con niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas. Estas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacteriocinas son metabolitos secundarios de las BAL, se define de la síntesis ribosómica, conformados por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos (lactocinas A, B, M y G, lactacina B y helveticina J, entre otras). Son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o bacteriostática sobre cepas o especies relacionadas y sobre microorganismos patógenos.

La producción de bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación con la biomasa producida. Entre las características principales destacan el ser estables al calor y a pH ácidos, ambas propiedades están estrechamente relacionadas: es decir, un incremento de pH reduce la estabilidad al calor. Aunque las bacteriocinas presentan estabilidad a pH ácido o neutro, son fácilmente destruidas a pH mayor de 10. Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, debido a ello son inactivadas, sin ser absorbidas como compuestos activos.

Las bacteriocinas presentan un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones (menores a 10 ppm) frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas patógenas.

3.11.4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS. ⁽¹³⁾

-Clase I: L-antibióticos.

Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos poli cíclicos (< 5 kDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

-Clase II: No antibióticos.

Bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1.

3.11.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN. ⁽¹³⁾

La acción de las bacteriocinas está determinada por composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Se considera también la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las

bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos; después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica. De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Muy probablemente debido a vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula. Otro aspecto importante es la inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular, como un mecanismo secundario de estos péptidos antimicrobianos (Ver Figura N°7).

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos va a tener distintos comportamientos, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros, son resistentes a la acción de estos compuestos, inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina. De estos mismos microorganismos algunos pueden ser sensibles a una y resistentes a otra, las mismas bacterias productoras de compuestos antimicrobianos pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina y por último células de esporas que presentan resistencia a estas sustancias, pueden volverse sensibles después de la esporulación. El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos:

- Bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie.
- Bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-Positivas.

- Bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram-Positivas

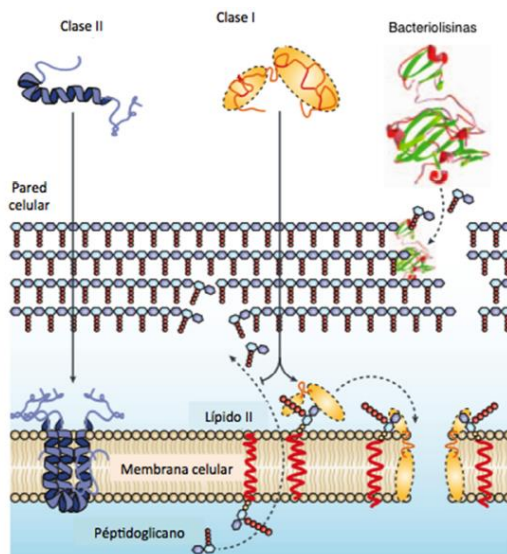


Figura N° 7. Mecanismos de acción de las bacteriocinas.

3.11.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS. (21)

Las colonias de Lactobacilos en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza.

Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares.

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de Nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni sulfídrico (H₂S).

Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción benzidinanegativa.

La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso.

3.11.6 CONDICIONES AMBIENTALES. ⁽²¹⁾

3.11.6.1 pH. ⁽²¹⁾

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos.

Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de 6 casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras.

3.11.6.2 OXIGENO. ⁽²¹⁾

La mayoría de las cepas de Lactobacilos son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y

se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos.

3.11.6.3 TEMPERATURA DE CRECIMIENTO. ⁽²¹⁾

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C.

3.12 MÉTODOS DE ANALISIS. ⁽²²⁾

Para la caracterización de bacterias ácido lácticas se realizarán las siguientes pruebas:

3.12.1 PRUEBA DE HEMOLISIS EN SANGRE HUMANA. ⁽²²⁾

Muchos microorganismos son capaces de crecer en agar sangre y cuando lo hacen responden de diferente manera según realicen o no la lisis de glóbulos rojos (hemolisis) producida por la acción de una enzima llamada hemolisina. Se puede diferenciar tres tipos de hemolisis:

- Hemolisis alfa: es una hemolisis parcial y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo color verdoso.
- Hemolisis beta: es una hemolisis total y el halo que rodea a las colonias es totalmente transparente.
- Hemolisis gamma (no hemolisis): el microorganismo no es capaz de realizar la hemolisis y por lo tanto no existe halo alrededor de la colonia.

3.12.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO. (22)

Representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada.

3.12.3 RECUENTO DE UFC mL⁻¹. (22)

Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. Una porción de la muestra es mezclada con un Agar específico y luego se incuba bajo ciertas condiciones de tiempo y temperatura. Se asume que cada bacteria viable se multiplicara bajo esas condiciones y formará una colonia visible que se pueda contar. Entonces la colonia se considera una unidad formadora de colonia (UFC).

3.12.4 TINCIÓN DE GRAM. (8)

Sobre la base de la reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram-positivas y Gram-negativas (los términos positivo y negativo no tienen nada que ver con carga eléctrica sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo, así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano, así como algo de ácido teicoico. Generalmente el 80% - 90% de la pared de la célula Gram-positiva

es peptidoglicano. La pared de la célula Gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas. Solo 10% - 20% de la pared de la Gram-negativa es peptidoglicano. Es la tinción más empleada y permite agrupar a las bacterias Gram-positivas (si se colorean de azul o morado) y Gram-negativas (si se colorean de rojo o rosado), según resistan o no al proceso de coloración, lo cual a su vez depende de la estructura de la pared bacteriana (Ver figura N° 8).

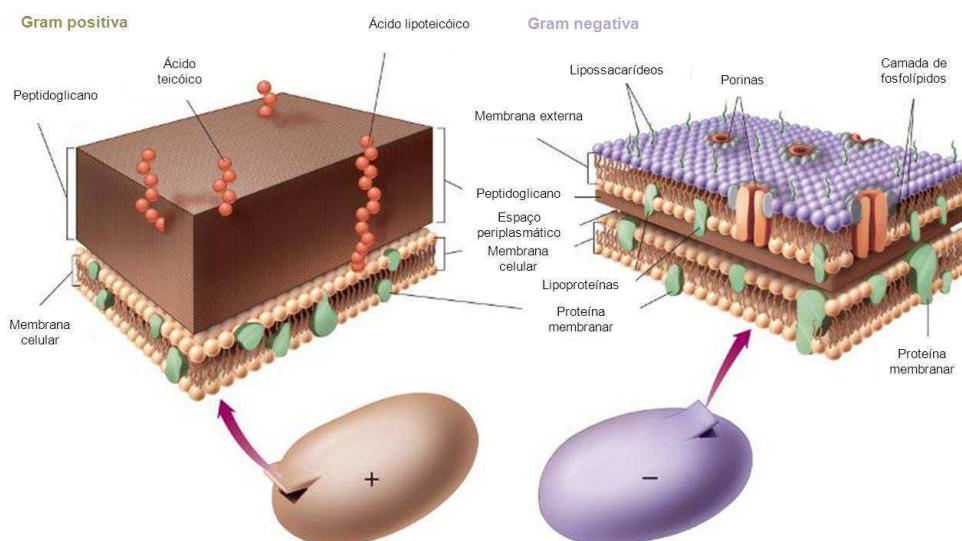


Figura N° 8. Diferencias estructurales las bacterias Gram (+) y Gram (-).

3.12.5 TOLERANCIA A pH. (22)

Es un parámetro crítico en el cultivo de microorganismos ya que estos sólo pueden crecer en un rango estrecho de pH fuera del cual mueren rápidamente. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células (22). En esta prueba se evaluará la supervivencia de las bacterias acidolácticas a diferentes pH y se registrará el pH óptimo para su crecimiento.

3.12.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. ⁽²²⁾

La actividad antibacteriana de las bacterias acidolácticas es debida a las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos heterogéneos, con niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas. Estas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacteriocinas son metabolitos secundarios de las BAL, se define de la síntesis ribosómica, conformados por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos (lactocinas A, B, M y G, lactacina B y helveticina J, entre otras) ⁽¹³⁾. En esta prueba se determinará la actividad antibacteriana de los lactobacilos frente a otras bacterias, en especial las patógenas.

3.12.7 DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR. ⁽⁶⁾

3.12.7.1 PRUEBA DE DEGRADACIÓN DE LA CASEÍNA (PROTEASAS). ⁽⁶⁾

La caseína es la proteína más abundante en la leche y le proporciona el aspecto blanco y opaco característico, debido a que está presente en suspensión coloidal. Muchas bacterias poseen una exoenzima llamada caseasa, capaz de hidrolizar dicha proteína., esta produce péptidos más pequeños y por lo tanto suspensiones más claras. A este fenómeno se le denomina “peptonización” y es útil en la identificación de algunas especies microbianas.

3.12.7.2 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE LA GELATINA (PROTEASAS). ⁽⁹⁾

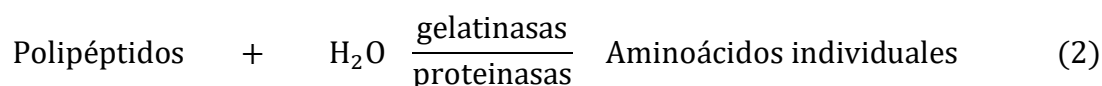
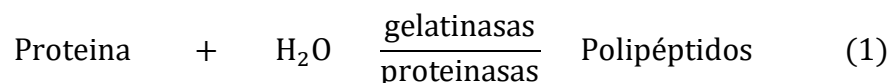
La gelatina es unan proteína derivada del colágeno animal se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinolisis se

denominan gelatinasas. Estas enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos.

Las proteínas naturales son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por ende para que una célula pueda usar las proteínas, estas primero deben ser catabolizadas a componentes más pequeños. Ciertas bacterias segregan gelatinasas exocelulares para degradar las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.

La gelatina es hidrolizada por la gelatina en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes.

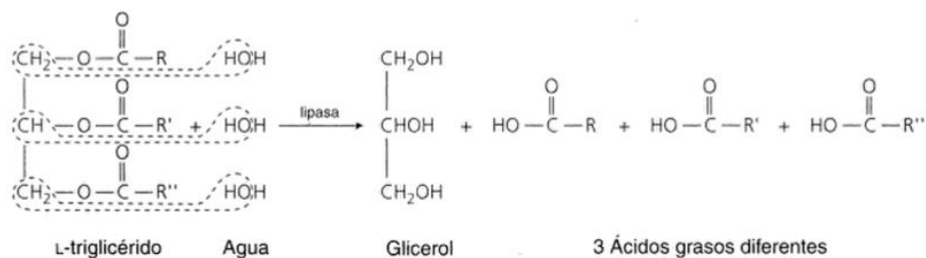
Reacción de hidrólisis de la gelatina.



3.12.7.3 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE TWEEN 80 (LIPASAS). ⁽⁹⁾

Determina la capacidad de microorganismos para producir la enzima lipasa, que catalizan la hidrólisis de triglicéridos y diglicéridos a ácidos grasos y glicerol, evidenciada por un brillo aceitoso e iridiscente en el medio. La enzima lipasa actúa sobre los ésteres emulsionados de glicéridos y/o lípidos. Los triglicéridos son hidrolizados a monoglicéridos, glicerol y una variedad diferente de ácidos grasos saturados o no saturados. La lipasa es específica para las cadenas α y α_1 de glicéridos. Cuando se hidrolizan, las uniones éster se rompen y elementos del agua se combinan con los fragmentos. Cuando las uniones éster de los glicéridos son hidrolizadas. Los ácidos grasos se comportan como ácidos carboxílicos comunes y son insolubles en agua.

Reacción de hidrólisis de un triglicérido.



3.12.8 REQUISITOS A CUMPLIR PARA CONSIDERAR UNA BACTERIA COMO PROBIÓTICA. (12)

Para que una cepa bacteriana pueda considerarse probiótica debe cumplir con los requisitos planteados en el cuadro N°2.

Cuadro N°2. Requisitos necesarios para considerar una bacteria como probiótica.

Parámetro		Cepa Bacteriana
		Resultado esperado
Tinción Gram		Bacterias Gram Positivas
Hemolisis		Bacterias gamma Hemolíticas
Conteo UFC/mL		Entre 10 ⁶ -10 ⁸ UFC
Tolerancia a pH		Amplio rango de pH
Actividad enzimática	Degradación de la caseína	Leve o nula actividad enzimática.
	Degradación de la gelatina	No deben formarse halos claros alrededor del pozo.
	Degradación del Tween 80	
Adhesión a solventes	% de adhesión a cloroformo	Debe adherirse a los diferentes solventes orgánicos. Formación de suspensión blanca al fondo del tubo.
	% de adhesión a tolueno	
	% de adhesión a xileno	
Actividad antibacteriana (mm)		Alta o mediana actividad antibacteriana.

3.13 PROBIÓTICOS. ⁽¹²⁾

Conjunto de microorganismos vivos que tienen efectos benéficos en el hospedero mediante la modificación de la microbiota, mejoramiento del equilibrio intestinal, aumento de la respuesta a enfermedades y de la calidad del ambiente. Tienen la capacidad de competir contra bacterias patógenas tanto en el medio, como en el interior y exterior del individuo y de degradar metabolitos tóxicos y materia orgánica.

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

El uso de probióticos en acuicultura se ha intensificado en los últimos diez años. Una de las causas es probablemente la limitación de su uso en la alimentación de monogástricos y mascotas.

El efecto benéfico de los probióticos se atribuye en general a tres mecanismos diferentes, que a su vez pueden deberse a varias causas:

-Mejoramiento de la calidad del agua

Ya sea por metabolización de la materia orgánica o por interacción con algunas algas.

-Exclusión competitiva de bacterias nocivas

Ya sea por:

- Competencia por nutrientes;
- Competencia por sitios de fijación en el intestino;
- Aumento de la respuesta inmunológica del hospedero.

-Aportes benéficos al proceso digestivo del hospedero

Mediante

- Aporte de macro y micronutrientes para el hospedero o
- Aporte de enzimas digestivas.

3.13.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS. (17)

3.13.1.1 COLONIZACIÓN Y ADHESIÓN EN EL TRACTO

GASTROINTESTINAL. (17)

La capacidad de adherencia es una característica que es aprovechada de igual manera tanto por las bacterias probióticas como por las patógenas. En el caso de las probióticas es uno de los criterios más importantes para su selección y aplicación en la acuicultura, mientras que para las patógenas la habilidad para adherirse, se relaciona con la virulencia considerándose el primer paso para una infección.

La adhesión puede ser por:

- Moléculas adhesinas en la bacteria y receptores en las células epiteliales.
- Factores físico químicos como las fuerzas de atracción de Van der Waals (Ver figura N°9).

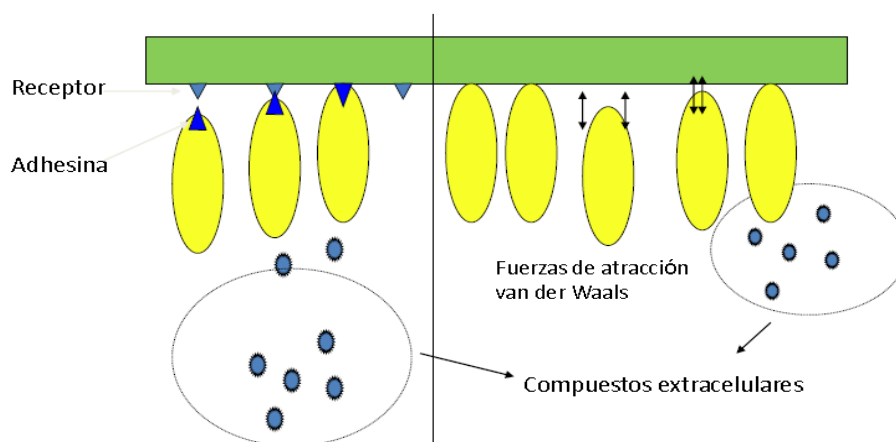


Figura N° 9. Mecanismos de adhesión de las bacterias probióticas.

En acuicultura, la información disponible indica que las bacterias aisladas de animales cultivados o de su entorno tienen mayor capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal y a los tejidos, que las de otras bacterias foráneas que suelen ser transitorias, por lo que surge la necesidad de que los probióticos sean continuamente administrados, ya sea como suplemento en el alimento o a través del agua de cultivo.

3.13.1.2 PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS. ⁽¹⁷⁾

La selección de microorganismos con actividad probiótica también se puede determinar por la capacidad de generar productos extracelulares (ECPS), que pueden inhibir o matar otras bacterias potencialmente patógenas, entre ellos sustancias antibacteriales, sideróforos, enzimas bacteriolíticas, ácido láctico, ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono y bacteriocinas. Las bacteriocinas son polipéptidos bacteriostáticos o bactericidas que en su mayoría son activos contra bacterias estrechamente relacionadas y microorganismos Gram-positivos.

3.13.1.3 PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BENÉFICOS. ^{(17) (21)}

Las bacterias marinas y las levaduras pueden llegar a ser un recurso de proteína importante en el mejoramiento del aporte nutricional de algunas especies acuáticas cultivadas debido al perfil de aminoácidos que contienen. Por otra parte, la producción de enzimas como proteasas (acción sobre las proteínas), amilasas (acción sobre carbohidratos-almidones), lipasas (acción sobre grasas-lípidos) lipasas y quitinasas (acción sobre la quitina), por parte de microorganismos seleccionados, pueden contribuir al proceso digestivo de los organismos cultivados.

3.13.1.4 ESTIMULACIÓN DE LA INMUNIDAD. ⁽²¹⁾

Estudios recientes han atribuido a los probióticos el mecanismo de acción de inmuno estimulación. La flora microbiana de un animal tiene un efecto

significativo sobre el sistema inmunológico del organismo. El número de linfocitos, células plasmáticas y placas de Peyer es muy baja en animales libres de patógenos que en animales en regímenes de producción. Algunos lactobacilos usados como probióticos son capaces de estimular el sistema inmune mediante dos vías: la primera, migración y multiplicación de los microorganismos probióticos a través de la pared intestinal estimulando las paredes más lejanas, y la segunda, por reconocimiento de organismos probióticos muertos como antígenos que puedan estimular directamente el sistema inmune.

3.13.2 MEJORA DE LA CALIDAD DE AGUA. ⁽¹⁸⁾

Se ha propuesto que las bacterias del género lactobacilos seleccionadas como probióticos pueden convertir la materia orgánica en CO₂, en contraste con las bacterias Gram-negativas que se caracterizan por convertir materia orgánica en biomasa bacteriana o lodo.

3.13.3 BACTERIAS ÁCIDOLÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS. ⁽¹²⁾

Es uno de los grupos más estudiados por sus beneficios en los tratamientos causados por los trastornos de la microflora intestinal. Estas bacterias están clasificadas dentro del grupo de las bacterias Gram positiva, generalmente tienen movilidad y no formadoras de endoesporas, producen ácido láctico, algunos miembros de este grupo contienen bastones como los *Lactobacillus*, que junto con, *Carnobacter*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus*, están adaptadas a crecer bajo diferentes condiciones ambientales.

3.13.4 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS CANDIDATAS A PROBIÓTICOS. ⁽¹²⁾

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.

Las cepas deben ser estables en el almacenamiento y permitir su producción en grandes volúmenes. La experimentación a escala comercial es definitiva y no debemos conformarnos con mejorar supervivencia, sino que es importante que el crecimiento y la ganancia de peso no se vean afectados. Si la cepa es adecuada, el paso siguiente sería la evaluación económica del probiótico a escala comercial.

3.13.5 EFECTOS BENÉFICOS DE LOS PROBIÓTICOS. ⁽¹²⁾

Dentro de un medio de cultivo en el campo acuícola, los probióticos pueden beneficiar de muchas maneras tanto a los peces sembrados y/o al sistema como tal.

Los probióticos pueden mejorar la actividad digestiva de los organismos por síntesis de vitaminas, cofactores, mejoramiento de la actividad enzimática y absorción de nutrientes. Esta propiedad puede ser la causa por la cual exista un incremento de peso en los organismos expuestos a este tipo de bacterias, pero pueden proporcionar diferentes resultados según las diferentes condiciones de cultivo.

Con el uso de probióticos en acuicultura la salud de los animales mejora por la remoción o disminución de la densidad de población de patógenos, mejorando la calidad del agua a través de una degradación más rápida de la materia orgánica.

3.13.6 DESVENTAJAS DE LOS PROBIÓTICOS. ⁽¹⁹⁾

Es cierto que los probióticos no tienen el efecto químico-terapéutico, si es posible que el abuso y su uso anti-técnico (promovido por la comercialización excesiva) puedan a corto o mediano plazo crear regulaciones y prohibiciones en su uso. Es recomendable mantenerse constantemente informados sobre la clasificación y origen de los microorganismos del probiótico utilizado.

3.14 GEORREFERENCIACIÓN DEL LUGAR. ⁽¹⁵⁾

El Lago de Ilopango es el lago natural más grande del país y su origen es de tipo volcánico, este se encuentra situado a 16 km de la ciudad San Salvador entre los departamentos de San Salvador, Cuscatlán y La Paz. La cuenca de dicho cuerpo de agua tiene participación de catorce municipios y una población de 600 mil pobladores según datos de la Asociación Amigos del Lago de Ilopango.

El lugar seleccionado para la investigación es el Cantón San Agustín, jurisdicción de San Pedro perulapán, Cuscatlán, El Salvador, C.A.

3.14.1 DATOS GEOGRÁFICOS. ⁽¹⁵⁾

El Cantón San Agustín se ubica 13° Norte y 89° Oeste, a 450/460 metros sobre el nivel del mar.

Sobre los Límites que divide los Departamentos de San Salvador y Cuscatlán, Sobre las riveras del lago de Ilopango, Entrando por San Martín San Salvador **(Ver anexo N° 1)**.

Con una población de 270 Familias entre adultos, jóvenes, niños y ancianos.

Sus habitantes se dedican a la Agricultura y a la Pesca.

3.14.2 ANTECEDENTES DE CALIDAD DEL AGUA EN EL LAGO DE ILOPANGO. ⁽¹⁵⁾

PARAMETROS DE CALIDAD DEL AGUA.

Es importante conocer los parámetros que describen la calidad del agua debido a que el estudio se centra en la crianza y comercialización de tilapia; especie muy importante en las comunidades que se encuentran en los alrededores del lago de Ilopango.

El Ministerio de Medio Ambiente y Recursos naturales define los usos del agua en cuatro categorías principales.

- Agua cruda para potabilizar
- Agua para riego sin restricciones
- Agua para actividades recreativas sin restricciones
- Agua para protección de vida acuática

Nos centraremos en el uso del agua para protección de vida acuática debido a que es utilizada para la producción de tilapia en el cantón San Agustín siendo este punto de muestreo por el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

3.15 CALIDAD DEL AGUA. ⁽³⁾

Se utiliza para describir la condición del agua, incluyendo sus características químicas, físicas y biológicas, usualmente con respecto a su idoneidad para un propósito particular (es decir, beber, nadar o pescar). La calidad del agua también se ve afectada por sustancias como pesticidas o fertilizantes que pueden afectar negativamente a la vida marina cuando están presentes en ciertas concentraciones

3.15.1 MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DEL AGUA. (3)

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Una vez se ha demostrado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, etc. es similar a la del indicador.

3.15.2 PRINCIPALES BACTERIAS UTILIZADAS COMO INDICADORES. (3)

3.15.2.1 COLIFORMES TOTALES. (3)

Los coliformes totales reagrupan ciertas especies bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativa, no esporuladas y que fermentan la lactosa con producción de ácido a 37°C en 24-48 horas.

Las bacterias que se encuentran más frecuentemente en el agua son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal. Debido a que su detección y recuento a nivel de laboratorio son lentos y laboriosos, se ha usado el grupo de las bacterias coliformes como indicadores, ya que su detección es más rápida y sencilla.

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana debido a que estos son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente, están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades, permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas y se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección.

Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales; *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, viven como saprófitos independientes o como bacterias intestinales; Todos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulantes, fermentadores de lactosa con producción de gas; constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales, las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, están sometidas a un estrés fisiológico y pierden gradualmente la capacidad de producir colonias en medios diferenciales y selectivos.

Su velocidad de mortalidad depende de la temperatura del agua, los efectos de la luz solar, las poblaciones de otras bacterias presentes, y la composición química del agua.

3.15.2.2 COLIFORMES FECALES. ⁽³⁾

Son un subgrupo de las bacterias coliformes totales y tienen las mismas propiedades, excepto que toleran y crecen a una temperatura mayor; 44-44.5°C y producen indol a partir del triptofano. La especie de mayor importancia de este grupo es la *Escherichia coli*.

3.15.2.3 ESCHERICHIA COLI. ⁽³⁾

La presencia de coliformes en el agua indica la contaminación bacteriana reciente y constituye un indicador de degradación de los cuerpos de agua. Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas.

Esta denominación está ganando más adeptos actualmente, pues sería una forma más apropiada de definir este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer a una temperatura superior.

3.15.2.4 BACTERIAS HETERÓTROFAS. ⁽³⁾

Son un grupo de bacterias cuyos requerimientos nutricionales exigen la ingestión de compuestos orgánicos para crecer. A este grupo pertenecen todas las que producen enfermedades al hombre, animales y plantas, así como la gran mayoría de la población microbiana del ambiente inmediato que nos rodea. Algunas bacterias pertenecientes a este grupo son: *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

3.16 METODOS DE ANÁLISIS.

Se han desarrollado dos métodos para la detección de bacterias indicadoras en al agua:

3.16.1 NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP). ⁽⁶⁾

El Numero Más Probable (NMP) de coliformes en agua está basado en fórmulas de probabilidad y es un estimado de la densidad promedio de bacterias coliformes. Deriva de los resultados obtenidos al sembrar varias porciones de la muestra en varios caldos de cultivo apropiado, lo que se conoce como “Técnica de Tubos Múltiples”. Existen métodos que utilizan 3, 5 y 10 tubos por dilución de muestra, diferenciándose en la sensibilidad obtenida. Usualmente el agua muy contaminada se trabaja utilizando 15 tubos con 3 diluciones: 5 tubos se inoculan con 10 mL, 5 con 1 mL y los restantes con 0.1 mL. Después de incubar y leer los resultados el número de tubos positivos de cada dilución se consulta en cuadros de probabilidad que siguen una distribución de Poisson para obtener el número más probable.

3.16.2 PRUEBA DE COLIFORMES FECALES.

Esta prueba permite distinguir las bacterias coliformes fecales de los coliformes de otras fuentes y se usa en paralelo con la prueba confirmada, o sea luego de la presuntiva, que representa un enriquecimiento previo de las coliformes. El

fundamento de esta prueba es la temperatura de 44.5 °C, a que pueden cultivarse las coliformes fecales, porque provienen del intestino, en tanto que los coliformes ambientales no pueden hacerlo a esta temperatura.

3.16.3 RECUENTO EN PLACA.

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

-EXPERIMENTAL. Se realizó el aislamiento y caracterización de bacterias ácidolácticas del tracto intestinal de la tilapia y el análisis bacteriológico del agua en el cual son cultivadas las tilapias en jaulas flotantes en el proyecto “Bedalton”, ubicado en el lago de Ilopango, en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

-EXPLORATORIO. Este estudio fue utilizado para determinar el potencial probiótico de las bacterias ácidolácticas nativas aisladas del tracto intestinal de las tilapias Nilóticas ya que en el país no se encuentran estudios relacionados al tema.

-DE CAMPO. Se visitó el proyecto “Bedalton” ubicado en el cantón San Agustín, jurisdicción del San Pedro Perulapán en el departamento de Cuscatlán; el cual será el punto para realizar el debido muestreo de las tilapias y las toma de muestras de agua.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Se consultó en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

-Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador

- Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

- Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de El Salvador.

-Internet.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

4.3.1 UNIVERSO.

El proyecto “Bedalton” cuenta con 19 jaulas flotantes con alrededor de 4000 tilapias (Por jaula) y está ubicado en el Cantón San Agustín, jurisdicción de San Pedro Perulapán, departamento de Cuscatlán, El Salvador, C.A. a las orillas del lago de Ilopango.

4.3.2 MUESTRAS.

- Se recolectaron 8 tilapias de tres tallas diferentes (113 g, 227 g y 302 g) de cada una de tres jaulas flotantes de las 16 jaulas existentes en el proyecto haciendo un total de 24 tilapias. (Ver anexo N°3)
- Se recolectaron 2 muestras de agua de cada una de las 3 jaulas de donde se extrajeron las muestras de tilapias y 2 más fuera de las jaulas, haciendo un total de 8 muestras de agua.

4.3.3 METODO ESTADISTICO PARA LA DETERMINACION DEL NUMERO DE MUESTRAS. ⁽²⁴⁾

Se utilizó el método dirigido para determinar la proporción poblacional de una población desconocida.

$$N = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

Donde:

Z= valor critico de z para un determinado coeficiente de confianza

P= proporción poblacional de un determinado evento

Q= Proporción poblacional de que no ocurra el evento, (1 - p).

N= Tamaño de la población.

E= Error muestral.

Z= 1.96 (95% de confianza)

p= 99.5% (0.995)

q= 0.5% (0.005)

E= 5% (0.05)

$$N = \frac{(1.96)^2 \cdot (0.995) \cdot (0.005)}{(0.05)^2} = 7.64 \approx 8 \text{ muestras.}$$

4.3.4 MUESTREO

4.3.4.1 MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS TILAPIAS.

De cada una de tres jaulas flotantes se recolectaron ocho tilapias de 113 g, ocho de 227 g y ocho de 302 g; haciendo un total de 24 tilapias. Éstas fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en hieleras y bolsas de plástico dobles con oxígeno (Ver Anexo N° 2). Las 24 tilapias fueron sometidas a disección utilizando el tracto intestinal para el aislamiento y caracterización de las bacterias acidolácticas con potencial probiótico.

4.3.4.2 MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

Para determinar la calidad bacteriológica del agua, se recolectaron 2 muestra de agua de cada una de las 3 jaulas flotantes de donde se tomaron las muestras de tilapia del proyecto “Bedalton” ubicado en el cantón San Agustín, jurisdicción del San Pedro Perulapán y otras 2 más fuera de éstas jaulas. Las muestras dentro de la jaula se recolectaron en el centro de la jaula y a 2 m de profundidad, las muestras fuera de la jaula fueron tomadas a 5 m de profundidad y a 2 m de distancia de la jaula. Todas las muestras se colocaron en frascos plásticos

estériles de 1 Litro, se almacenaron en hielera a T de 5.0 °C y fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4. 4 PARTE EXPERIMENTAL

ANÁLISIS A REALIZAR.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, en las muestras de tilapias y de agua obtenidas del proyecto “Bedalton” ubicado en el cantón San Agustín, jurisdicción del San Pedro Perulapán, departamento de Cuscatlán, a las orillas del lago de Ilopango.

Análisis microbiológicos:

- PARA MUESTRAS DE TILAPIAS:

- Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir del tubo digestivo
- Caracterización de las bacterias ácido lácticas aislados.
 - Prueba de hemólisis en sangre humana.
 - Cinética de crecimiento bacteriano.
 - Conteo de UFC/mL.
 - Tinción de Gram, morfología microscópica, arreglo celular.
 - Prueba de tolerancia a pH.
 - Actividad antibacteriana.
 - Determinación actividad enzimática extracelular.
 - Prueba de degradación de la caseína (proteasas).
 - Prueba de hidrólisis de la gelatina (proteasas).
 - Prueba de hidrólisis de Tween 80 (lipasas).
- Adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo.

- PARA MUESTRAS DE AGUA.

Para realizar el análisis bacteriológico de muestras de agua se utilizó la metodología establecida en el APHA para los siguientes parámetros: conteo de coliformes totales, fecales, *E. coli*, por el Número Más Probable (NMP), Conteo de bacterias heterótrofas por placa vertida y la determinación de Estreptococos; se utilizaron medios selectivos y diferenciales.

4.4.1 PARA MUESTRAS DE TILAPIAS:

4.4.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL). (Ver Anexo 3). (19)

- De cada una de las Tilapia extrajo el tubo digestivo, y se pesó una porción de 1.0 g y colocado en tubos plásticos de fondo cónico (50 mL).
- Se adicionaron 200 μ L de solución salina estéril y se homogenizo en vortex.
- Se esparcieron 100 μ L la suspensión resultante en cada una de dos placas de Petri con medio RMS (Man, Rogosa y Sharp) con 2% de NaCl e incubar a 37 °C durante 120 h. El crecimiento se observó cada 24 h.
- De cada colonia resultante se sembraron por esparcimiento en placas Petri con medio RMS (Man, Rogosa y Sharp), 2% de NaCl, incubar a 37 °C durante 24 h.
- Finalmente, se cosecharon las bacterias y fueron colocadas en tubos plásticos de fondo cónico (1.5 mL) con caldo MRS con 15% (v/v) de glicerol. Los aislados fueron almacenados a -70 °C (Stock) para su posterior caracterización.

4.4.2.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS. (Ver Anexo N° 4).

- Se sacaron los microorganismos cosechados del ultracongelador.

- Se tomaron 10 μ L del cada uno de los microorganismos aislados y se adicionaron en tubos con 10 mL de caldo MRS con NaCl al 2%.
- Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas y 48 horas.

4.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS. ⁽¹⁹⁾

4.4.3.1 PRUEBA DE HEMÓLISIS EN SANGRE HUMANA. (Ver Anexo N° 5).

- Se tomaron 100 μ L de cada aislado bacteriano y fueron agregados en tres tubos con rosca con 9 mL de caldo MRS con 2% de NaCl, e incubados a 37 °C, durante 48 horas.
- Cada uno de los cultivos previamente homogenizados se colocaron en tubos plásticos de fondo cónico y centrifugados a 3900 rpm, por 10 min. El sobrenadante fue separado de la pastilla.
- El pH del sobrenadante se ajustó a 6.5 con NaOH 1 M para evitar falsos halos de lisis ocasionados por la acidez del medio.
- Se colocaron 50 μ L del sobrenadante en pequeños pozos dentro de placas Petri con agar MRS (20 mL de medio base agar RMS + 1 mL de sangre por placa).
- Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h, tomando lecturas cada 24 h.
- Las muestras inoculadas en el medio se compararon con un control negativo.
- Se tomaron sólo aquellos microorganismos que presentaron hemólisis gamma (γ).

4.4.3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE LOS AISLADOS DE BAL. (Ver Anexo N° 6).

Con el fin de conocer las fases de crecimiento de cada una de las cepas, se realizó una cinética de crecimiento, inoculando 84 μL del stock de cada aislado en 210 mL de caldo de MRS con 2% de NaCl, se incubaron a 37 °C. Se determinó la absorbancia de los cultivos con respecto a un control (caldo MRS) a 580 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 2, Thermo Scientific Waltham, MA, USA). Las lecturas se iniciaron a las 0, 6 h después de la inoculación y luego cada 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 y 288.

4.4.3.3 CONTEO DE UFC mL⁻¹ DE BAL. (Ver Anexo N° 7).

Para el conteo de las BAL (UFC/mL) se utilizó el método de diluciones seriadas decimales.

- Se sembraron 100 μL de cada uno de los aislados en tres tubos que contenían 9.0 mL de caldo de MRS + 2% NaCl e incubados a 37 °C, durante 48 h.
- Cada cultivo se colocó en tubos plásticos de fondo cónico (15 mL) y centrifugados a 3900 rpm, por 20 min. Se separó el sobrenadante de la pastilla.
- La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril al 2% de NaCl y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.
- Se ajustó la absorbancia a 1.0.
- Una vez obtenida la absorbancia deseada, se tomar 1.0 mL de la muestra y se agregó a un tubo con rosca con 9.0 mL de solución salina estéril que representó la dilución 10^{-1} .
- El procedimiento se repitió hasta obtener la dilución 10^{-7} .

- De la dilución 10^{-5} a la 10^{-7} , se tomó 1 mL, y 0.1 de la dilución 10^{-7} sembrados por placa vertida utilizando Agar MRS + 2% NaCl e incubada a 37 ° C, durante 48 h.
- La siembra se realizó por duplicado.

4.4.3.4 TINCIÓN DE GRAM, MORFORLOGIA MICROSCOPICA, ARREGLO CELULAR. (Ver Anexo N° 8).

- Se realizó la tinción de Gram en los aislados que no tenían actividad hemolítica.
- Para este análisis se utilizó un kit de Gram.
- Lo anterior sirvió no sólo para determinar si los aislados son Gram positivos (+) o Gram negativos (-), sino que también se determinó la forma y el arreglo celular de cada uno de ellos.

4.4.3.5 PRUEBA DE TOLERANCIA A pH. (Ver Anexo N° 9).

- Se transfirieron 10 µL de cada aislado a tres tubos con rosca que contiene 10 mL de caldo de TSC + NaCl al 2% e incubados a 37 °C durante 48 h.
- Los cultivos fueron homogenizados y centrifugados a 3900 rpm durante 15 minutos.
- Se separó el sobrenadante de la pastilla.
- Se agregaron 10 mL de solución salina estéril al 2% a la pastilla.
- Se centrifugó a 3900 rpm durante 15 minutos y se decantó el sobrenadante.
- 10 mL de solución salina estéril al 2% se le agregaron a la pastilla y se centrifugó a 3900 rpm durante 15 minutos y se separa la pastilla del sobrenadante.
- Se agregaron 10 mL de solución salina estéril al 2% a la pastilla, y se mezcló.

- Se centrifugo a 3900 rpm durante 15 minutos y se decantó el sobrenadante.
- Se adicionó 1 mL de solución salina estéril al 2% al tubo con la pastilla, y se homogenizo; este es el concentrado.
- La absorbancia fue ajustada a 1.000. Para la prueba pH se hizo por triplicado.
- Se preparó el caldo de MRS y se ajustó a los siguientes pH 4,5,6,7,8,9, y 10.
- Se colocaron 10 mL de caldo MRS de diferente pH en tubos por triplicado.
- Cada serie de 3 tubo con el medio a diferente pH se le inocularon 10 μ L del microorganismo con absorbancia de 1.00 e incubados a 37°C durante 48 horas.

4.4.3.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. (Ver Anexo N° 10).

- Se sembraron por esparcimiento aproximadamente 5.0×10^4 UFC de *Streptococcus* en una caja Petri con medio TSA con NaCl 2%.
- Se colocaron cilindros de acero inoxidable, distribuidos homogéneamente.
- A cada cilindro se le colocaron 50 μ L del sobrenadante de un cultivo de BAL presuntivos de 24 h. (medio TSC con NaCl 2%).
- El sobrenadante de los cultivos de BAL fue tomado crudo. Como control se inocularon 50 μ L de solución salina estéril (NaCl al 2%).
- Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h, se observaron y midieron los halos de inhibición.

4.4.3.7 DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR. (Ver Anexo N° 11).

Se determinó la actividad de enzimas extracelulares (proteasas y lipasas) de los aislados. Para ello se cultivaron en medio TSC con 2% de NaCl, se

incubaron a 37°C, durante 24-48 h, respectivamente. Al final del periodo de incubación la suspensión se centrifugo a 3900 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante.

4.4.3.8 PRUEBA DE DEGRADACIÓN DE LA CASEÍNA (PROTEASAS). (Ver Anexo N° 12)

- Se preparo 1 litro de medio MRS y se esterilizo 2% de leche descremada.
- El 2 % de leche descremada se le adiciono al medio basal fundido a temperatura de 45°C.
- Se vertio 20 mL en cada una de las placas estériles.
- Una vez que se solidifico el medio se realizaron perforaciones o pozos (6 mm de diámetro) con un horador estéril de forma homogénea.
- Se inocularon con 50 µL del sobrenadante de los cultivos en los pozos. (Utilizar como control el medio de cultivo). Las placas fueron incubadas a 37°C, durante 24-48 h.
- Considerar como resultado positivo los aislados que formen un halo transparente alrededor del pozo.

4.4.3.9 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE LA GELATINA (PROTEASAS). (Ver Anexo N° 12)

- Se preparo 1 litro de medio MRS y se esterilizo 1% de gelatina.
- El 1 % de gelatina se le adiciono al medio basal fundido a temperatura de 45°C.
- Se vertio 20 mL en cada una de las placas estériles.
- Una vez que se solidifico el medio se realizaron perforaciones o pozos (6 mm de diámetro) con un horador estéril de forma homogénea.

- Se inocularon 50 μ L del sobrenadante de los cultivos en los pozos. (Utilizar como control el medio de cultivo). Las placas fueron incubadas a 37°C, durante 24-48 h.
- Considerar como resultado positivo los aislados que formen un halo transparente alrededor del pozo.

4.4.3.10 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE TWEEN 80 (LIPASAS). (Ver Anexo N° 12)

- Se preparo 1 litro de medio MRS y se esterilizo 1% de Tween 80.
- El 1 % de Tween 80 se le adiciono al medio basal fundido a temperatura de 45°C.
- Se vertio 20 mL en cada una de las placas estériles.
- Una vez que se solidifico el medio se realizaron perforaciones o pozos (6 mm de diámetro) con un horador estéril de forma homogénea.
- Se inocularon con 50 μ L del sobrenadante de los cultivos en los pozos. (Utilizar como control el medio de cultivo). Las placas fueron incubadas a 37°C, durante 24-48 h.
- Considerar como resultado positivo los aislados que formen un halo transparente alrededor del pozo.

4.4.3.11 ADHESIÓN MICROBIANA A XILENO, TOLUENO Y CLOROFORMO. (Ver Anexo N° 13)

- Se cosecharon las bacterias durante la fase estacionaria de crecimiento que fueron cultivadas en caldo MRS y centrifugadas a 3900 rpm por 15 min.
- Se decantó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de solución buffer y se centrifugo a 3900 rpm durante 15 minutos. (se repitió este paso una vez mas)

- Se decantó el sobrenadante y la pastilla se homogenizó con 1 mL de buffer.
 - Se midió la Absorbancia de la suspensión celular a 600 nm (A0).
 - Se ajustó la absorbancia a uno pero llegando a 9 mL porque se hizo por triplicado.
 - Se agregó 1 mL de xileno a 3 mL de la suspensión celular por triplicado en tubos con rosca e incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - Se obtuvo un sistema de dos fases, y se mezcló en el vortex por dos minutos y luego incubado a temperatura ambiente durante 20 minutos.
 - Se removió la fase acuosa y se midió la absorbancia a 600 nm (A1).
- **Cuadro N° 3. Composición de la solución buffer.**

mM	g/L	PARA 500 mL
NaCl, 137 mM	8.00	4.00
KCl, 2.7 Mm	0.20	0.10
Na ₂ HPO ₄ , 2 Mm	10.00	5.00
KH ₂ PO ₄	1.76	0.88

4.4.4 PARA MUESTRAS DE AGUA₍₁₉₎.

4.4.4.1 NMP (Número Más Probable). (Ver Anexo N° 14)

- Se prepararon una serie de tres tubos conteniendo 10 mL de caldo Florocult LMX de concentración doble y dos series de cinco tubos con 10 mL de concentración simple.

- Los tubos fueron colocados en una gradilla y codificados según el número asignado a la muestra.
- Se inoculo con 10 mL de agua a analizar en los cinco tubos con caldo de concentración doble, un mL en los tubos con caldo de concentración simple y 0.1 mL en los otros cinco tubos con caldo de concentración simple.
- Los tubos fueron incubados a 35 °C durante 24 a 48 horas. Los tubos positivos (con coloración azul), indican presencia de coliformes totales.
- Los tubos positivos se pasaron a caldo EC e incubados a 44.5 °C durante 24 horas. Nota: los tubos con caldo EC deben colocarse previamente una campana de Durham.

4.4.4.2 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Los tubos que presentaron prueba positiva para coliformes totales, se observaron con luz UV, la presencia de fluorescencia es prueba positiva para *Escherichia coli*, y la formación de un anillo color violeta con el reactivo de Indol, indica prueba positiva para *Escherichia coli*.
- La presencia de gas en las campanas de Durham indica prueba positiva para coliformes fecales.
- Se utilizó las tablas del Numero Más Probable (NMP) para 15 tubos y los resultados fueron comparados con la guía de establecimiento de normas secundarias del CONAMA.

4.4.4.3 RECUENTO EN PLACA. (Ver anexo N° 15.)

- Se midió 10 mL de muestra con una pipeta de Mohr y agregarlos en 90 mL de agua peptonada (dilución 10^{-1}).
- Se transfirió un mL de la dilución anterior y agregados en nueve mL de agua peptonada (dilución 10^{-2}).

- Se colocó 1 mL de la dilución 10^{-1} en una placa de Petri; asimismo, un mL y 0.1 mL de la dilución 10^{-2} , por duplicado.
- Se añadió 15-20 mL de agar Plate Count fundido en las placas (45-50°C).
- Se homogenizo el inóculo con el agar y dejar reposar hasta su solidificación.
- Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24-48 horas.

4.4.4.4 DETERMINACIÓN DE STREPTOCOCCUS EN AGUA. (Ver anexo N° 16)

- Se inoculó 90 mL de Caldo Tripticasa Soya (CASOY) con 10 mL de la muestra de agua, e incubada de 35 – 37 °C durante 24 horas.
- Se tomó una asada y estriada en placas de Agar sangre por duplicado, y se incubaron de 35 – 37 °C durante 24 horas en ambiente con 15% de CO₂.
- Se tomaron con asa las colonias características de cada placa y estriadas en Agar Sangre, y se incubaron de 35 – 37 °C durante 24 horas en ambiente con 15% de CO₂.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir del tracto gastrointestinal de *Oreochromis niloticus* (Tilapia), recolectadas en jaulas flotantes del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango, El Salvador

RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Se recolectaron 24 tilapias en total, siguiendo el método estadístico dirigido a partir de 19 jaulas flotantes del proyecto “Bedalton” ubicado en el lago de Ilopango, estas jaulas contenían tilapias de tres tallas y alevines. Las 19 jaulas fueron sometidas a sorteo, de la siguiente manera: se enumeraron 19 papeles del uno al 19, se doblaron y colocaron en una caja, finalmente se extrajeron tres papeles y las jaulas seleccionadas fueron: la 14 para la talla uno, la uno para talla dos y la 19 para la talla tres. Las jaulas 12,13,14,15 contenían tilapias de la talla uno, las jaulas 1,2,3,4,5, y 6 tilapias de la talla dos, las jaulas 16,17,18, y 19 tilapias de la talla tres y las jaulas 7,8,9,10,11 con alevines (Ver anexo N°1).

Se capturaron ocho tilapias de la jaula 14 (Talla uno), ocho de la jaula uno (Talla dos) y ocho de la jaula 19 (Talla tres), posteriormente las ocho tilapias de cada jaula se colocaron en bolsa de plástico dobles con agua, hielo y oxígeno, se rotularon con: hora de recolección, fecha, lugar y persona que recolecto las tilapias. Se almacenaron en hieleras con hielo y se trasladaron al laboratorio de Microbiología en la facultad de Química y Farmacia (Ver Anexo N° 17).

-AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS

Para el aislamiento de los Lactobacilos, se pesó aún con vida la tilapia en una balanza semianalítica, se extrajeron todas las vísceras (Anexo N°18) y se pesó toda la porción visceral; luego se seleccionó una porción aproximada de 1.0 g de tracto gastrointestinal (ver tabla N°2) y se colocaron en tubos plásticos de fondo cónicos de 50 mL, se le agregó 9 mL de solución salina y se maceraron.

El proceso se repitió para cada una de las 24 tilapias, primero la talla uno y así sucesivamente la talla dos y finalmente la talla tres. Pesos de tilapias (Tabla N° 3).

Las muestras se codificaron indicando: jaula de procedencia y talla que representa el peso promedio de la población: talla uno=141.5 g, talla dos=209.7 g y talla tres= 311.6 g y el número correlativo de cada tilapia. Ejemplo: Jaula 14, talla uno, tilapia uno = J14T11; Jaula uno Talla dos, tilapias uno = J1T21, etc.

Tabla N°2. Pesos obtenidos de las tilapias por talla.

MUESTRA JAULA 14, TALLA 1.	PESO DE TILAPIA (g)	MUESTRA JAULA 1, TALLA 2.	PESO DE TILAPIA (g)	MUESTRA JAULA 19, TALLA 3.	PESO DE TILAPIA (g)
J14T11	132.0	J1T21	195.3	J19T31	306.6
J14T12	145.5	J1T22	201.0	J19T32	359.2
J14T13	140.4	J1T23	203.4	J19T33	318.2
J14T14	170.2	J1T24	191.8	J19T34	240.2
J14T15	133.1	J1T25	234.6	J19T35	317.8
J14T16	142.4	J1T26	220.4	J19T36	373.5
J14T17	135.7	J1T27	203.7	J19T37	272.0
J14T18	132.8	J1T28	227.5	J19T38	304.9
Peso promedio	141.5	Peso promedio	209.7	Peso promedio	311.6
Pesos de referencia	113 g (1/4 lb)		227 g (1/2 lb)		302 g (3/4 lb)

Tabla N°3. Pesos de vísceras y porción de tubo digestivo de las tilapias.

MUESTRA JAULA 14.	PESO DE VICERAS (g)	PORCION DE TUBO DIGESTIVO (g)	MUESTRA JAULA 1.	PESO DE VICERAS (g)	PORCION DE TUBO DIGESTIVO (g)	MUESTRA JAULA 19.	PESO DE VICERAS (g)	PORCION DE TUBO DIGESTIVO (g)
J14T11	10.9	0.8	J1T21	24.1	0.9	J19T31	32.3	1.2
J14T12	13.3	0.9	J1T22	20.1	1.0	J19T32	29.2	1.1
J14T13	12.6	1.0	J1T23	21.5	1.0	J19T33	37.3	1.0
J14T14	14.8	0.9	J1T24	19.5	1.1	J19T34	24.7	1.0
J14T15	10.1	1.0	J1T25	25.5	1.0	J19T35	27.7	1.0
J14T16	11.4	0.8	J1T26	21.1	1.0	J19T36	28.0	1.0
J14T17	13.5	1.0	J1T27	26.8	1.0	J19T37	29.3	1.0
J14T18	13.8	1.0	J1T28	23.5	1.0	J19T38	39.5	1.0
Peso promedio	12.6	0.9	Peso promedio	22.8	1.0	Peso promedio	31.0	1.0

La tabla N° 3 presenta los pesos obtenidos para las vísceras y el peso de la porción de tubo digestivo utilizado. Se observó que para la talla uno el peso promedio de las vísceras fue de 12.6 g y que el peso promedio del tubo digestivo fue de 0.9, para la talla dos un peso promedio de vísceras de 22.8 g y el peso promedio para el tubo digestivo fue de 1.0 y para la talla tres un peso promedio de vísceras de 31.0 g y el peso promedio del tubo digestivo de 1.0 g; por lo que pudimos establecer que a medida aumenta la talla de las tilapias se facilita la extracción del tracto digestivo por el aumento del tamaño de las vísceras y que estas se encuentran más desarrolladas.

La porción del tracto intestinal fue macerada y homogenizada en vortex por cinco minutos y se inoculó 100 µL de la solución por esparcimiento en placas con agar MRS por duplicado y se incubaron a 37 °C/ 48 h.

Se obtuvieron colonias características de *Lactobacillus* (circulares de color azul) (ver Anexo N° 19) solamente en cinco de las 24 muestras procesadas presentaron crecimiento bacteriano (ver tabla N°4), esto represento un 20.83% del total de las muestras. El bajo porcentaje de recuperación de *Lactobacillus* se vio afectado por la aplicación de antibiótico a la dieta de las tilapias la cual no fue informada por parte de los productores.

Tabla N°4. Muestras con crecimiento de Lactobacilos.

MUESTRAS CON CRECIMIENTO	CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS EN AGAR MRS
J14-T12	+
J14-T13	+
J1-T22	+
J19-T31	+
J19-T37	+

5.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS, MICROSCÓPICAS, Y PRUEBAS REALIZADAS DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS AISLADAS.

INCIÓN DE GRAM PARA COLONIAS CARACTERÍSTICAS.

A las colonias característica de cada muestra se les realizó la tinción al Gram y se observaron al microscopio para determinar: su morfología y arreglo celular (ver Anexo N° 20, Tabla N°5).

Tabla N° 5. Clasificación de cepas de acuerdo a la tinción GRAM

Muestra	Tipo de tinción GRAM.	
	GRAM +	GRAM -
J14T12	✓	—
J14T13	✓	—
J1T22	✓	—
J19T31	✓	—
J19T37	✓	—

PRUEBA DE CATALASA

Se colocó una gota de Peróxido de Hidrogeno en un portaobjetos y con la ayuda de asa estéril se tomó de cada aislado una porción de colonia y se esparció en el peróxido de Hidrogeno; un resultado positivo se evidencia por la formación de burbujas.

PRUEBA DE OXIDASA

De cada uno de los aislados bacterianos se tomó con asa estéril una cantidad de las colonias obtenidas en medio MRS, impregnando la zona coloreada de la tira reactiva.

Se evidencia un resultado positivo si la tira reactiva vira a un color azul-violeta luego de un minuto (Ver Tabla N° 5).

Tabla N°5. Morfología macroscópica, microscópica y pruebas para Lactobacilos.

Muestra	MORFOLOGÍA.		PRUEBAS	
	MACROSCÓPICA	MICROSCÓPICA	CATALASA	OXIDASA
J14T12	Colonias con forma circular, bordes enteros, superficie lisa, de aspecto húmedo, una elevación convexa, brillantes y una coloración azul intensa.	Bacilos cortos Grampositivos.	-	-
J14T13			-	-
J1T22			-	-
J19T31			-	-
J19T37			-	-

En el medio de cultivo agar MRS el cual es selectivo y diferencial para bacterias acidolácticas; las colonias se observaron con forma circular, bordes enteros, superficie lisa, de aspecto húmedo, elevación convexa, brillantes y una coloración azul intensa tanto de las colonias como del medio de cultivo y al

realizar la tinción de Gram, las cepas seleccionadas resultaron ser bacilos cortos Gram positivos catalasa y oxidasa negativos.

5.3 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS AISLADAS MEDIANTE EL SISTEMA DE GALERIAS ESTANDARIZADO API 50 CHL.

Se realizaron las pruebas API CHL 50 para identificar con certeza por medio de la fermentación de azúcares los lactobacilos aislados. El procedimiento realizado se muestra en la figura N° 9.

Se seleccionaron 2 cepas para su identificación: J14T13 y J19T37; de cada aislado se tomó 0.5 mL y se inocularon en dos tubos con 4.5 mL de caldo MRS y se incubaron a 37 °C por 24 horas, al finalizar el periodo de incubación se sembró por esparcimiento 100 µL en placas con agar MRS e incubadas a 37 °C durante 24 horas.

De los cultivos resultantes se tomó con ayuda de un asa estéril la mayor cantidad de bacterias y realizar una suspensión densa (S), en un tubo con 5 mL de agua destilada estéril se preparó una suspensión de turbidez igual a 2 McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión S y anotando en número de gotas (n=6).

Se abrió una ampolla de API 50 CHL Medium y se le agregaron 2 veces el número de gotas encontradas (2n=12); la suspensión obtenida fue homogenizada y luego se inoculó cada tubo de la galería y se recubrió los test con aceite de parafina para crear un ambiente anaerobio, y se incubaron a 37 °C por 24 y 48 horas.

RESULTADO DE API 50 CHL.

Tabla N°6. Resultados fermentación de azúcares cepa J14T13 y J19T37 (Test API 50 CHL a 24 y 48 horas)

CEPA	HORAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
J14T13	24	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
J19T37	24	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

CEPA	HORAS	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
J14T13	24	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
J19T37	24	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

CEPA	HORAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
J14T13	48	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
J19T37	48	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

CEPA	HORAS	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
J14T13	48	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
J19T37	48	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Las cepas aisladas fueron inoculadas en las galerías para identificar BAL (API 50 CHL), la cual permite determinar el patrón de fermentación de los 50 carbohidratos que contiene la prueba (Ver Anexo N° 30). Con ayuda del programa informático APIWEB se hizo posible la identificación de las cepas, dando como resultado:

La cepa con código J14T13 fue identificada como *Lactobacillus rhamnosus* y cumple con las siguientes características: bacteria de forma bacilar, Gram positiva, catalasa negativa, oxidasa negativa, fermenta principalmente los siguientes azúcares; glicerol, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-ramnosa, D-manitol, D-sorbitol, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-trehalosa, D-melezitosa, Gentibiosa, D-turanosa, D-tagatosa y gluconato de potasio; presento un 99.6% de coincidencia con el patrón de

fermentación del *Lactobacillus rhamnosus*, mientras que la cepa J19T37 presento un 99.9%de coincidencia con *Pediococcus pentosaseous* (ver Anexo N° 33).

El *Lactobacillus rhamnosus* es capaz de sobrevivir al ambiente ácido del tracto digestivo y colonizar las paredes de la luz intestinal; una vez establecida, equilibra la micro flora a lo largo de las paredes y reduce el crecimiento de patógenos en el tracto intestinal por la producción de bacteriocinas. Además, al estar adherido en las paredes normaliza la mucosa y aumenta el número de células secretoras de anticuerpos lo que mejorara la calidad de vida de las tilapias.

COSECHA DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS.

Una vez confirmada la presencia de bacilos Gram positivos se procedió a realizar la resiembra de los microorganismos aislados con asa estéril, en placas con agar MRS por el método del extendido de tal forma que en toda la superficie del medio quedara extendida la bacteria y lograr un mayor crecimiento de esta, las placas resultantes se codificaron según el código de la muestra y se incubaron a 37 °C/ 48 h.

Al finalizar el periodo de incubación se realizó la cosecha de los microorganismos, recogiendo la mayor cantidad de bacterias de la placa y colocándolas en 10 tubos plásticos de fondo cónico conteniendo 1.5 mL de caldo MRS + 15 % de glicerol como agente crioprotector, luego se homogenizaron y fueron debidamente identificados con el código de muestra y la fecha, los tubos fueron colocados en gradillas y almacenados en refrigeración a 5° por 12 horas y finalmente en el ultracongelador a -70 °C (ver Anexo N° 21).

5.4 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDOLÁCTICAS AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE LA TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* POR DIFERENTES PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS (PRUEBA DE HEMÓLISIS EN SANGRE HUMANA, CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO, PRUEBA DE TOLERANCIA A PH, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR Y CONTEO DE UFC/ML.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS.

De cada muestra se tomó un tubo plástico de fondo cónico (1.5 mL) almacenado en el ultracongelador a -70 °C para su caracterización.

5.4.1 PRUEBA DE HEMÓLISIS EN SANGRE HUMANA.

Se tomaron 100 µL de cada aislado y se colocaron en tres tubos con rosca con 9.0 mL de caldo MRS +2 % de NaCl y se incubaron a 37 °C durante 48 h, después del periodo de incubación los microorganismos fueron centrifugados a 3900 rpm por 10 minutos para obtener el sobrenadante, una vez obtenido el sobrenadante se le ajusto el pH a 6.5, esto para evitar falsos halos de lisis ocasionados por la acidez del medio.

Se preparó un juego de dos placas con agar sangre por muestra, a cada una se le perforaron 4 pozos de 6 mm; distribuidos homogéneamente y se inoculo 50 µL del sobrenadante en cada pozo, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h, tomando lectura cada 24h.

Después de realizar la prueba en sangre humana se procedió a clasificar las bacterias de acuerdo al tipo de hemólisis que presentaba (beta, alfa o gamma) (ver tabla N°7)

Tabla N° 7. Tipo de hemólisis de los aislados bacterianos.

Muestra	Tipo de hemólisis		
	β	α	γ
J14T12	—	—	+
J14T13	—	—	+
J1T22	—	—	+
J19T31	—	—	+
J19T37	—	—	+

Según los resultados obtenidos en la prueba de hemólisis, se observa que todos los lactobacilos aislados presentaron una hemólisis gamma lo que significa que es una bacteria no patógena, no producen lisis en las células sanguíneas contenidas en el agar sangre y con esto cumplen con el primer requisito para seleccionarlas como probióticas. (Ver Anexo N° 22)

5.4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

Para determinar las fases de crecimiento de las cepas aisladas realizamos la cinética de crecimiento en la cual inoculamos 84 μ L de cada uno de los microorganismos en 210 mL de caldo de MRS + 2 % de NaCl; dicho volumen fue fraccionado en 42 tubos con 5 mL, y se arreglaron en series de 3 tubos, estos sirvieron para realizar las lecturas a la 0, 6, 24, 48,72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 y 288 h. Además, se colocaron 15 tubos con 5 ml de caldo de RMS + 2 % de NaCl como blanco (Ver figura N°10). Los 39 tubos de caldo de MRS + 2 % de NaCl inoculados con el Lactobacilo en estudio y los 14 tubos de caldo de MRS + 2 % de NaCl (Blanco) fueron incubados a temperatura de 37°C

Se dejaron tres tubos de caldo de MRS + 2 % de NaCl inoculado con el Lactobacilo y se procedió a realizar la lectura de 0 horas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm llevando como blanco el caldo de MRS + 2 %

de NaCl. A las seis horas después de incubados los tubos se sacaron tres de la incubadora se realizó lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm llevando como blanco el caldo de MRS + 2 % de NaCl, Y así sucesivamente se fueron realizando las lecturas de 0, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 y 288 h. de incubación en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm llevando como blanco el caldo de MRS + 2 % de NaCl (Ver Anexo N° 23). En la tabla N° 8 se presentan las absorbancias promedio obtenidas de cada una de las bacterias después de realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm con el pasar de las horas.

Tabla N° 8. Recopilación de las absorbancias de las cepas aisladas.

TIEMPO	Muestras				
	J14T12	J14T13	J1T22	J19T31	J19T37
0	-0.017	-0.013	-0.002	-0.002	-0.011
6	-0.005	-0.009	0.003	0.002	-0.007
24	0.001	1.486	0.007	0.005	0.876
48	0.963	1.665	0.956	0.027	0.934
72	0.969	1.674	1.000	0.043	1.095
96	1.052	1.715	0.972	0.057	1.219
120	1.073	1.730	0.659	1.227	1.206
144	1.107	1.774	0.639	1.141	1.223
168	1.234	1.857	0.661	1.139	1.229
192	1.304	1.862	0.855	1.075	1.236
216	1.428	1.867	1.060	1.001	1.245
240	1.703	1.815	1.130	0.977	1.253
264	1.707	1.802	1.139	0.980	1.252
288	1.714	1.795	1.138	0.990	1.261

Los resultados obtenidos en la prueba de cinética de crecimiento de los Lactobacilos aislados, las muestras que presentaron una cinética de crecimiento aceptable son: J14T13 y J19T37; presentaron un periodo de adaptación corto y a las 24 horas después de haber sido inoculadas ya han alcanzado su fase exponencial con una tendencia lineal, y una fase estacionaria muy prolongada manteniéndose vivas por un largo tiempo. La adaptación de las demás bacterias es lenta y su fase exponencial variaba con el tiempo.

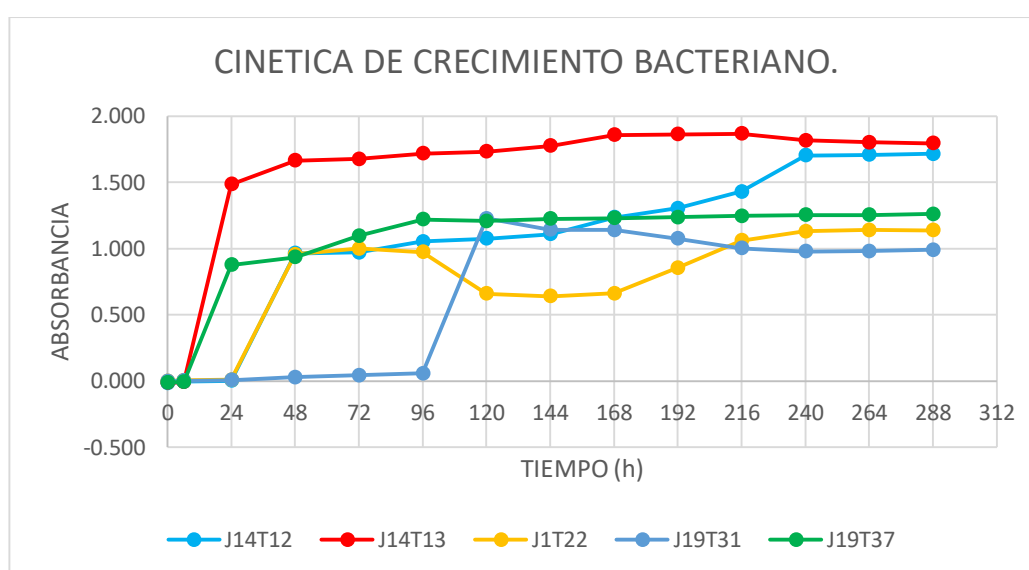


Figura N°10. Representación gráfica de la cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento indica que los Lactobacilos además de tener un crecimiento y adaptabilidad aceptable podrán mantenerse por más tiempo en el ambiente. Cabe mencionar que para este análisis no se pudo identificar la fase de muerte de las bacterias ya que se presentó una turbidez que no disminuía con el paso de los días, esto debido a la muerte celular y a la degradación del medio.

5.4.3. CONTEO DE UFC/mL.

Para determinar la cantidad de microorganismos viables presentes en una unidad de absorbancia, se inocularon 100 μ L de cada aislado en 3 tubos con 9 mL de caldo MRS + 2 % de NaCl y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Después de la

incubación cada cultivo se centrifugó a 3900 rpm por 20 minutos y la pastilla resultante se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril, a la suspensión resultante se le midió la absorbancia a una longitud de 580 nm y luego se ajustó a 1.0; se pipeteo 0.1 mL y se procedió a preparar hasta la dilución 10^{-8} ; de las cuales se utilizaron 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} de estas se tomó 1 mL, sembrando cada inoculo por duplicado por la técnica de placa vertida e incubadas a 37 °C durante 48 h. (Ver Anexo N° 24).

Los resultados obtenidos en el conteo de lactobacilos viables contenidos en una suspensión con absorbancia de 1.0 a 580 nm (ver Anexo N° 25); indica que todos los Lactobacilos poseen un recuento de 10^8 UFC/mL. Al observar la cinética de crecimiento (ver figura N°11) las bacterias con el código J14T13 en un período menor a 24 h alcanzan una absorbancia de 1.0 lo que resulta una ventaja ya que para ejercer su acción probiótica estas deben mantenerse en una concentración de 10^6 a 10^8 UFC.

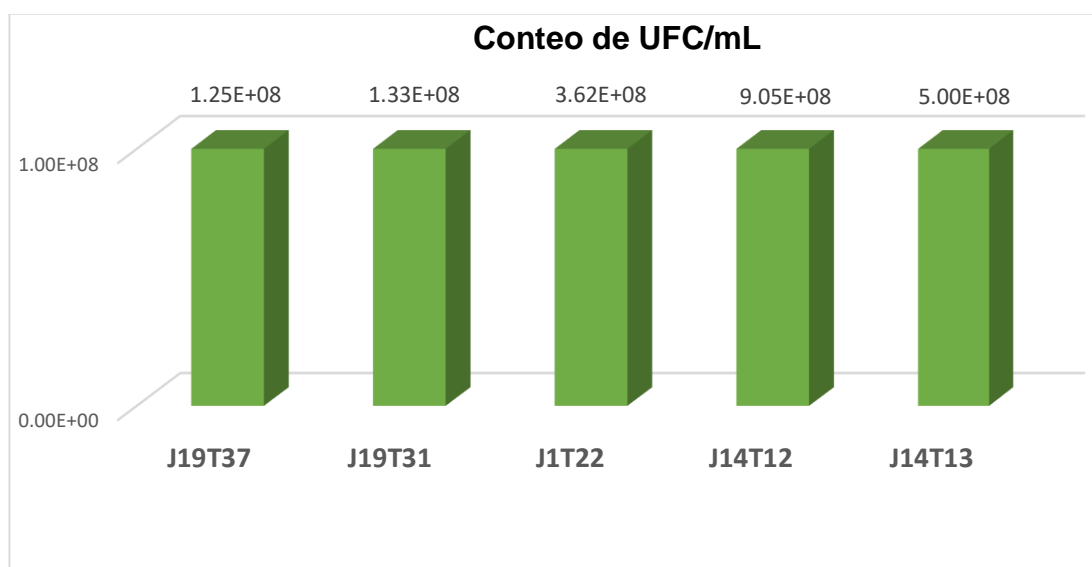


Figura N° 11. Representación gráfica del conteo de UFC/mL realizados a las cepas aisladas.

5.4.4 PRUEBA DE TOLERANCIA A pH.

Para determinar la tolerancia que poseen cada cepa aislada se inocularon 3 tubos con 10 μ L de cada aislado en 10 mL de caldo TSC + 2 % de NaCl, se incubaron a 37 °C por 48 h. Los cultivos resultantes fueron centrifugados a 3900 rpm por 15 minutos, luego de separar la pastilla del sobrenadante, esta se resuspendió con 10 mL de solución salina al 2 % y centrifugamos a 3900 rpm por 15 minutos; este proceso se realizó 3 veces más, con el fin de purificar el microorganismo y eliminar impurezas que pudieran afectar la prueba.

Una vez obtenida la pastilla esta se resuspendió con 1 mL de solución salina al 2 %, se midió la absorbancia a 580 nm y se ajustó a 1.0 (Ver Anexo N° 29).

Se prepararon una serie de caldos MRS + 2 % de NaCl y se ajustaron a los pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, estos fueron fraccionados en series de 3 tubos con 10 mL para cada microorganismo evaluado. Los tubos que contenían los caldos a diferentes pH se les inoculo 10 μ L de suspensión bacteriana estandarizada y se incubaron a 37 °C durante 48 h (ver figura N° 13).

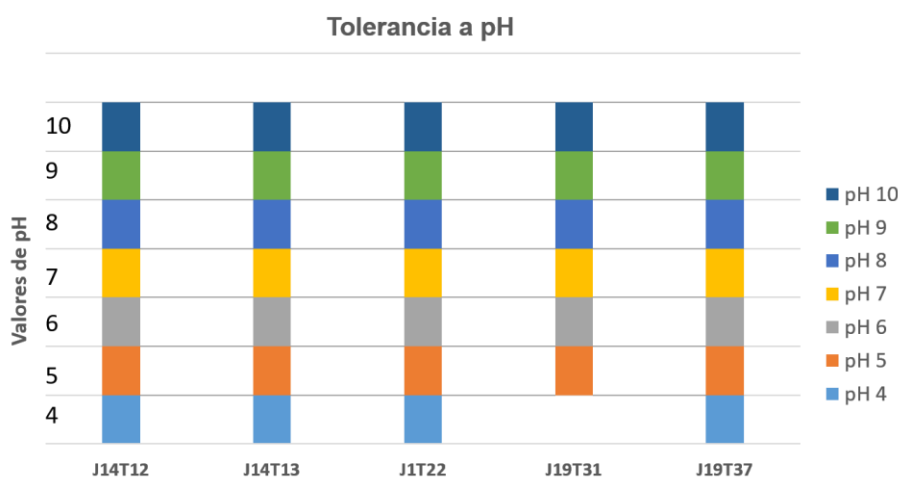


Figura N°13. Representación de grafica de la tolerancia a diferentes pH que poseen cada microorganismo aislado.

En la figura N°13 se observa que todas las bacterias analizadas sobreviven a un amplio rango de pH a excepción de la cepa con código J19T31 que no se vio un crecimiento en pH 4. Los resultados indican que la bacteria se puede adaptar a diferentes medios con un amplio rango de pH que va del 4 al 10; para nuestro caso el pH de aguas continentales es de 6.5 a 8.5 por lo que no representa un riesgo de muerte celular, además que al ser administrada por vía oral logrará sobrevivir a los diferentes tipos de pH fisiológicos a los que se expondrá tanto del estomacal como intestinal.

5.4.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Se prepararon 3 tubos con 10 mL de caldo MRS + 2 % de NaCl por cada cepa obtenida a los cuales se les inoculó 100 µL de cada aislado, estos fueron incubados a 37 °C durante 48 h.; después del periodo de incubación los cultivos fueron centrifugados a 3900 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante.

El microorganismo patógeno fue proporcionado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería; dicho microorganismo fue estandarizado para determinar la concentración de prueba de 5×10^4 UFC. Se sembró por esparcimiento 100 µL de *Streptococcus sp* en placas con agar TSA por duplicado, luego se colocaron 5 cilindros de acero inoxidable estériles por placa, estos fueron inoculados con 200 µL de sobrenadante obtenido de las cepas aisladas, al terminar el proceso de inoculación de sobrenadante de las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en ambiente con 15% de CO₂ (Ver Tabla N° 9)

Después del periodo de incubación se observó inhibición representada por la formación de halos claros alrededor de los cilindros que contenían el sobrenadante obtenido por medio de centrifugación de un cultivo de BAL de 48 h

Tabla N°9. Resultados obtenidos de la actividad antibacteriana evaluada contra *Streptococcus*.

	J14T12	J14T13	J1T22	J19T31	J19T37
Numero de halos	10	10	5	10	10
Media (mm)	11.6	14.4	9	10.1	11.7
Desviación estándar	1	0.5	0	1.7	0.8
Varianza	0.9	0.3	0	2.8	0.7
Mayor (mm)	13	15	9	12	13
Menor (mm)	10	14	9	8	11

Los resultados obtenidos en la prueba de actividad antibacteriana de los Lactobacilos aislados contra el *Streptococcus* se presentan en la tabla N° 9. El único Lactobacilo que presento actividad antibacteriana es la cepa J14T13 ya que en promedio los halos fueron mayores a 14 mm, lo que significa que el *Streptococcus* es medianamente sensible a las bacteriocinas liberadas por este *Lactobacilo*. (ver Anexo N° 26). Los valores de desviación y varianza en esta cepa muestran que la longitud de los halos son similares entre sí y que ejercen una acción uniforme contra el *Streptococcus*. Esta característica es una de las más importantes en este estudio y solo la J14T13 es la que cumple con este requisito por lo que es candidata segura para tomarla como microorganismo probiótico. En las demás cepas si bien hubo halo de inhibición, no logra superar el valor de mm aceptable por lo que se considera que el *Streptococcus* es resistente a las cepas por lo que no pueden ser elegidas como probióticas para esta investigación

5.4.6 DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR

- Prueba de degradación de la caseína (proteasas).
- Prueba de hidrólisis de la gelatina (proteasas).

- Prueba de hidrólisis de Tween 80 (lipasas).

Con el fin de determinar la actividad de enzimas extracelulares (proteasas y lipasas) de las cepas aisladas se procedió de la siguiente forma:

De cada aislado bacteriano se inocularon 10 μ L en cada uno de tres tubos con caldo TSC + 2 % de NaCl y se incubaron a 37 °C durante 48 h.

Por otra parte, se prepararon tres porciones de 120 mL de agar MRS + 2 % NaCl, a los cuales se le incorporó soluciones estériles diferentes (A. 2 % de solución de leche descremada, B. 1 % de solución de gelatina, C. 1 % de solución de Tween 80) a una temperatura de 45 °C; los cuales fueron plaqueados por duplicado y que posteriormente a estas placas se les realizaron 4 pozos de 6 mm distribuidos homogéneamente en cada placa

Al terminar el periodo de incubación los cultivos fueron centrifugados a 3900 rpm por 10 minutos para obtener el sobrenadante. Los pozos fueron llenados con 50 μ L del sobrenadante obtenido; las placas se incubaron a 37 °C por 48h y después de las 48 h se realizó la lectura correspondiente.

Según los resultados obtenidos en la prueba de hidrolisis enzimática de los Lactobacilos, estos no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos. Esto significa que no hay presencia de enzimas extracelulares que puedan degradar los componentes como proteínas y lípidos; con esto se cumple una de las características descrita por la bibliografía. (Ver Anexo N° 27)

Tabla N°10. Resultados obtenidos de la actividad extracelular de los microorganismos aislados.

Actividad enzimática extracelular			
Muestra	Degradación de la Caseína	Degradación de Tween 80	Degradación de la Gelatina
J14T12	NDS	NDS	NDS
J14T13	NDS	NDS	NDS
J1T22	NDS	NDS	NDS
J19T31	NDS	NDS	NDS

5.4.7 ADHESIÓN MICROBIANA A XILENO, TOLUENO Y CLOROFORMO.

De cada aislado se transfirieron 100 μ L a cada uno de tres tubos con 10 mL de caldo MRS + 2 % de NaCl e incubados a 37 °C durante 48 horas. Los cultivos resultantes fueron centrifugados a 3900 rpm por 15 minutos para obtener la pastilla, a esta se le agregaron 10 mL de solución buffer (conocida como PUM la cual posee una alta fuerza iónica, promueve la adhesión bacteriana y minimiza los efectos electrostáticos) y centrifugando a 3900 rpm por 15 minutos; este proceso de lavado fue repetido dos veces más. La pastilla resultante se re suspendió con 1 mL de solución buffer y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (A0), la suspensión bacteriana se estandarizo a 1 de absorbancia llegando a 27 mL porque la prueba es por triplicado.

Se prepararon una serie de 9 tubos por muestra, 3 por cada solvente (xileno, tolueno y cloroformo) a estos se colocó inicialmente 3 mL de suspensión bacteriana estandarizada y luego 1 mL de xileno a cada uno de 3 tubos y así sucesivamente para cada solvente.

Se obtuvo un sistema de dos fases y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos; una vez pasado el tiempo de reposo se procedió a mezclar en vortex por dos minutos cada tubo e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos (ver figura N°18), al terminar este periodo se removió la fase acuosa y se midió la absorbancia a 600 nm (A1).

El porcentaje de adhesión bacteriana a los diferentes solventes se calculó como:

$$\% \text{ de adhesión} = \frac{1-A1}{A0} * 100 \text{ y los resultados se muestran en la tabla N° 11.}$$

Tabla N°11. Porcentaje de adhesión de los aislados a los diferentes solventes.

Muestra	% Adhesión a Cloroformo	Tipo de adhesión	% Adhesión a tolueno	Tipo de adhesión	% Adhesión a Xileno	Tipo de adhesión
J14T12	14.69	Baja	0.45	Baja	1.74	Baja
J14T13	96.93	Alta	57.48	Media	47.52	Media
J1T22	20.60	Baja	1.74	Baja	1.00	Baja
J19T31	-3.39	Baja	-2.15	Baja	-4.74	Baja
J19T37	-5.83	Baja	-1.72	Baja	-1.17	Baja

Esto significa que las bacterias pueden tener en su membrana grupos funcionales como grupos carboxílicos (COO-), fosfatos (PO4-2) y grupos aminos (NH2) que les permitirá adherirse fácilmente al alimento y una vez consumido ser liberadas en el tracto gastrointestinal del hospedero y lograr adherirse a este para ejercer su actividad probiótica mejorando así su metabolismo y la inmunidad de las tilapias.

En la figura N°12 se observa la adhesión microbiana que puede tener cada una de las bacterias con respecto a los diferentes solventes, < 30 % baja; ≥ 30 % - < 60 % media; ≥ 60 % alta. En este caso la cepa con código J14T13 presenta alta adhesión a cloroformo y media para los solventes xileno y tolueno; esta cepa demostró el mayor grado de adhesión a solventes con respecto a las demás, esto la hace buena candidata a probióticas ya que esta prueba es importante para la selección. (Ver Anexo N° 28)

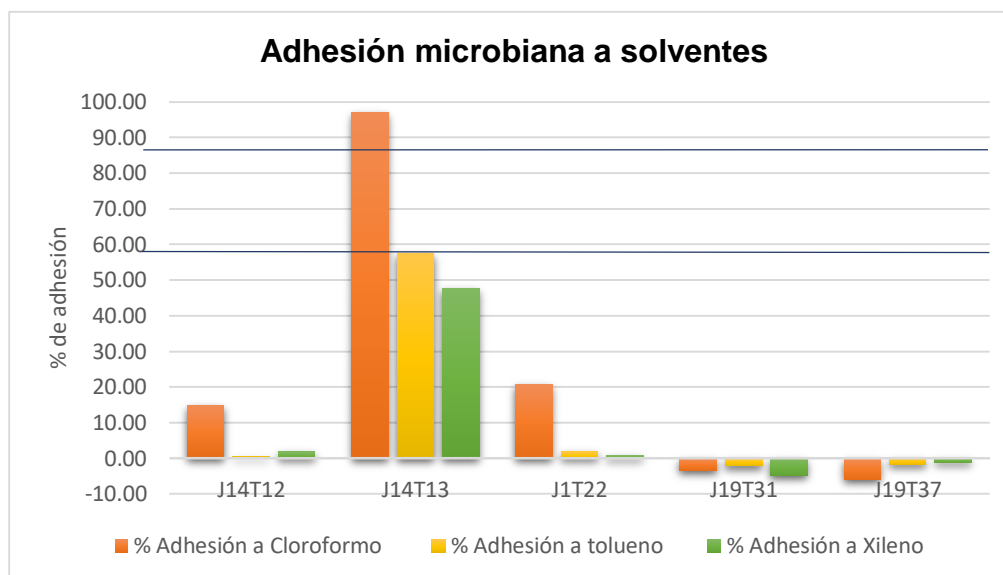


Figura N°12. Porcentaje de adhesión de los aislados a los diferentes solventes.

5.4.8 RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA.

Tabla N°12. Tabla resumen de las pruebas realizadas para la caracterización probiótica a las cepas aisladas.

Parámetro		Muestra					R/E
		J14T12	J14T13	J1T22	J19T31	J19T37	
Tinción Gram		+	+	+	+	+	Bacterias gram Positivas
Hemólisis		Y	Y	Y	Y	Y	Bacterias γ Hemolíticas
Cuento UFC/mL		9.05E+08	5.00E+08	3.62E+08	1.33E+08	1.25E+08	Entre 10^6 - 10^8 UFC
Tolerancia a pH		4 - 10	4 - 10	4 - 10	5- 10	4 - 10	Amplio rango de pH
Actividad enzimática	Degradación de la caseína	NDS	NDS	NDS	NDS	NDS	Leve o nula actividad enzimática. No deben formarse halos claros alrededor del pozo.
	Degradación de la gelatina	NDS	NDS	NDS	NDS	NDS	
	Degradación del Tween 80	NDS	NDS	NDS	NDS	NDS	
Adhesión a solventes	% de adhesión a cloroformo	14.69	96.93	20.60	-3.39	-5.83	Debe adherirse a los diferentes solventes orgánicos. Formación de suspensión blanca al fondo del tubo.
	% de adhesión a tolueno	0.45	57.48	1.74	-2.15	-1.72	
	% de adhesión a xileno	1.74	47.52	1.00	-4.74	-1.17	
Actividad antibacteriana (mm)		13.0	14.4	9.0	12.0	13.0	Alta o mediana actividad antibacteriana.
Identificación		—	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	—	—	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Formación de halos claros alrededor del pozo

Una de las principales características a considerar en una especie bacteriana para evaluar su potencial probiótico es su inocuidad, tanto para el hospedero objetivo como para el ser humano que es el consumidor final de la especie de cultivo. La prueba de hemólisis es una de las aplicables en este sentido, ya que se basa en la capacidad de la bacteria de lisar las células sanguíneas del hospedero, en este caso, las cepas evaluadas no representan un riesgo para la tilapia al presentar hemólisis gamma. También, poseen un amplio rango de pH que se extiende de 4 a 10 que las hace adaptarse a diferentes medios a excepción de la J14T31 que no presentó crecimiento en pH 4. La prueba de actividad enzimática extracelular indica que no presentan actividad proteolítica ni lipolítica observable en medio sólido, la prueba de adhesión es un parámetro muy importante a considerar porque brinda información aproximada de la adherencia del microorganismo en el epitelio intestinal de la tilapia, únicamente la J14T13 que tiene gran afinidad por el cloroformo, indicado que en la superficie existen propiedades donadoras de electrones gracias a la presencia de grupos básicos, como por ejemplo, grupos carboxílicos (COO⁻), fosfatos (PO₄⁻²) y grupos aminos (NH₂). La capacidad de adherencia de los aislados obtenido del tracto gastrointestinal de *Oreochromis niloticus* se determinó in vitro y por último tenemos la prueba de actividad antibacteriana, que nos indica que tan resistente o sensible es el patógeno a las bacteriocinas generadas por las BAL; en este estudio la bacteria con código J14T13 fue la que presentó una mayor sensibilidad frente al *Streptococcus*.

Después de haber realizado todas las pruebas de caracterización para seleccionar las bacterias con potencial probiótico se puede observar que la única cepa que cumple con todas las características probióticas es la J14T13 que al ser identificada por medio de las pruebas API resultó ser un *Lactobacillus rhamnosus* por lo que será la bacteria a estar disponible en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química Y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

5.5 ANÁLISIS DEL AGUA

TOMA DE MUESTRA

Para determinar la calidad bacteriológica del agua, se recolectaron 2 muestra de agua dentro de cada una de las 3 jaulas flotantes de donde se extrajeron las muestras de tilapia y otras 2 más fuera de estas jaulas. Las muestras dentro de la jaula se recolectaron en el centro de la jaula y a 2 m de profundidad, las muestras fuera de la jaula fueron tomadas a 5 m de profundidad y a 2 m de distancia de la jaula. Todas las muestras se colocaron en frascos plásticos estériles de 1 Litro, estas se codificaron como: "FJ" para las muestras tomadas fuera de la jaula y para las muestras tomadas dentro de las jaulas, "DJ + N° de jaula + N° de muestra" ej.: DJ14 2; se almacenaron en hielera con hielo a T de 5.0 °C y fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de la facultad de Química y Farmacia.

5.5.1 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y E. COLI POR EL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).

Para determinar la cantidad de coliformes totales y coliformes fecales se utilizó el método de Numero Más Probable (NMP) y la serie de 9 tubos con caldo Florocult LMX, de estos 3 eran de concentración doble y los 6 restantes de concentración simple.

Las muestras que fueron tomadas fuera de las jaulas se trabajaron puras; cada una de las muestras de agua fueron agitadas en sus frascos vigorosamente por 2 minutos para homogenizar su contenido, de las muestras que procedían fuera de la jaula se tomó 10 mL con pipeta Morh estéril y se colocaron en cada uno de 3 tubos con caldo Florocult LMX de concentración doble, posteriormente se tomaron 1 mL para 3 tubos con caldo Florocult LMX de concentración simple y por último 0.1 mL de muestra para 3 tubos con caldo Florocult LMX de concentración simple; para las muestras que se tomaron dentro de la jaulas se

trabajaron con la dilución 1:100, de esta dilución se tomaron los volúmenes para la misma cantidad de tubos como las muestras antes mencionadas. Cada serie de tubos fue rotulada según el código asignado a la muestra e incubados a 35 °C por un periodo de 48 h.

Luego de la incubación se tomaron las lecturas correspondientes; los tubos que presentaron coloración azul verdosa (ver anexo N°31) se tomó 100 µL y se inocularon en tubos con caldo EC los cuales se incubaron a una temperatura de 44.5 °C por 24 h. en baño María con recirculación. Después de la inoculación en caldo EC se realizó las pruebas de Indol con el reactivo de Kovack y fluorescencia en presencia de luz UV para evidenciar la presencia de *E. coli* (ver anexo N°31).

5.5.2 CONTEO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS.

De cada muestra de agua se prepararon las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y de cada una se tomó 1 mL se colocó en placas de Petri por duplicado; de las muestras obtenidas dentro de las jaulas se tomó 0.1 mL de la dilución 10^{-2} por duplicado, a cada placa se le añadió de 15 a 20 mL de agar Plate Count fundido (45 °C), se homogenizo el inóculo con el agar, una vez solidificado el medio las placas fueron incubadas a 35 °C por 48 h. Luego del periodo de incubación se realizó en conteo correspondiente y los resultados se muestran en la tabla N° 13 y figura N°14.

De acuerdo a la guía establecida por el CONAMA para la calidad del agua utilizada para la vida acuática debe estar en la clase 2 BUENA CALIDAD. Esto se cumple solamente para las muestras que se recolectaron fuera de la Jaulas.

Según los resultados del análisis bacteriológico del agua del lago de Ilopango estaría clasificado en clase 3 para muestras recolectadas dentro de las jaulas en la cual los límites son de 5000 NMP/100 ml para las Coliformes Totales, 2000 NMP/100 ml para las Coliformes Fecales y 1000 NMP/100 ml para la ***Escherichia coli***.

Tabla N° 13. Resultados de coliformes totales, fecales, E. coli por NMP y recuento de bacterias heterótrofas por placa vertida.

Muestra	Coliformes Totales	Coliformes Fecales/E. coli	Bacterias heterótrofas UFC/mL
FJ1	53	29	350
FJ2	> 1100	43	710
DJ141	110000	23000	1.51E+04
DJ142	110000	1100	1.55E+04
DJ11	3900	3600	1.51E+04
DJ12	46000	1100	3.59E+04
DJ191	29000	9100	1.73E+04
DJ192	24000	1100	1.45E+04

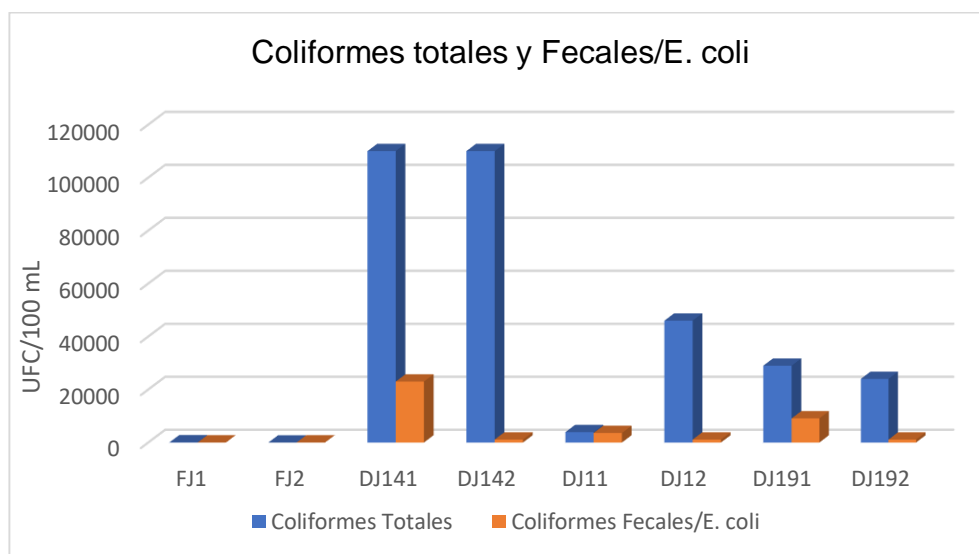


Figura N° 14. Gráfica de valores registrados de Coliformes Totales, Fecales y *Escherichia coli* a partir de muestras de agua recolectadas del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango.

En la gráfica se pueden observar que los valores obtenidos de la cuantificación de las Coliformes Totales en las muestras recolectadas dentro de la Jaula 14 no cumplen con el límite máximo establecido por el CONAMA (5000 NMP/100 ml) ni en la clase 3 y las Coliformes fecales están justo el límite máximo (2000 NMP/100 ml) , indicando que existe contaminación fecal que afecta la calidad del agua y las Tilapias están en contacto directo y mantenerse en la cadena alimenticia afectando por ende la salud de los consumidores de Tilapia cruda.

La mala calidad del agua dentro de las jaulas se debe al desperdicio de alimento que genera incremento en el número de microorganismos en el agua, y aunado a esto se da el ingreso de materia fecal que llega a través de afluentes o ríos al lago.

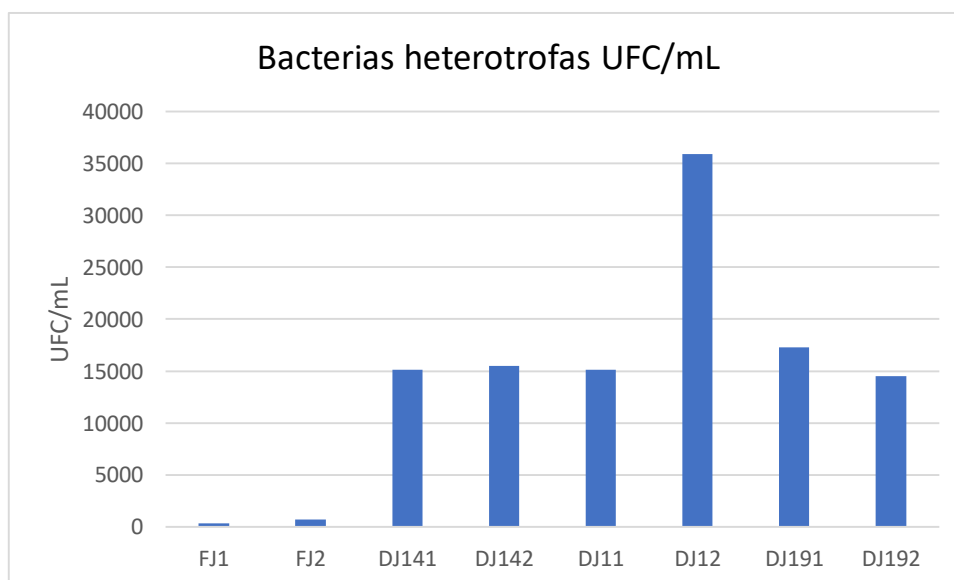


Figura N°24. Gráfica de valores registrados de Bacterias Heterótrofas a partir de muestras de agua recolectadas del proyecto Bedalton en el lago de Ilopango.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las bacterias heterótrofas en las muestras tomadas dentro de las cuatro jaulas en el proyecto Bedalton confirman que existe gran cantidad de materia orgánica y desechos de alimento que promueven el desarrollo de bacterias no deseados que convierten el agua en medio de cultivo y vuelven el ambiente hostil para la tilapia, generando disminución de oxígeno, aumentos de sustancias tóxicas, malos olores y desarrollo de enfermedades.

En la figura N° 24 se observa que las jaulas, aunque se encuentran alejadas de la orilla existe peligro de contaminación, por falta de higiene de la población que vive en la zona, muchos desechos que generan las personas fueron encontrados cerca de los lugares de cultivo, esa contaminación llega hasta las jaulas donde son retenidas por las redes que están sumergidas. En el lugar no se detectaron fosas sépticas o letrinas, pero una fuente de contaminación son los desechos generados por el ganado y otros animales domésticos.

5.5.3 DETERMINACIÓN DE STREPTOCOCCUS EN AGUA.

Con el propósito de determinar la presencia de Estreptococos en el agua donde son cultivadas las tilapias de cada muestra de agua obtenida se inocularon 90 mL de Caldo Tripticosa Soya (CASOY) con 10 mL de agua y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Después del periodo de incubación, de los cultivos resultantes se tomó con asa estéril un inóculo y se estirió en agar sangre por duplicado y se incubaron a 37 °C durante 24 h. en ambiente con 15% de CO₂.

Después de aislar y posteriormente sembrar las bacterias en agar sangre no se observó formación de halo claro en las placas por lo que se puede decir que había una ausencia de patógenos en el agua que pudiesen dañar de una forma directa a las tilapias y afectar su salud.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. El aislamiento de bacterias acidolácticas es un proceso complejo y riguroso con porcentajes de rendimientos muy bajos según los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que de 24 tilapias procesadas solamente un 20.83% de las muestras permitieron el crecimiento de bacterias acidolácticas. El bajo porcentaje de rendimiento se debe en gran medida a la adición de antibióticos por parte del productor al agua tiempo antes de la toma de muestras y pobre biodiversidad de bacterias benéficas presentes en el medio de cultivo de los peces.
2. De acuerdo a las características morfológicas macroscópicas, microscópicas, pruebas de catalasa y oxidasa y la identificación bioquímica con el sistema API se determinó que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* está presente en la muestra J14T13.
3. En la caracterización con fines probióticas de bacterias acidolácticas aisladas, los mejores resultados se observaron en las tilapias de menor talla. La muestra con el código J14T13 en condiciones in vitro demostró poseer todas las características probióticas estudiadas, demostrando una hemólisis gamma, tolera un amplio rango de pH, con adhesión buena a solventes orgánicos, genera bacteriocinas con una sensibilidad media-alta en el patógeno estudiado.
4. En el análisis microbiológico de agua la calidad dentro de las jaulas es muy pobre debido a la cantidad de materia fecal y materia orgánica presente, esto contribuye a que las tilapias no tengan una condición adecuada de cultivo; sin embargo, no hubo presencia de *Streptococcus* en las muestras de agua ya

que aún se encontraban restos de antibiótico que fue administrado en la dieta alimenticia de los peces.

5. La cepa seleccionada como probiótica fue almacenada en condiciones adecuadas para ser conservadas íntegras durante el periodo que se requiera en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y quedará a disposición para ser utilizada en futuras investigaciones.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES.

1. Que en futuras investigaciones se continúe con las pruebas de caracterización de bacterias con potencial probiótico in vivo en futuras investigaciones, para obtener resultados más certeros y confiables para mejorar los procesos productivos en la industria acuícola; de esta manera se pueda erradicar el uso indiscriminado de antibióticos y al mismo tiempo ser una alternativa para mejorar el estado de salud de las tilapias y por ende la productividad.
2. Que los dueños de jaulas flotantes que cultivan tilapias implemente un programa de limpieza de jaulas y monitoreos microbiológicos del agua de cultivo para evitar la contaminación por retención y descomposición de alimentos u otros desechos que puedan ocasionar enfermedades al organismo y al consumidor final.
3. Que la Universidad de El Salvador en conjunto con CENDEPESCA realicen investigaciones de otros patógenos que puedan encontrarse en las condiciones de cultivo y que también puedan dañar al organismo.
4. Que el MAG en coordinación con CENDEPESCA capaciten a los dueños de proyectos y personal involucrado en el cultivo de las tilapias en el uso de probióticos como alternativa que ayudara a mejorar de la salud y bienestar de las tilapias.
5. Que la Universidad de El Salvador divulgue en medios y artículos científicos los resultados obtenidos sobre aislamiento y caracterización de bacterias con potencial probióticos realizados en el país, ya que en la actualidad no existe mucha información de este tema a nivel nacional.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcántar Vázquez, J., Santos Santos, C., Moreno De La Torre, R. y Antonio Estrada, C. (2015). *Manual para la producción de supermachos de tilapia del Nilo (Oreochromis niloticus)*. 1st ed. [ebook] México D.F., pp.10-12. Disponible en: <http://www.unpa.edu.mx/investigacion/27%20de%20feb%202015%20lectura.pdf> [Consultado el 28 Ene. 2017].
2. Amador del Ángel L.E., E. del C. Guevara Carrió, R. Brito Pérez y E. Endañú Huerta. (2014). Ficha técnica tilapia *Oreochromis niloticus*, proyecto No. GN004. Universidad Autónoma del Carmen. Centro de Investigación de Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias Naturales. Informe final SNIB-CONABIO México D. F. Disponible en: www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/GN004_Ficha_Tilapia.pdf [Consultado el 28 Ene. 2017].
3. Arcos Pulido, M., Ávila de Navia, S., Estupiñán Torres, S. and Gómez Prieto, A. (2015). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA*, 3(4), pp.72-74. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf [Consultado el 10 Feb. 2017].
4. B. T. Standen, A. Rodiles, D. L. Peggs, S. J. Davies, G. A. Santos y D. L. Merrifield. (2015). Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 8403-8417.
5. Caracterización de la Cadena productiva Acuícola (TILAPIA). Ministerio de agricultura y ganadería (MAG), [ebook] El Salvador. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B4133e/B4133e.pdf> [Consultado el 17 Feb. 2017].

6. Cavallini, E., Gamboa Coronado, M., Hernández Chavarría, F. y García Hidalgo, J. (2005). Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. 1st ed. Editorial Universidad de Costa Rica., p.202.
7. Fao.org. (2017). FAO Pesca Oreochromis niloticus. [online] Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es [Consultado el 28 Ene. 2017].
8. Google Books. (2017). Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. [online] Disponible en: <https://books.google.com.sv/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&dq=tinci%C3%B3n+gram&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi2iKz4r5vSAhXBRSYKHeGLAO4Q6AEIGjAA#v=onepage&q=tinci%C3%B3n%20gram&f=false> [Consultado el 3 Feb. 2017].
9. Google Books. (2017). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. [online] [Consultado el 3 Feb. 2017].
10. Hsien-Tsang S., Quintanilla M. (2008). Manual sobre cultivo y reproducción de tilapias. CENDEPESCA. [ebook] El Salvador. Disponible en: api.gobiernoabierto.gob.sv/documents/119824/download.
11. Itis.gov. (2017). ITIS Standard Report Page: Oreochromis niloticus. Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=553310#null [Accessed 30 Jan. 2017].
12. Laurent Verschuere, W. (2017). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. [online] PubMed Central (PMC).
13. M. C. Monroy, T. C. Barrera, F. J. Fernández y L. Myorga. (2009). Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México.

14. Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de Calidad e Inocuidad. 1st ed. [ebook] Disponible en: <http://www.funprover.org> [Consultado el 29 Ene. 2017].
15. Mena, Z. (2015). Calidad de Agua Lago de Ilopango 2014. [online] Marn.gob.sv. Disponible en: <http://www.marn.gob.sv/descarga/calidad-de-agua-lago-de-ilopango-2014/> [Consultado el 2 Feb. 2017].
16. Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller (2009). Microbiología Médica (6a edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 225-242 [Consultado el 9 Feb. 2017].
17. Respyn.uanl.mx. (2017). RESPYN. [online] Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/ensayos/bifidiobacterium.htm> [Consultado el 1 Feb. 2017].
18. S.C Beristain-Bauza, E. Palou y A. López-Malo. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos, Temas selectos de ingeniería de Alimentos, 6(4), pp.64-78.
19. Sánchez Ortiz, A. (2015). Evaluación del potencial probiótico de bacterias aisladas del tracto digestivo de la almeja Pata de Mula Anadora tuberculosa en el cultivo de invertebrados marinos de importancia comercial.. Doctorado. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste (CIB).
20. Saavedra Martínez, M. (2006). Manejo del cultivo de tilapia.1st ed. [ebook] Nicaragua. Disponible en: <http://www.crc.uri.edu/download/MANEJO-DEL-CULTIVO-DE-TILAPIA-CIDEA.pdf> [Consultado el 20 Feb. 2017].

21. Samaniegos, L. M. y Sosa, M. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y Bioconservadora, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Cuba.
22. Sites.google.com. (2017). Capacidad hemolítica - Prácticas de Microbiología. [online] Disponible en: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/identificacionbacteriana/capacidad-hemolitica> [Consultado el 1 Feb. 2017].
23. Unavarra.es. (2017). MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL. [online] Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-8.htm> [Consultado el 8 Mar. 2017].
24. Vallejo., P. M. (13 de Diciembre de 2012). Estadística Aplicada a las Ciencias Sociales, Tamaño necesario de la muestra. Obtenido de Universidad Pontificia Comillas, Madrid, Facultad de Humanidades.: <http://www.upcomillas.es/personal/peter/investigacion/Tama%F1oMuestra.pdf>

GLOSARIO.

Acuicultura: Conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de especies acuáticas vegetales y animales.

Probióticos: Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas, además de ser una opción de contrarrestar el uso de antibióticos.

Hemolisis bacteriana: fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) que se encuentran en el agar sangre.

Tinción de gram: Tipo de tinción diferencial empleado para la visualización de bacterias. De acuerdo a esto se pueden obtener bacterias gram positivas o gram negativas.

Actividad antibacteriana: Capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias

Número más probable: Este método se usa para contar microorganismos difíciles de cultivar en medio sólido, o para determinar el número de células que pueden crecer en un medio líquido determinado, como el análisis para determinar la contaminación del agua potable, determinando el número de bacterias *Escherichia coli* que pueden crecer en un medio con lactosa

Ictiofauna: conjunto de especies de peces que existen en una determinada región biogeográfica.

ANEXOS

ANEXO N° 1.

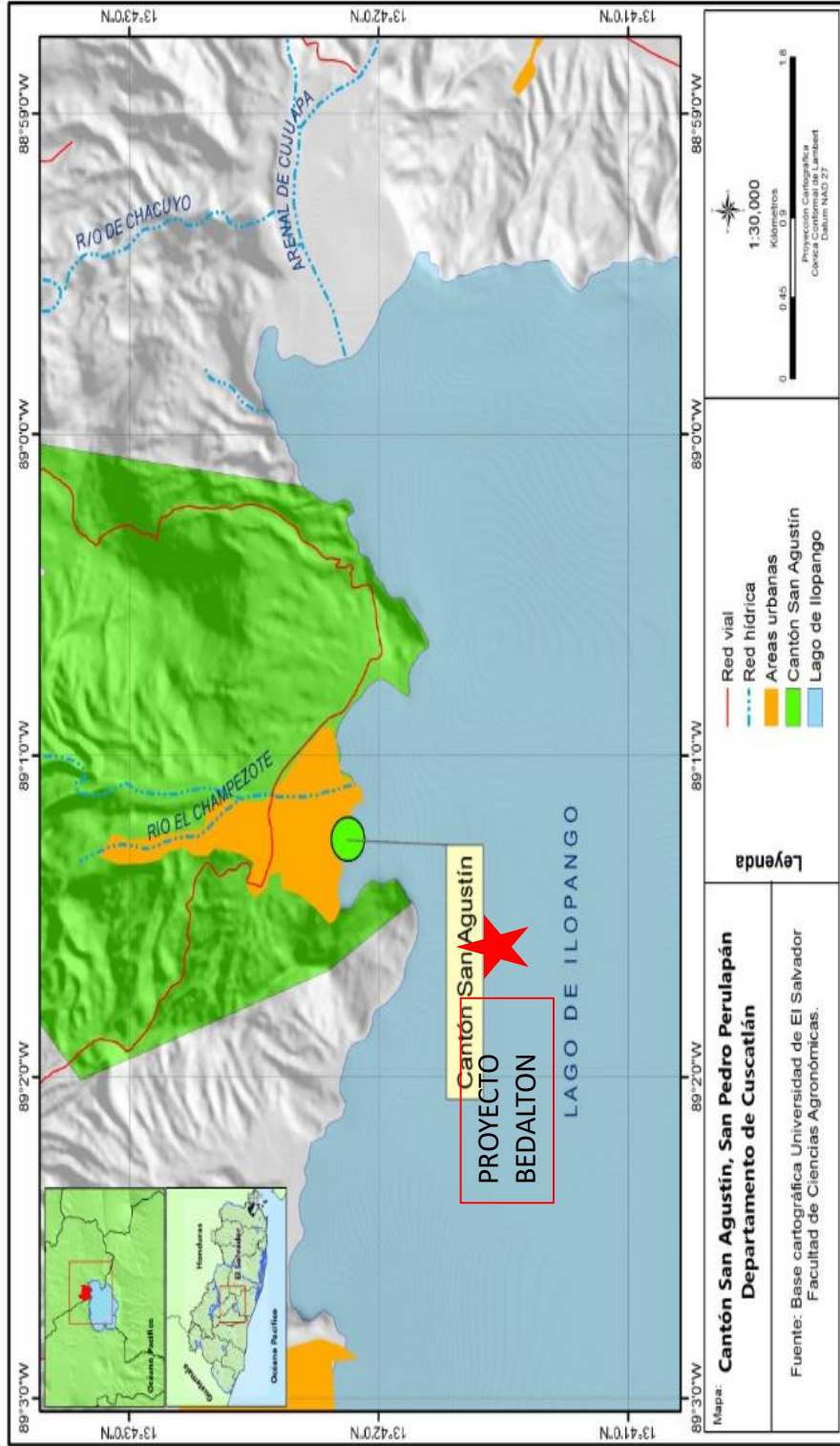


Figura N° 1. Ubicación geográfica del cantón San Agustín, San Pedro Perulapán, Cuscatlán.

ANEXO N° 2.

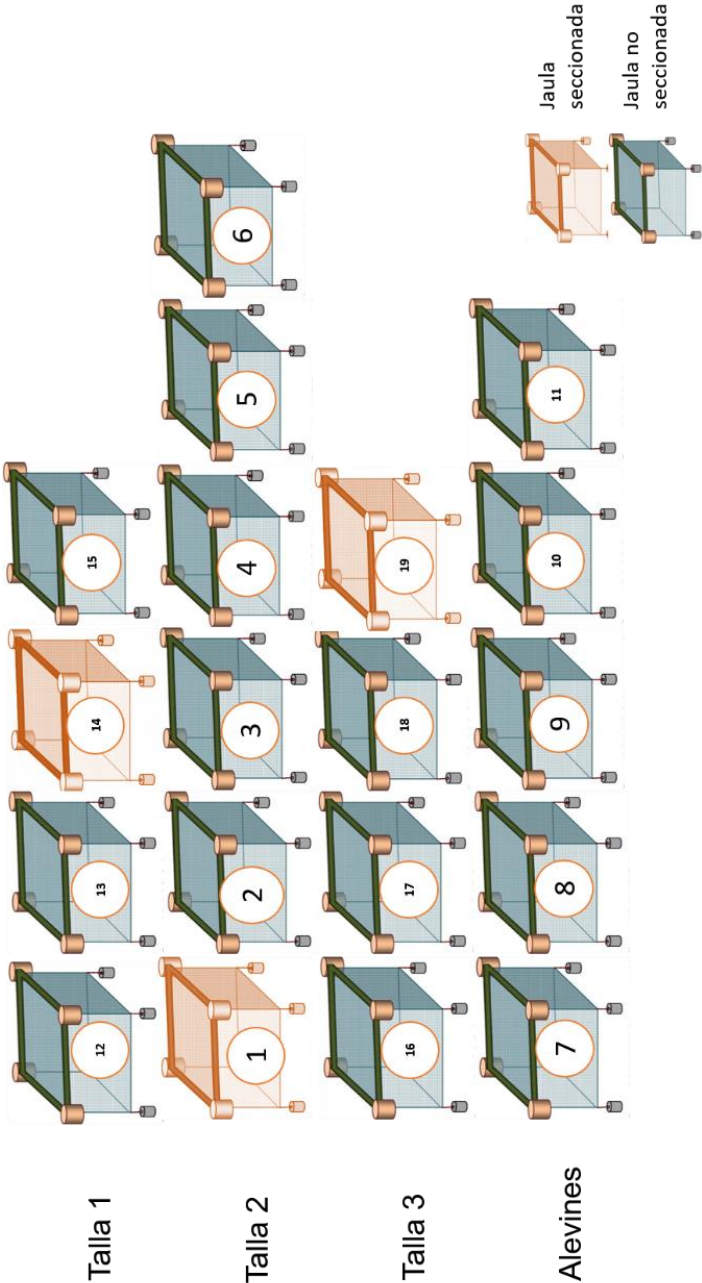


Figura N° 2. Esquema de muestreo de tilapias en el Lago de Ilopango

ANEXO N° 3.



Figura N°3. Esquema de Aislamiento de bacterias ácidolácticas (BAL).

ANEXO 4.



De los microorganismos cosechados en el literal 7.4.5 se saca del congelador



Pipetear 10 ul del mo y adicionarlo en 10 ml de caldo MRS con NaCl al 2% y mezclar para BAL

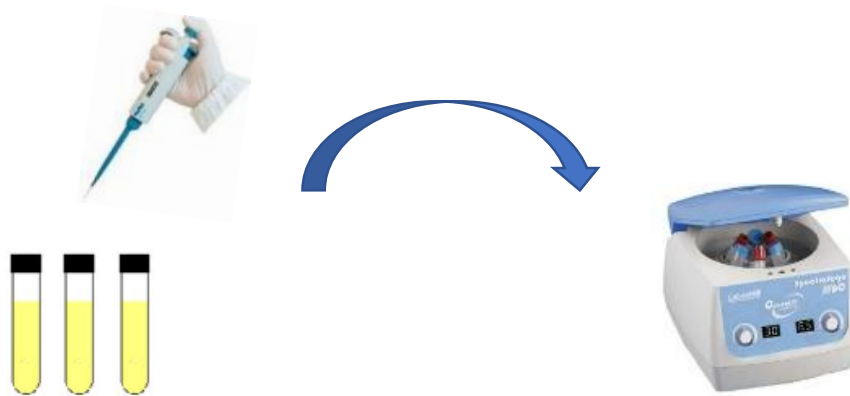


Incubar a 37°C durante 24 horas el TSB y 48 horas para el MRS

Figura N° 4. Esquema de caracterización de los microorganismos aislados.

ANEXO 5.

ESQUEMA DE PRUEBA DE HEMOLISIS EN SANGRE.



Pipetear 100 μ L de cada aislado bacteriano y sembrar en tres tubos con rosca con 9 mL de caldo MRS con 2% de NaCl, e incubar a 30 °C, por 24 h.

Cada uno de los cultivos previamente homogenizados colocarlos en tubos plástico de fondo cónico y centrifugar a 3900 rpm, por 10 min. Separar el sobrenadante de la pastilla.



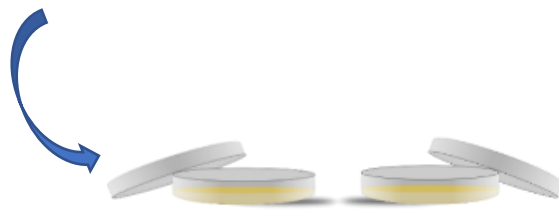
Sembrar 50 μ L del sobrenadante en pequeños pozos dentro de placas Petri con agar sangre (20 mL de medio base agar MRS + 1 mL de sangre por placa. Incubar las placas a 37 °C por 48 h, tomando lecturas cada 24 h.



Ajustar el pH del sobrenadante a 6.5 con NaOH 1 M para evitar falsos halos de lisis ocasionados por la acidez del medio



Figura N° 5. Esquema de prueba de hemólisis en sangre humana.



Los mos aislados inoculados en el medio se compararán con un control negativo, el cual consistirá en caldo MRS con 2% de NaCl.



Se tomarán sólo aquellos mos aislados bacterianos que presenten hemólisis gamma (γ)

Figura N° 5; Continuación. Esquema de prueba de hemólisis en sangre humana.

ANEXO 6.

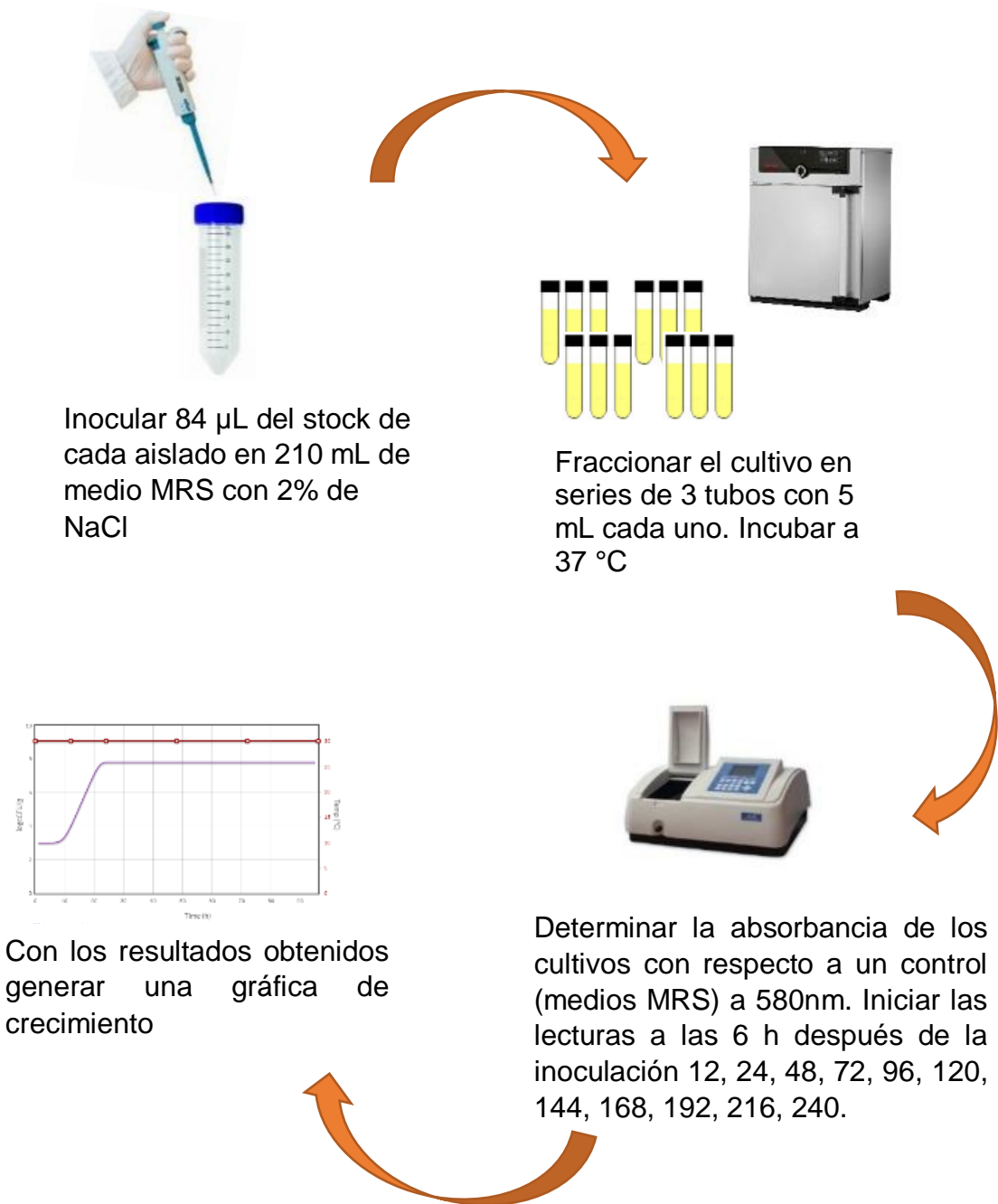


Figura N° 6. Esquema de cinética de crecimiento bacteriano de los aislados de BAL.

ANEXO 7.

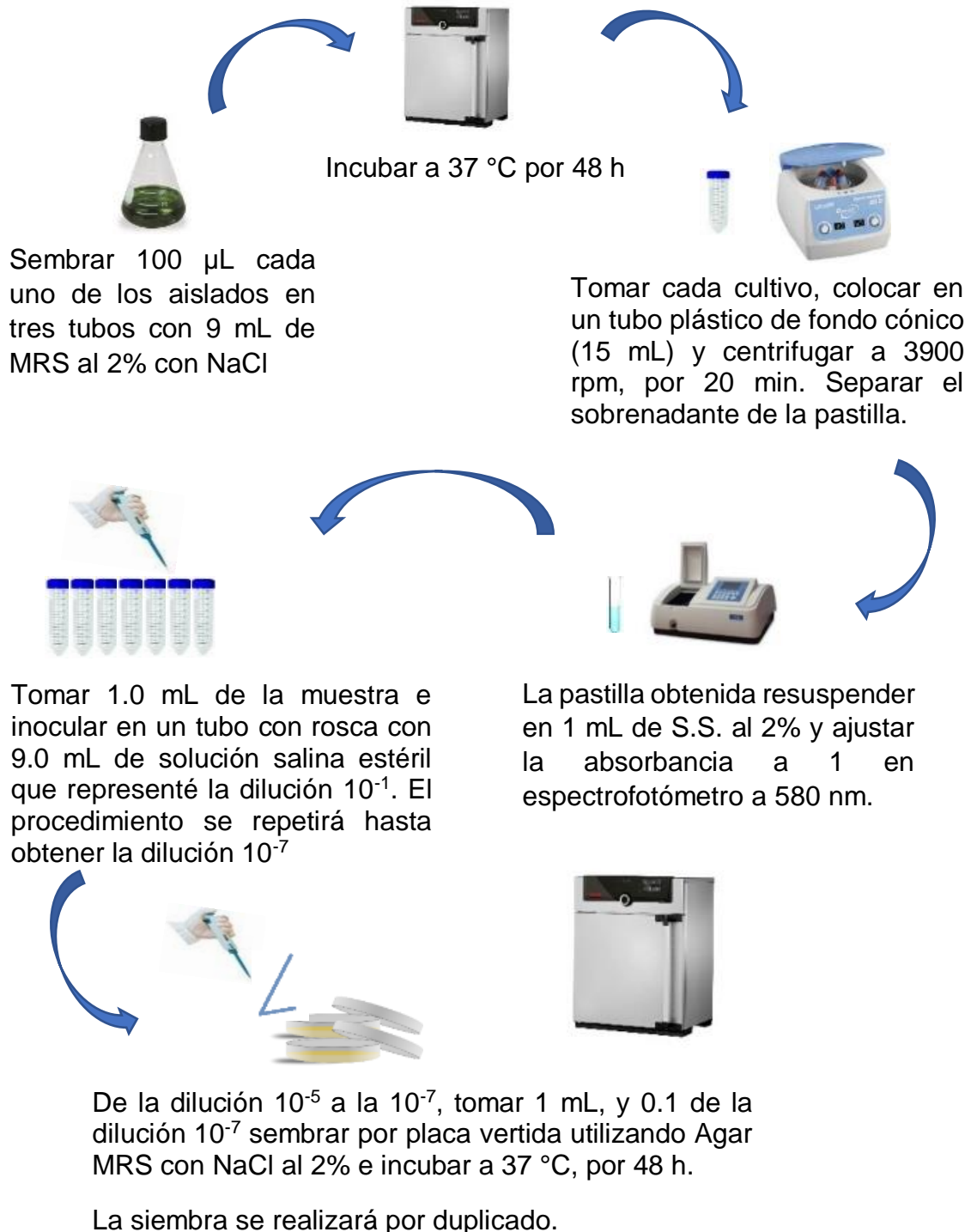


Figura N° 7. Esquema de conteo de UFC mL⁻¹ de BAL

ANEXO 8.

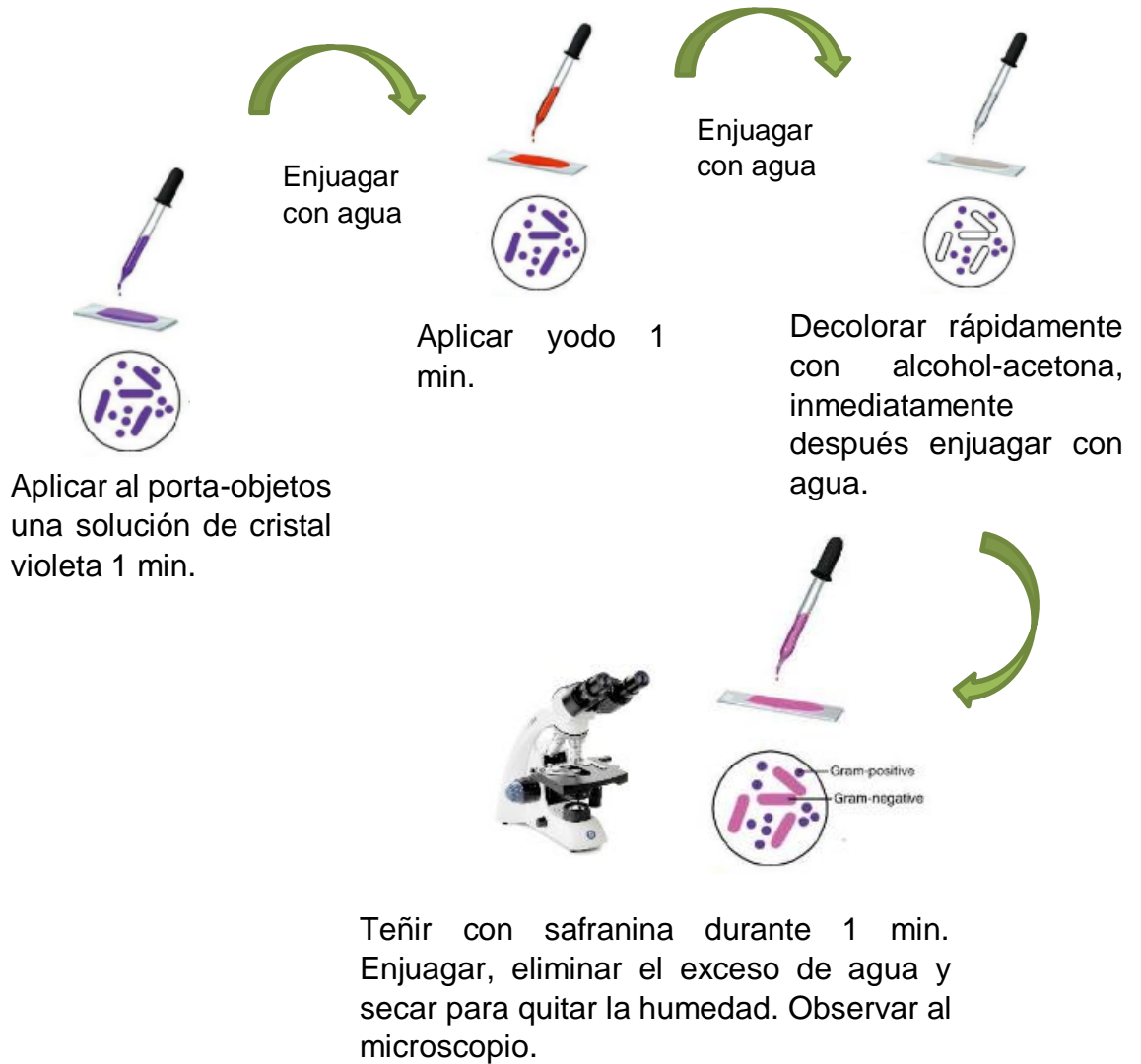


Figura N° 8. Esquema de tinción de gram, morfología microscópica, arreglo celular.

ANEXO 9.

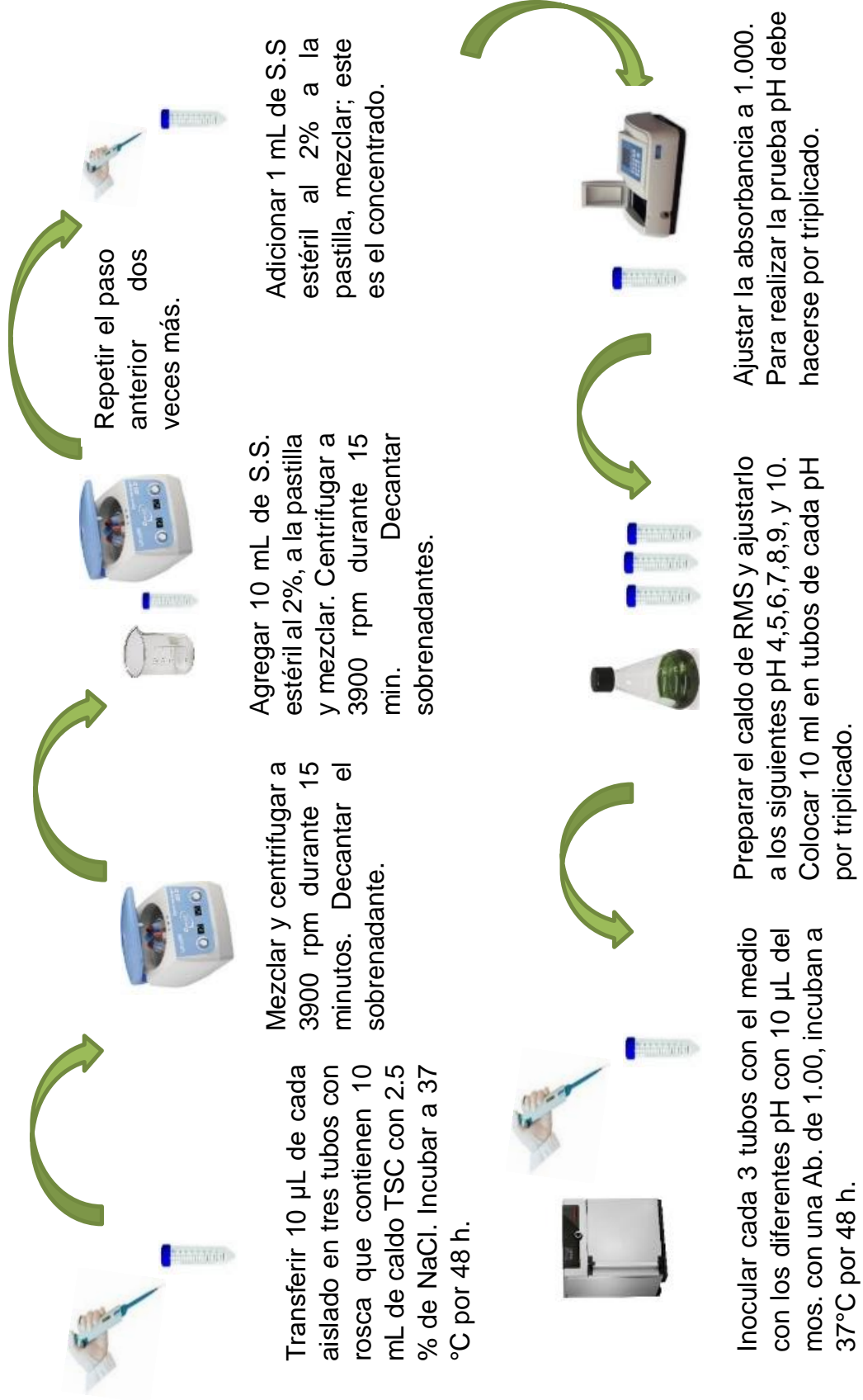


Figura N° 9. Esquema de prueba de tolerancia a pH.

ANEXO 10.

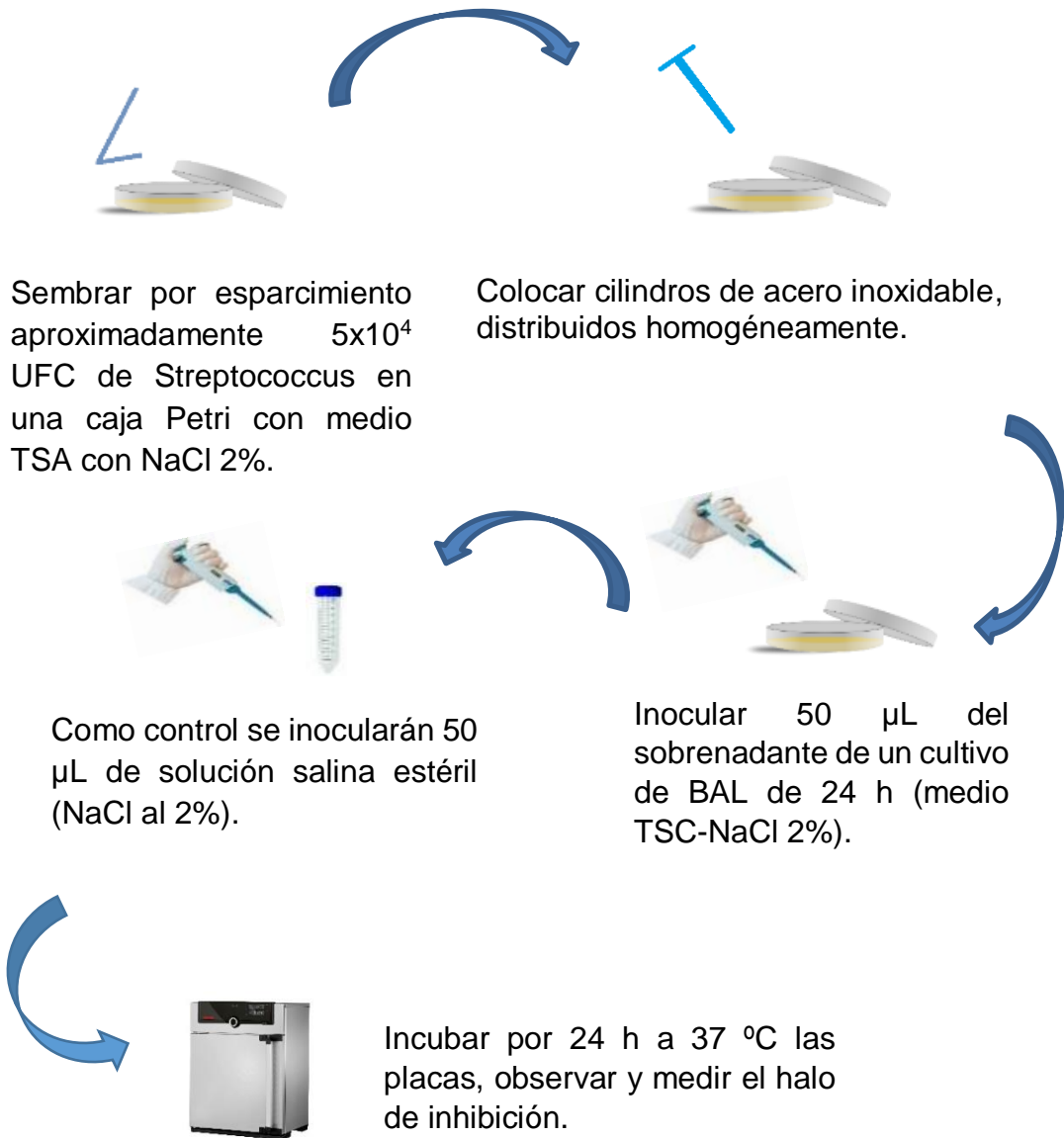


Figura N° 10. Esquema de actividad antibacteriana.

ANEXO 11.



ANEXO 12.

PRUEBA DE DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA

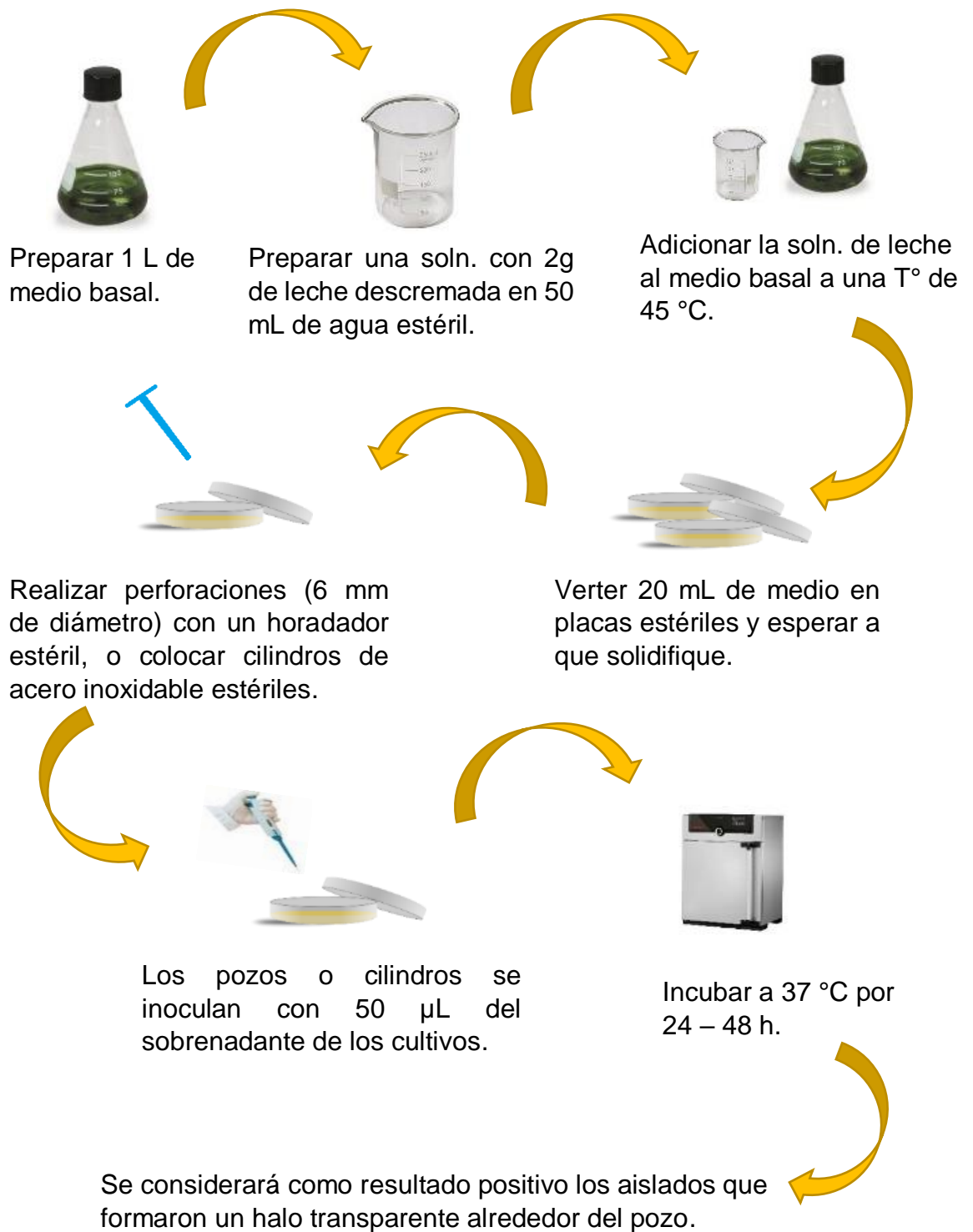


Figura N° 12. Prueba de degradación de la caseína (proteasas).



Preparar 1 L de medio basal.



Preparar una soln. con 1g de gelatina en 50 mL de agua estéril.



Adicionar la soln. de gelatina al medio basal a una T° de 45 °C.



Realizar perforaciones (6 mm de diámetro) con un horador estéril, o colocar cilindros de acero inoxidable estériles.



Verter 20 mL de medio en placas estériles y esperar a que solidifique.



Los pozos o cilindros se inoculan con 50 µL del sobrenadante de los cultivos.



Incubar a 37 °C por 24 – 48 h.

Se considerará como resultado positivo los aislados que formaron un halo transparente alrededor del pozo.

Figura N° 13. Prueba de hidrólisis de la gelatina (proteasas).

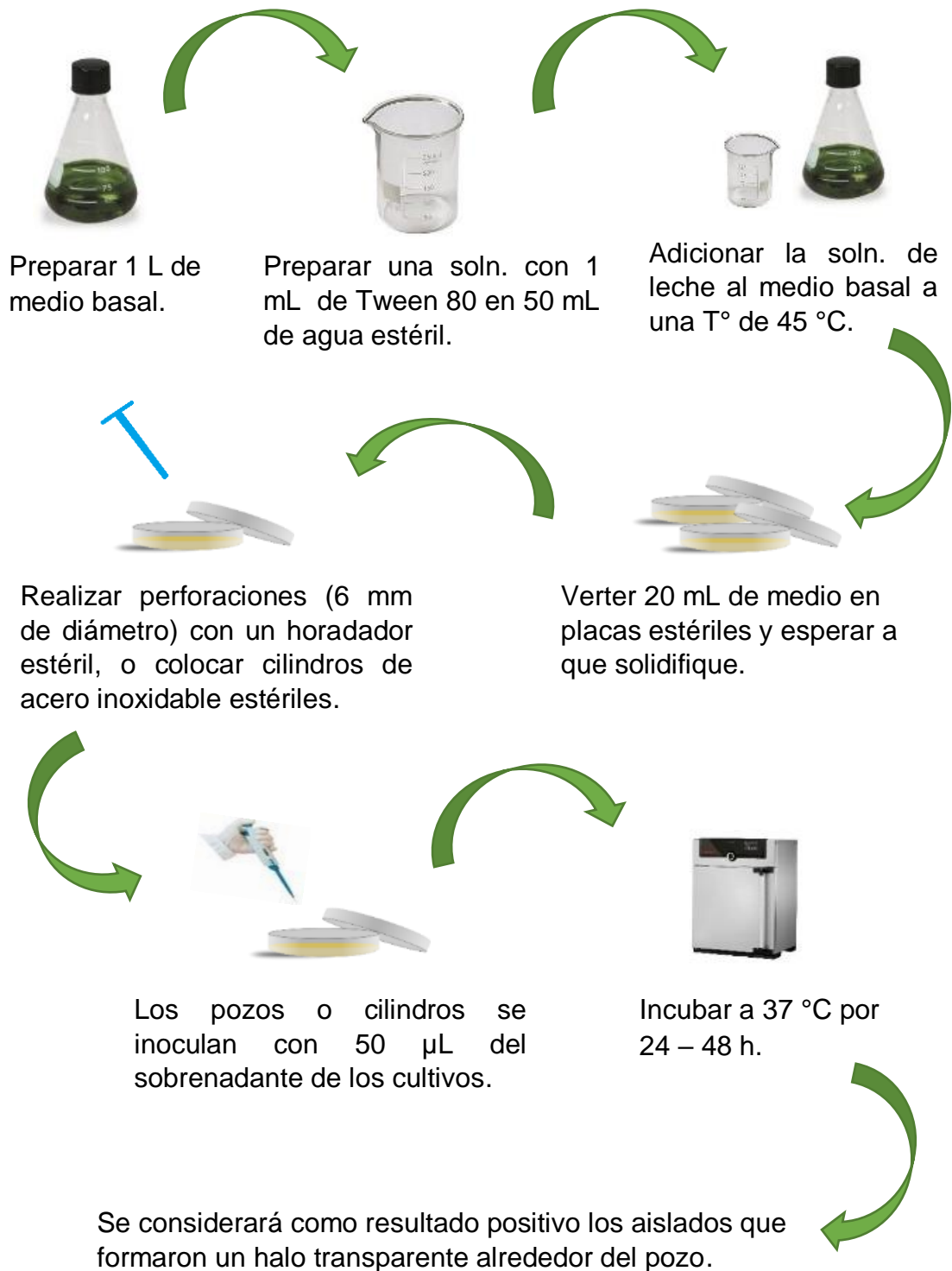


Figura N° 14. Prueba de hidrólisis de Tween 80 (lipasas).

ANEXO 13.

ADHESIÓN MICROBIANA A XILENO, TOLUENO Y CLOROFORMO.

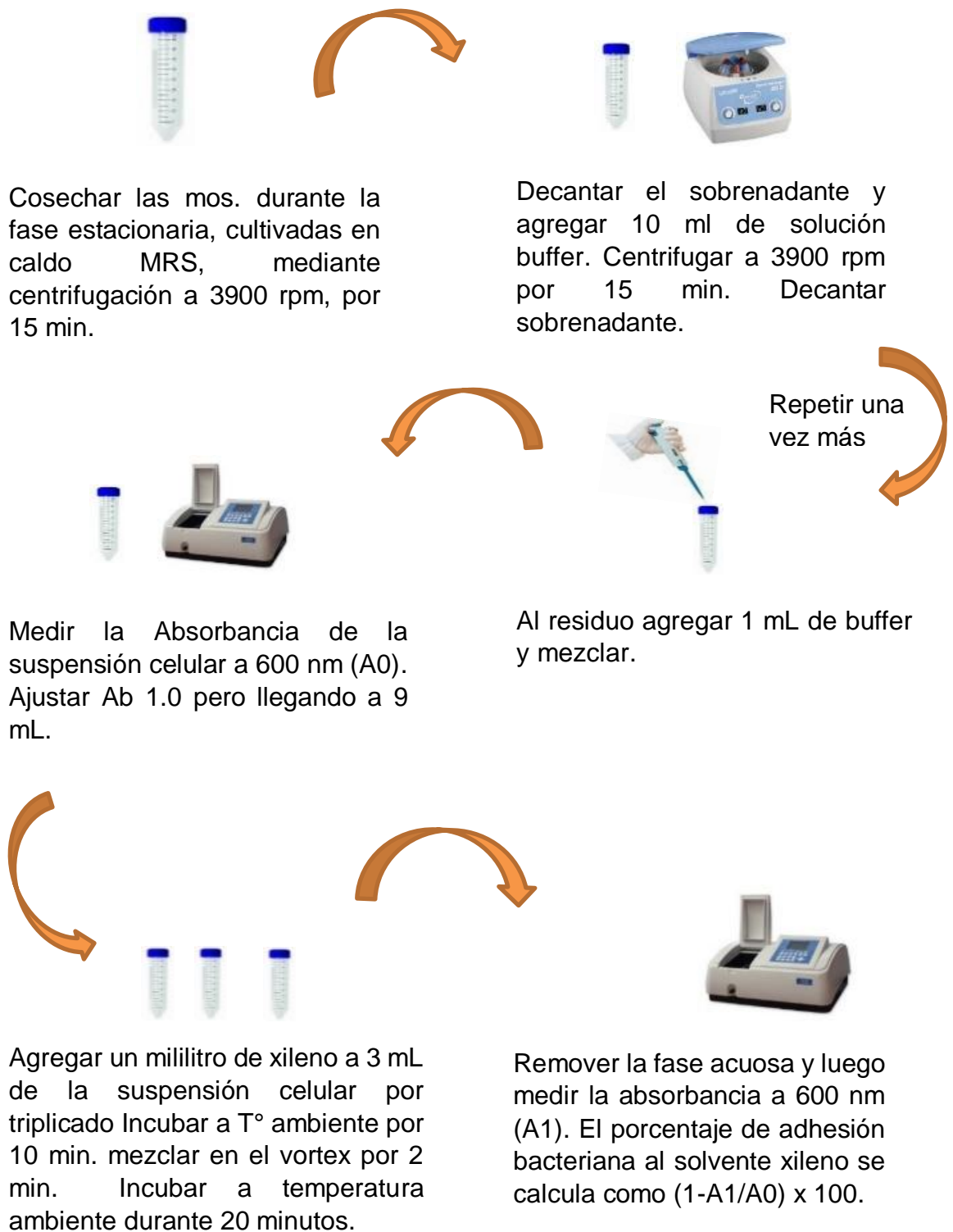


Figura N° 15 (A). Adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo.



Cosechar las mos. durante la fase estacionaria, cultivadas en caldo MRS, mediante centrifugación a 3900 rpm, por 15 min.

Decantar el sobrenadante y agregar 10 ml de solución buffer. Centrifugar a 3900 rpg por 15 min. Decantar sobrenadante.



Repetir una vez más



Medir la Absorbancia de la suspensión celular a 600 nm (A0). Ajustar Ab 1.0 pero llegando a 9 mL.

Al residuo agregar 1 mL de buffer y mezclar.



Agregar un mililitro de tolueno a 3 mL de la suspensión celular por triplicado Incubar a T° ambiente por 10 min. mezclar en el vortex por 2 min. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Remover la fase acuosa y luego medir la absorbancia a 600 nm (A1). El porcentaje de adhesión bacteriana al solvente xileno se calcula como $(1-A1/A0) \times 100$.

Figura N° 15 (B). Adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo.



Cosechar las mos. durante la fase estacionaria, cultivadas en caldo MRS, mediante centrifugación a 3900 rpm, por 15 min.

Decantar el sobrenadante y agregar 10 ml de solución buffer. Centrifugar a 3900 rpg por 15 min. Decantar sobrenadante.



Repetir una vez más



Medir la Absorbancia de la suspensión celular a 600 nm (A0). Ajustar Ab 1.0 pero llegando a 9 mL.

Al residuo agregar 1 mL de buffer y mezclar.



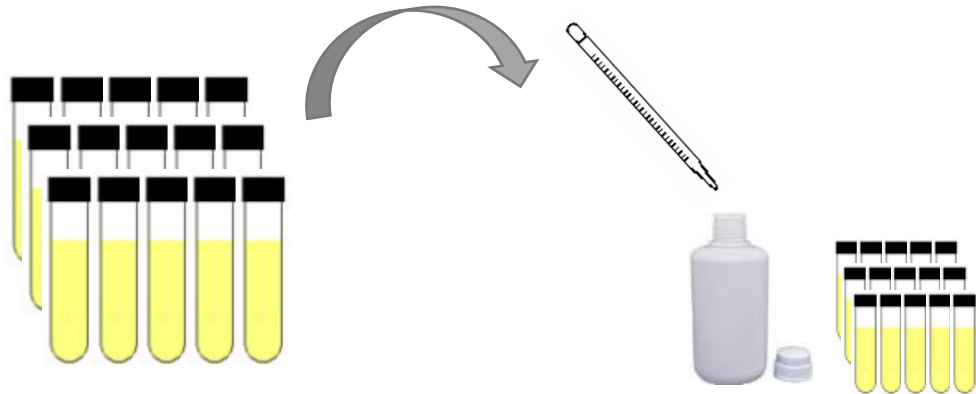
Agregar un mililitro de cloroformo a 3 mL de la suspensión celular por triplicado Incubar a T° ambiente por 10 min. mezclar en el vortex por 2 min. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Remove la fase acuosa y luego medir la absorbancia a 600 nm (A1). El porcentaje de adhesión bacteriana al solvente xileno se calcula como $(1-A1/A0) \times 100$.

Figura N° 15 (C). Adhesión microbiana a xileno, tolueno y cloroformo.

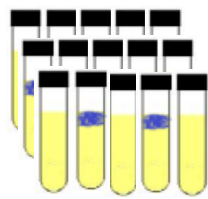
ANEXO 14.

ESQUEMA DE NÚMERO MÁS PROBABLE



Preparar 5 tubos con 10 mL de caldo Florocult LMX de concentración doble y dos series de 5 tubos con 10 mL de concentración simple.

Inocular 10 mL de Mx en los 5 tubos con caldo de concentración doble, 1 mL en los tubos con caldo de concentración simple y 0.1 mL en los otros 5 tubos con caldo de concentración simple.

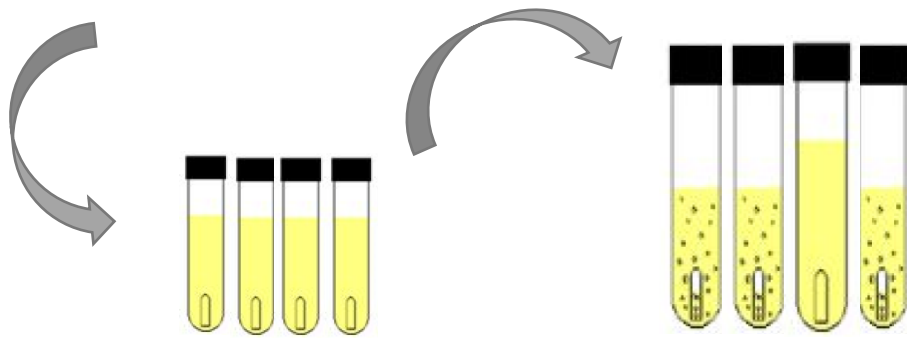


Los tubos positivos (con coloración azul), indican presencia de coliformes totales; observar en luz UV y realizar prueba de indol.



Incubar los tubos por 24 a 48 horas a 35 °C.

Figura N° 16. Esquema de número más probable (NMP)



De los tubos positivos pasar a cado EC e incubar a 44.5 °C por 24 horas.

La presencia de gas en las campanas de Durham indica prueba positiva para coliformes fecales.

Figura N° 16; Continuación. Esquema de número más probable (NMP).

ANEXO 15.

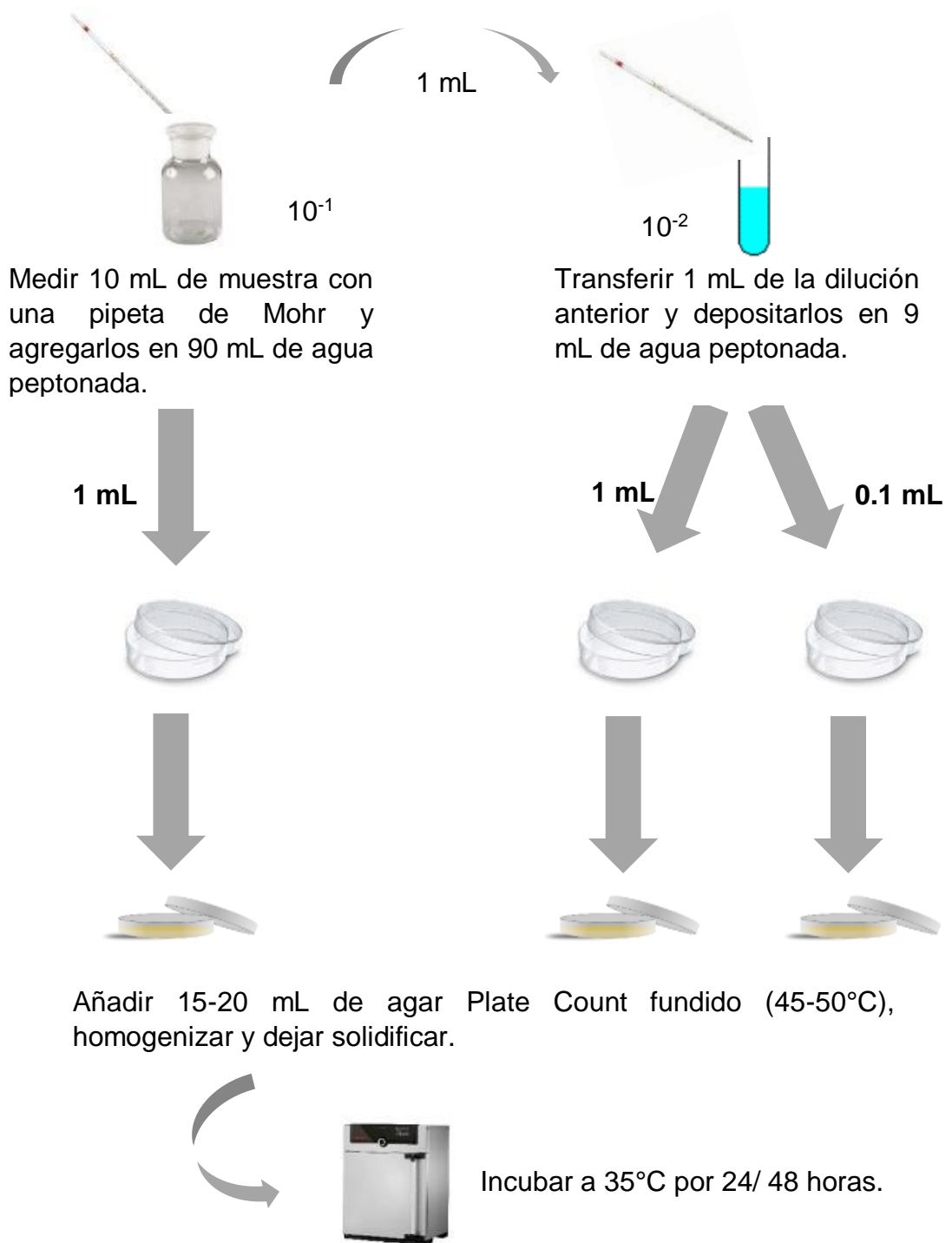


Figura N° 17. Esquema de recuento en placa.

ANEXO 16.



Inocular 90 mL de Caldo Tripticasa Soya (CASOY) con 10 mL de la muestra de agua, incubar de 35 – 37 °C por 24 horas.

Tomar una asada y estriar en placas de Agar Granada por duplicado, incubar de 35 – 37 °C por 24 horas.



De las colonias típicas de cada placa tomar con asa y estriar en Agar Sangre, incubar de 35 – 37 °C por 24 horas

De las colonias típicas de cada placa tomar con asa y estriar en Agar Sangre, incubar de 35 – 37 °C por 24 horas.



Tomar sólo aquellos mos aislados que presenten halo al rededor en los medios y realizar una segunda prueba para corroborar resultados.

Figura N° 18. Esquema de determinación de *Streptococcus* en agua.

ANEXO 17.



Figura Nº 19. Recolección de tilapias en proyecto “Bedalton” lago de Ilopango.

ANEXO 18.

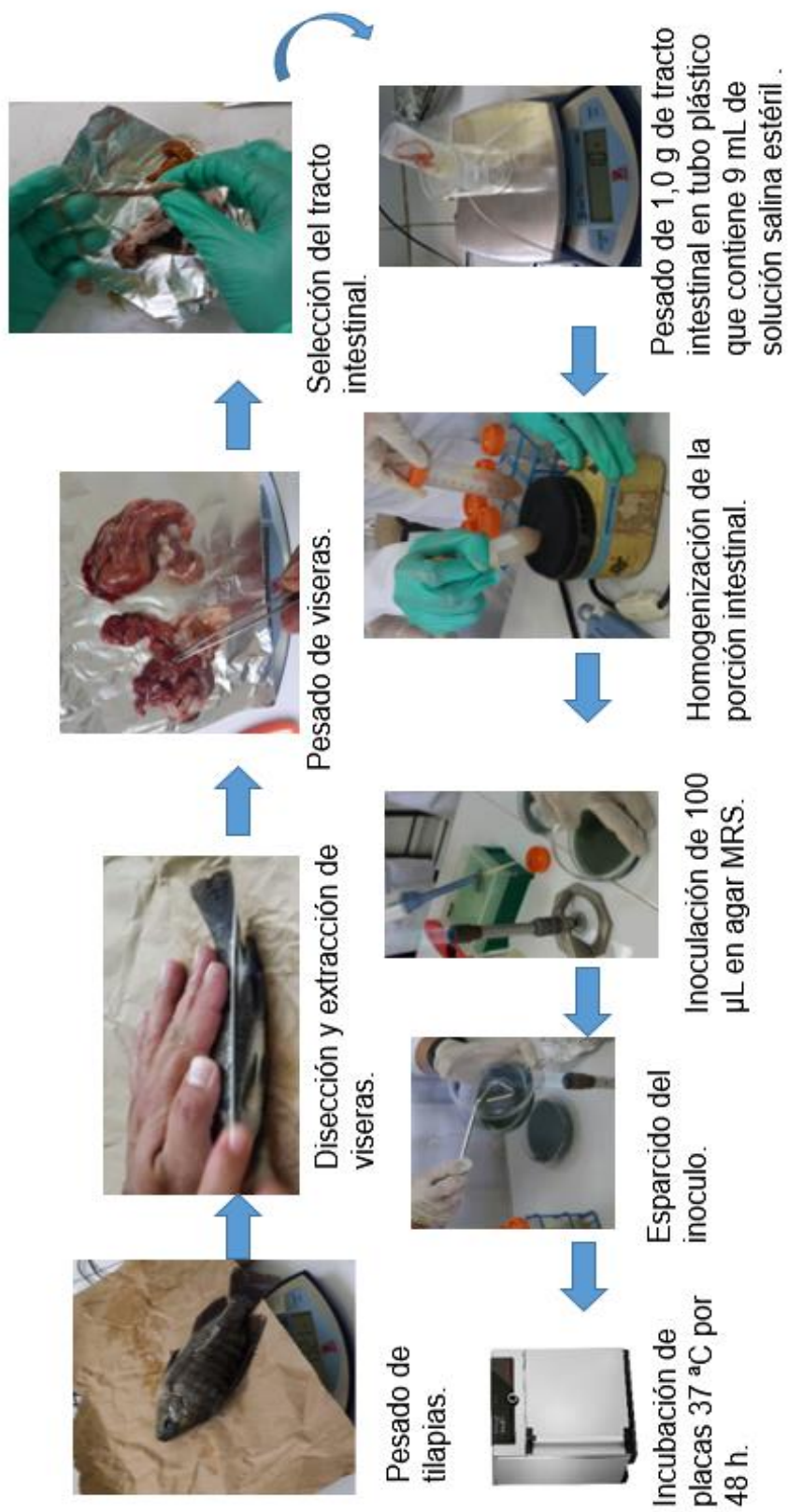


Figura N° 20. Toma de pesos de muestras de tilapia, posterior extracción de visceras e inoculación en medio MRS.

ANEXO 19.

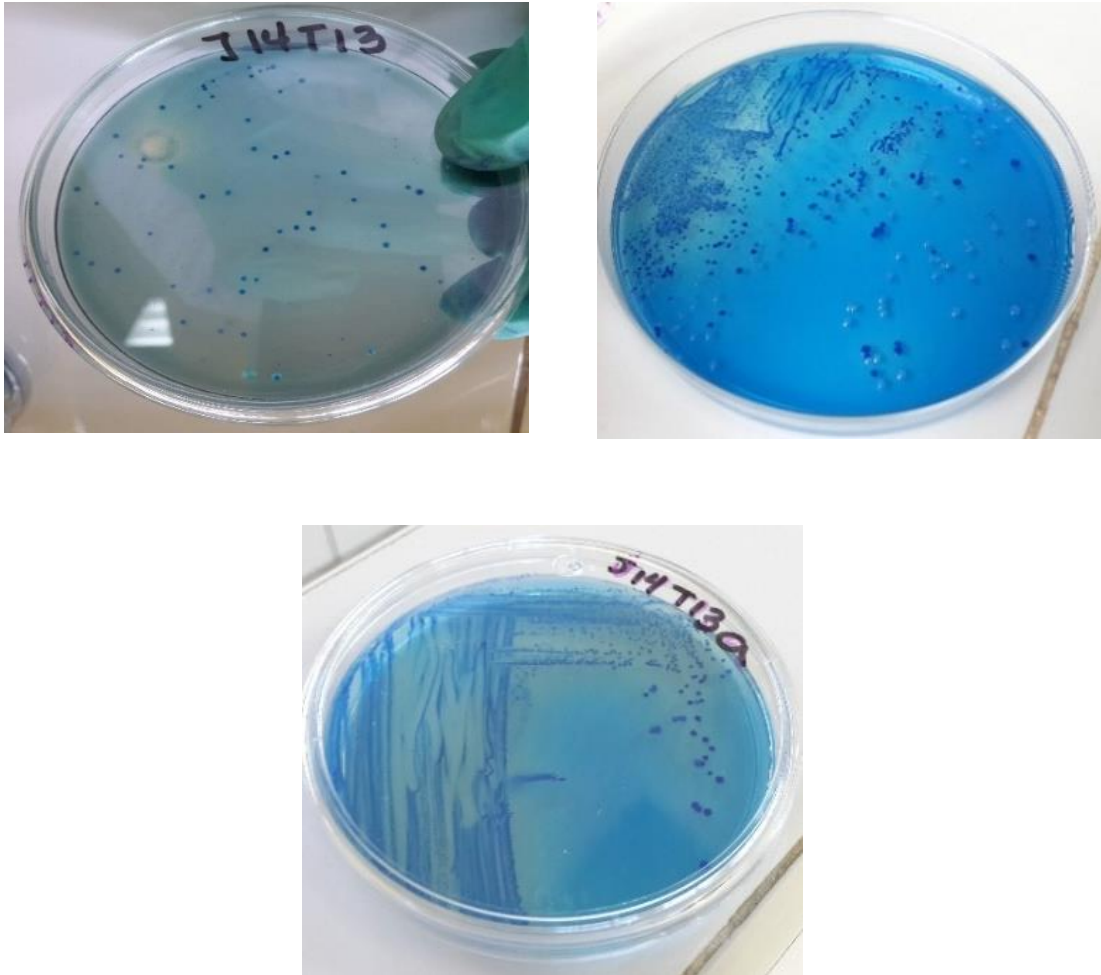


Figura N° 21. Colonias características de Lactobacillus en agar MRS.

ANEXO 20.

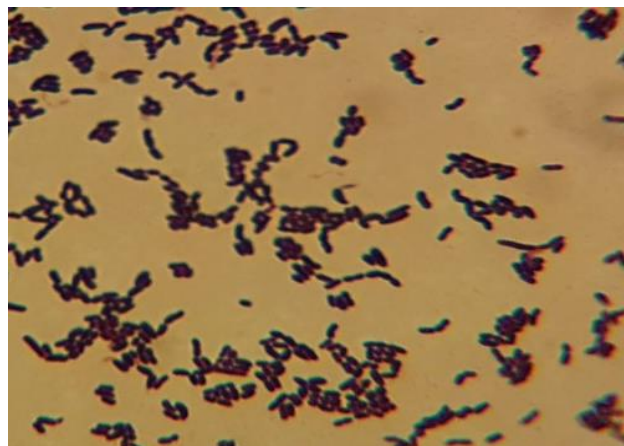
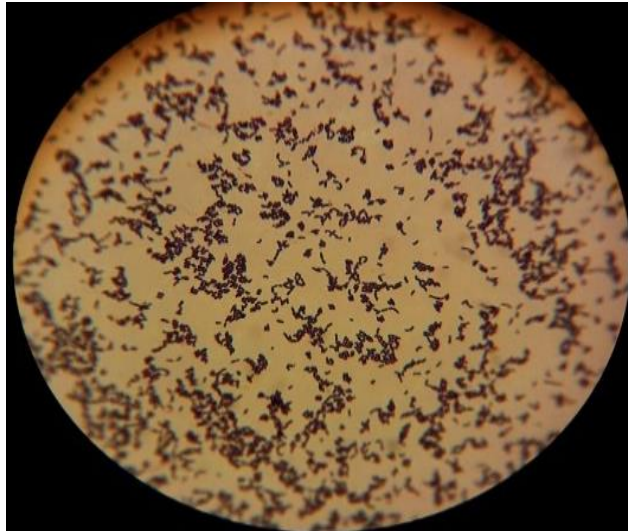


Figura N°22. Tinción de Gram, morfología y arreglo celular.

ANEXO 21.

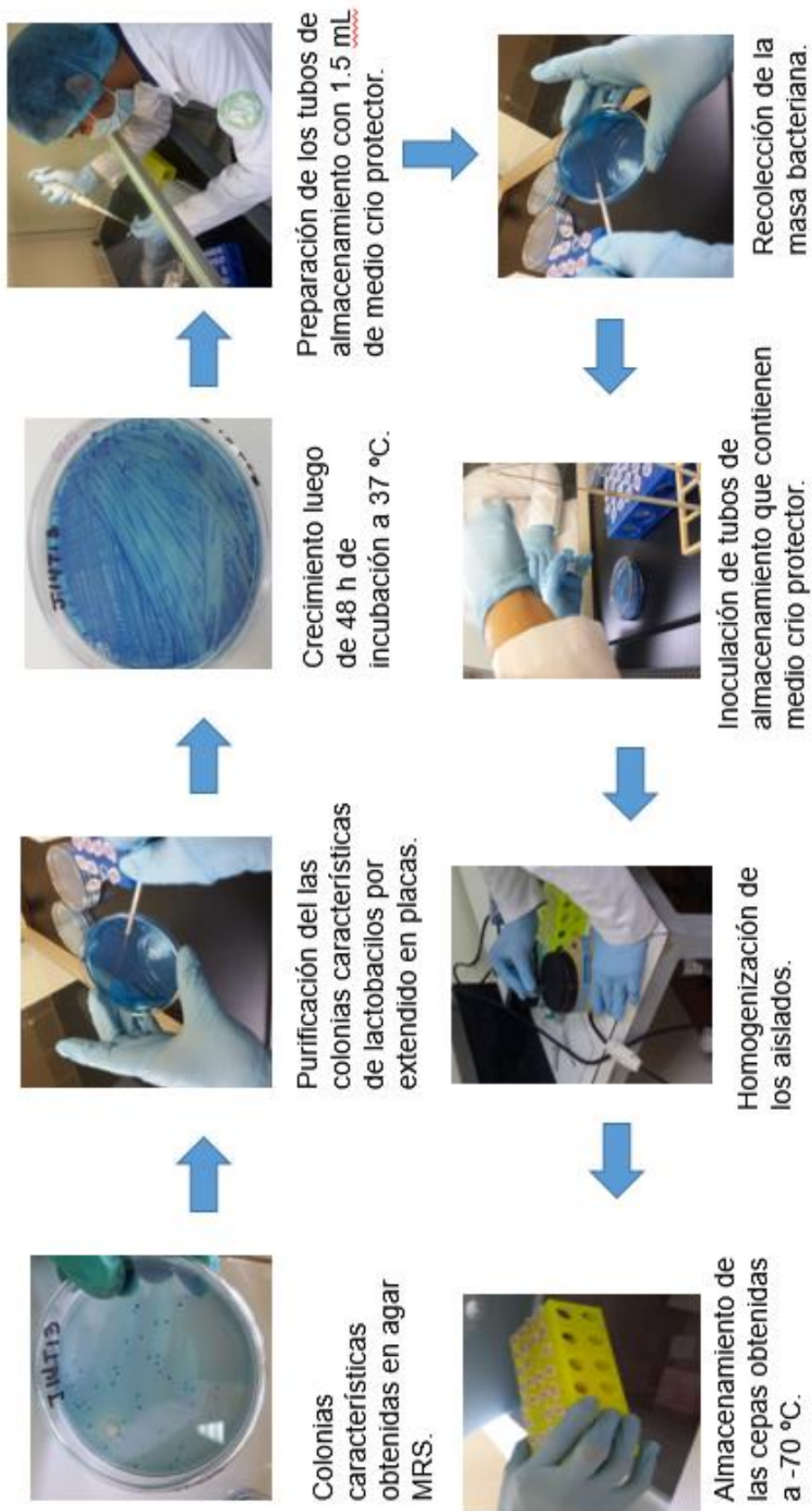


Figura N° 23. Cosecha de bacterias acidolacticas.

ANEXO 22.

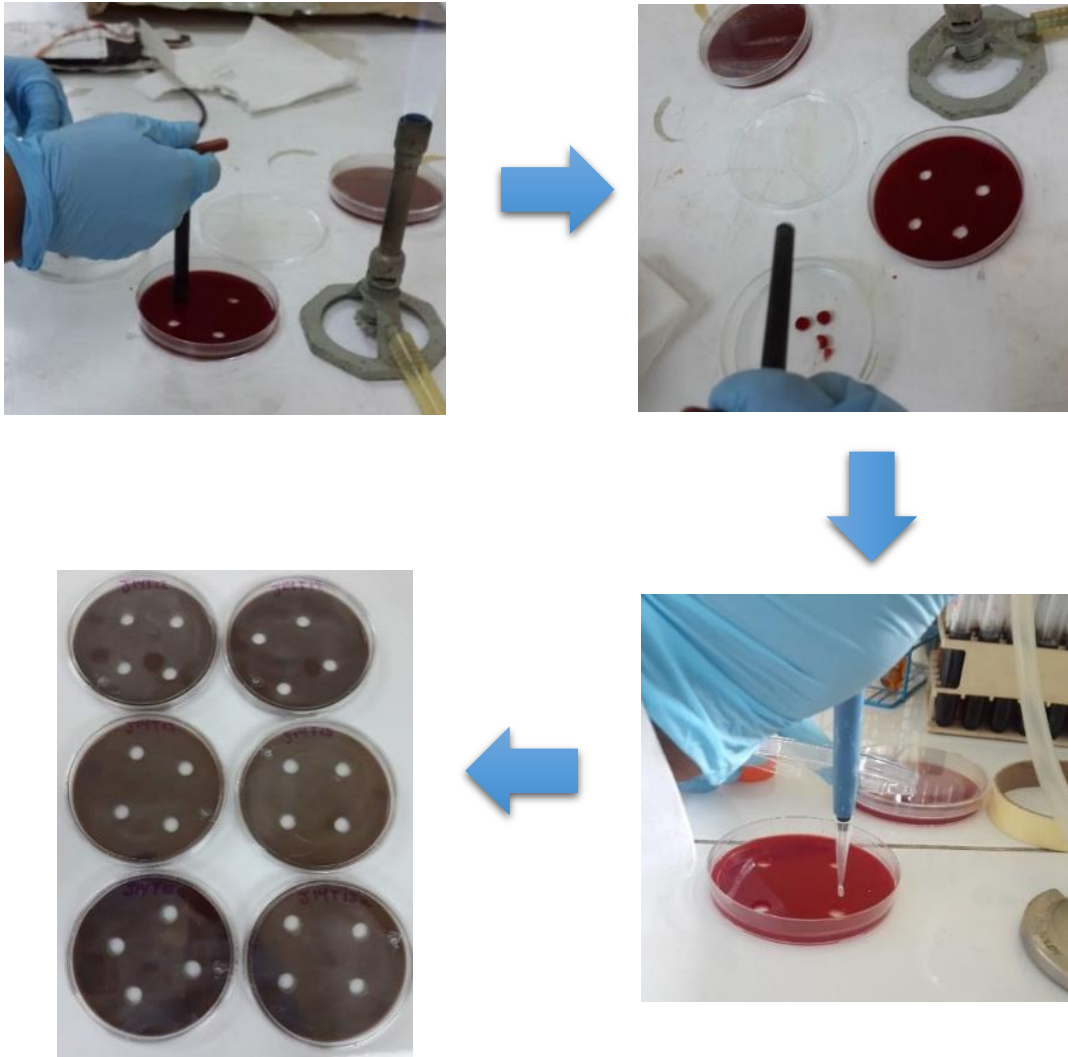


Figura N° 24. Proceso realizado en la prueba de hemólisis.

ANEXO 23.

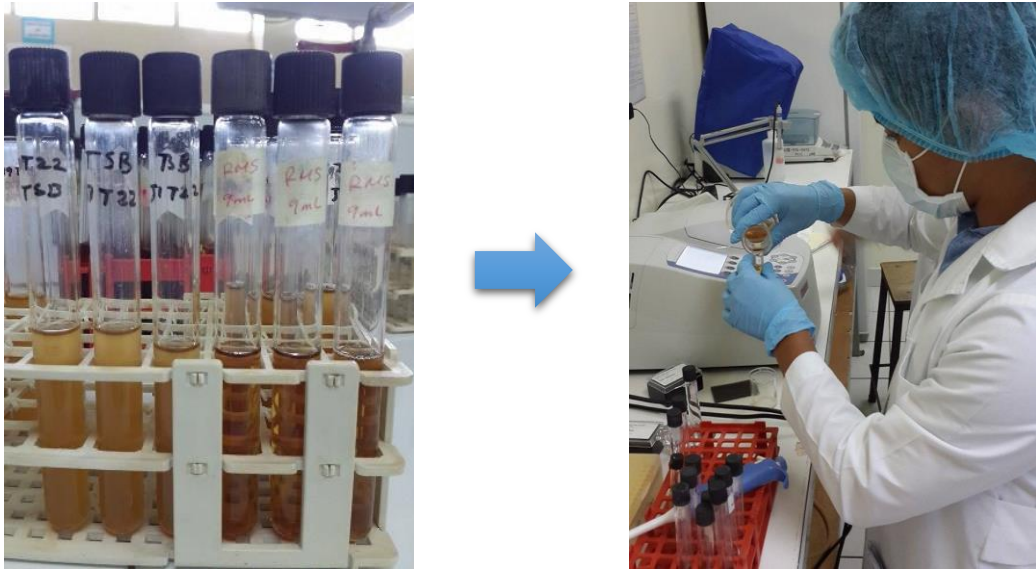


Figura N° 25. Proceso realizado en la prueba de cinética de crecimiento.

ANEXO 24.

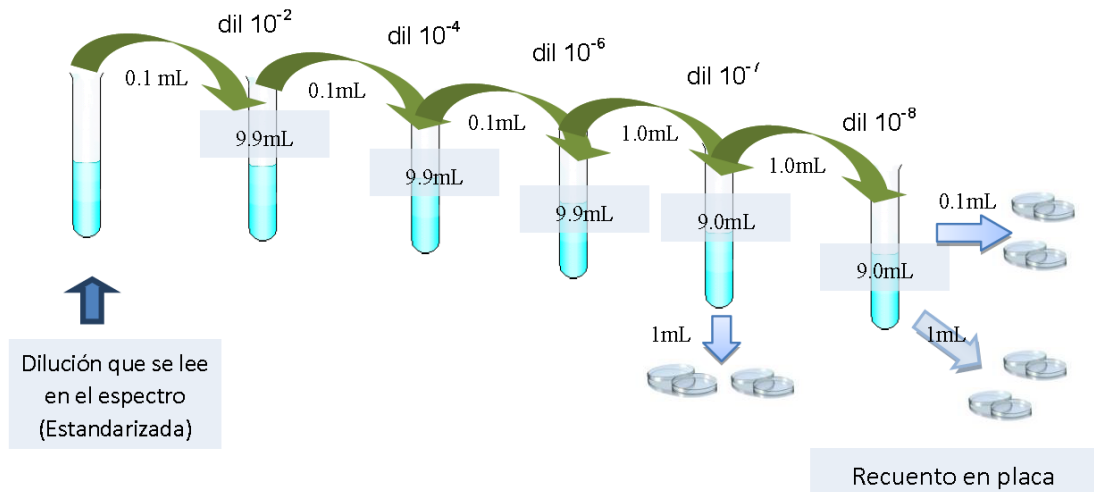


Figura N° 26. Esquema de diluciones utilizado para determinar la cantidad de UFC en una suspensión de microorganismo estandarizada.

ANEXO 25.

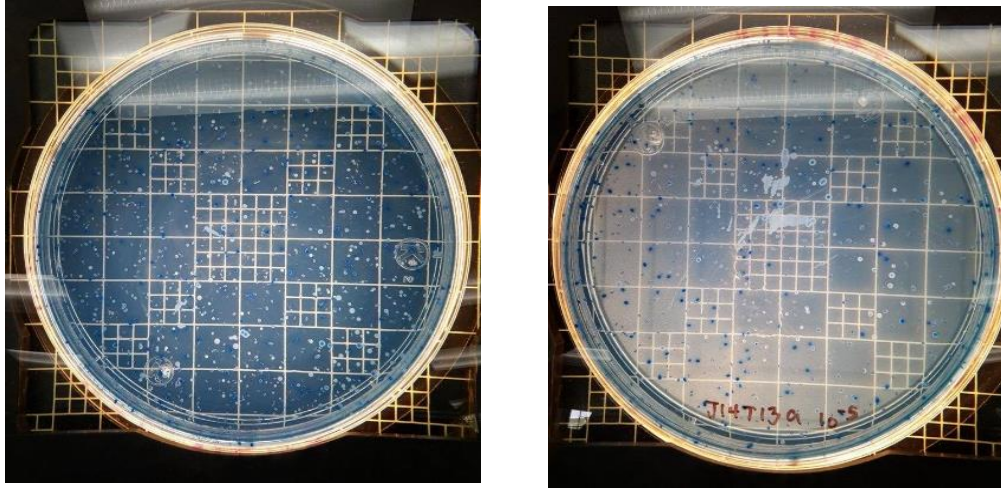


Figura N° 27. Resultados del conteo bacteriano.

ANEXO 26.

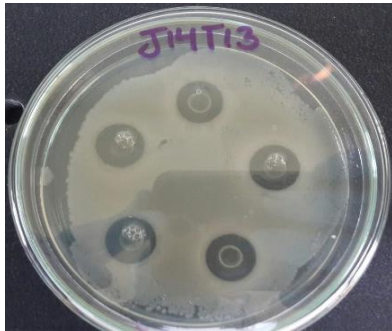


Figura N° 28. Proceso realizado en prueba de actividad antibacteriana

ANEXO 27.

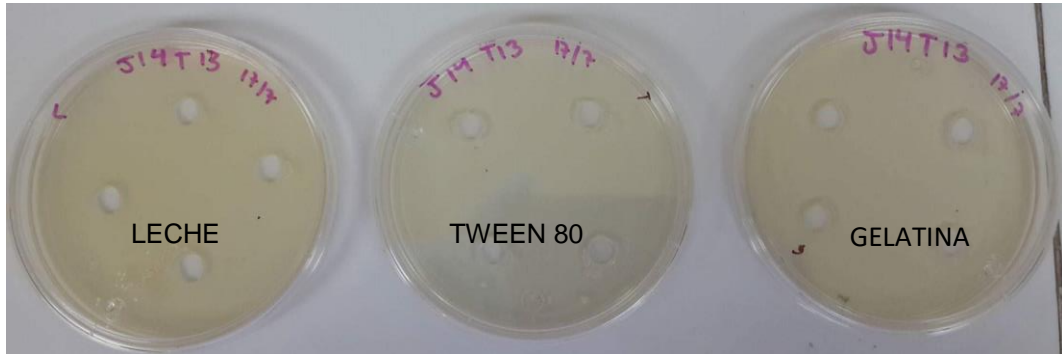


Figura N° 29. Resultados obtenidos en prueba de actividad enzimática extracelular.

ANEXO 28.

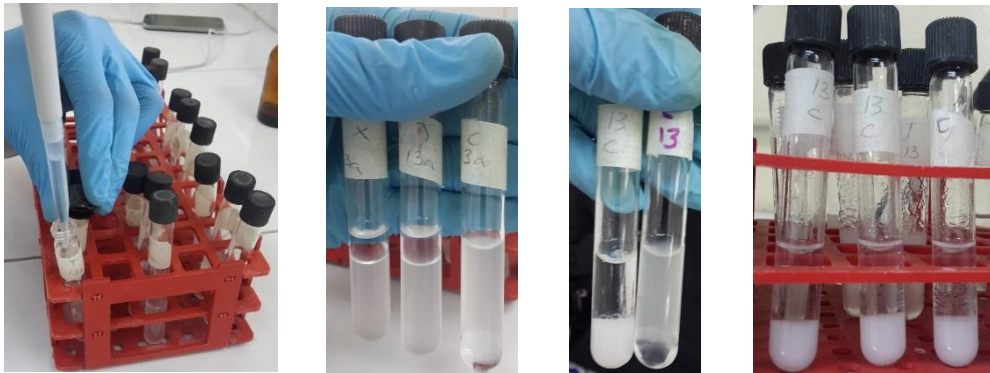


Figura N° 30. Resultados de prueba adhesión a Xileno, tolueno y cloroformo.

ANEXO 29.

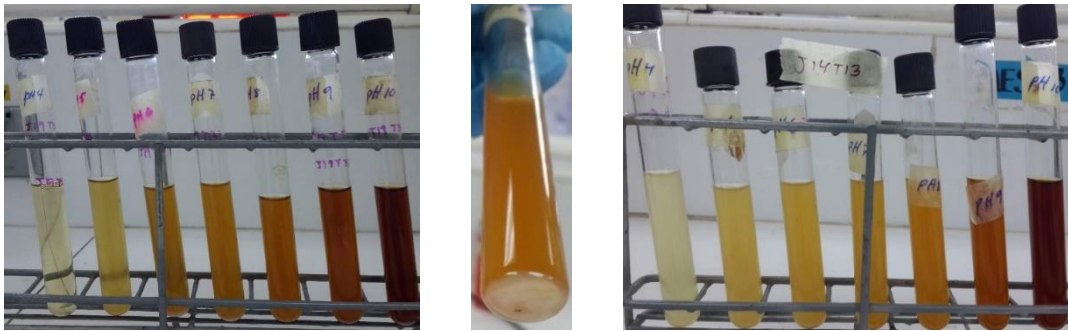


Figura N° 31. Resultado de prueba de tolerancia a pH.

ANEXO 30.

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS POR EL SISTEMA
API**

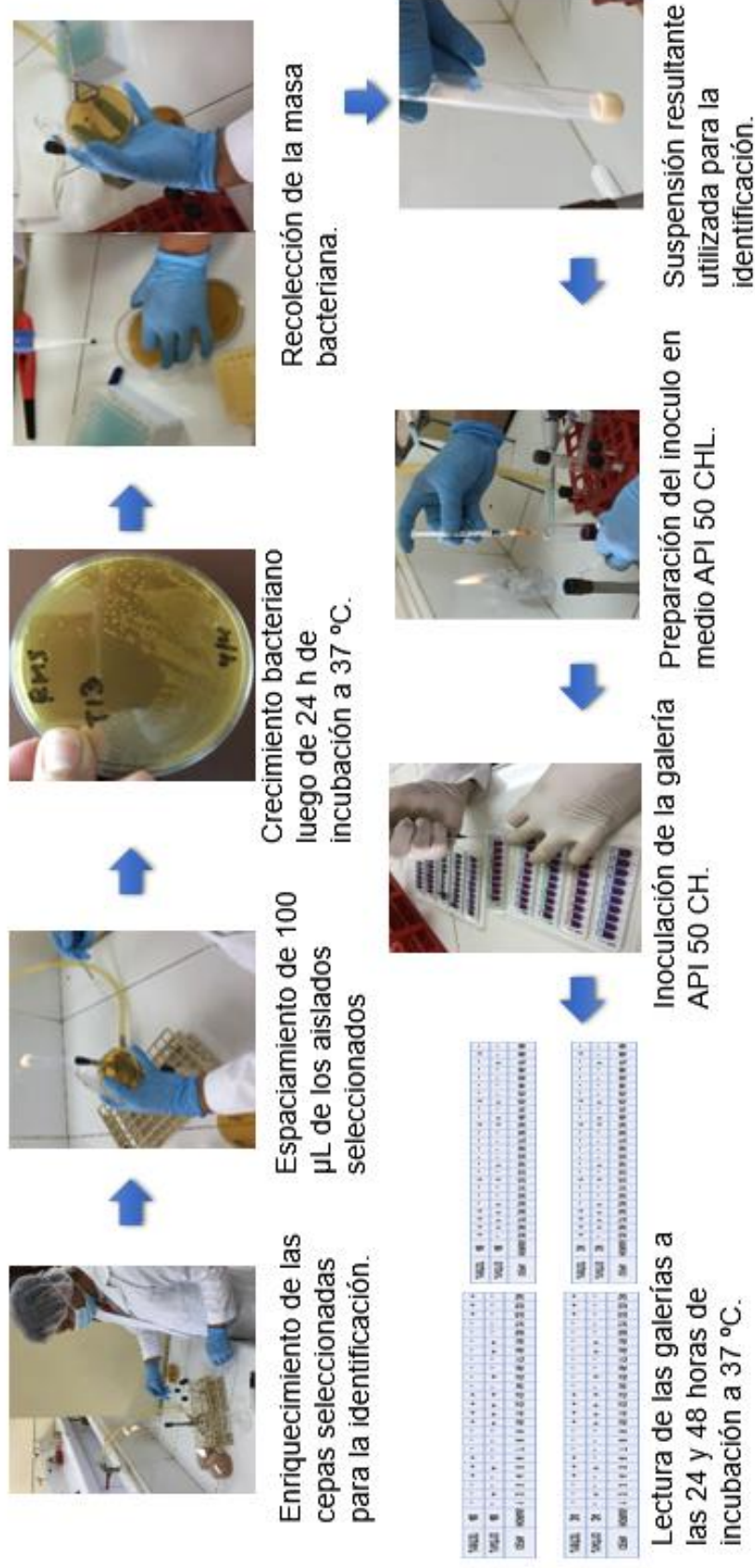


Figura N° 32: Identificación de bacterias acidolácticas por el sistema API.

ANEXO 31

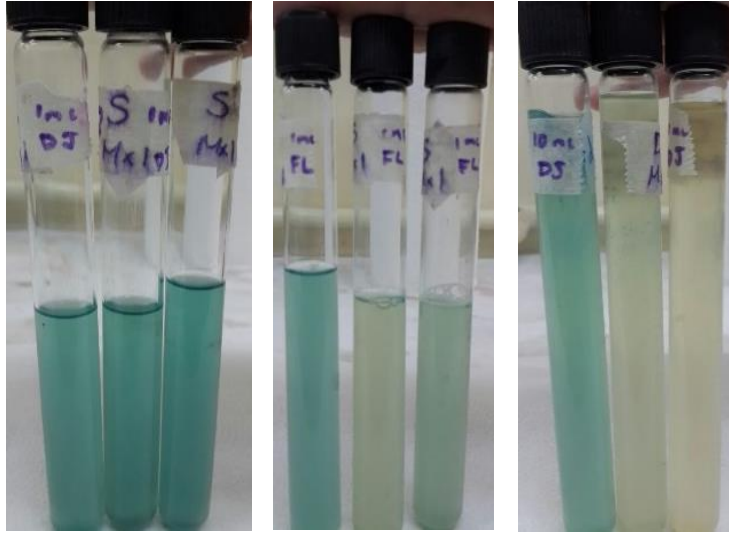


Figura N° 33. Resultados del Numero Más Probable de las muestras de agua.

ANEXO 32.



Figura N° 34. Pruebas confirmativas para determinar la presencia de E.coli.

ANEXO 33.

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION CON EL SISTEMA API.

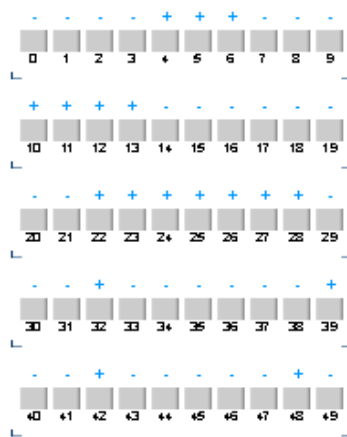
24/4/2018

San Salvador

apiweb™- Resultado de identificación



API 50 CHLV5.2



REFERENCIA: J19T37
 FECHA: 18/04/18

COMENTARIO: Cepa aislada del tracto gastrointestinal de *Oreochromis niloticus* (Tilapia).

EXCELENTE IDENTIFICACION

Galería: API 50 CHLV5.2
 Perfil: -----+++++-----+++++-----+-----+-----+
 Nota:

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	99.9	0.75	2 KG 1%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	0.1	0.68	SAC 81% TAG 14% GNT 8.5% 2 KG 20%

[Cerrar](#)

[Imprimir](#)

Figura N° 35. Resultados de la identificación con el sistema API de la cepa J19T37.

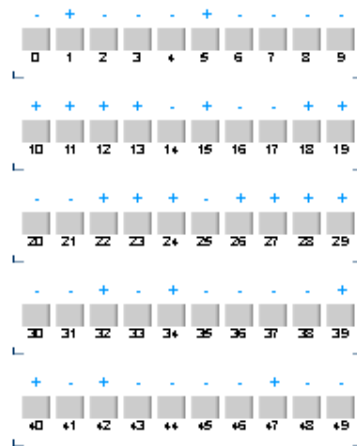
24/4/2018

San Salvador

apiweb™- Resultado de identificación



API 50 CHL V5.2



REFERENCIA J14T13 FECHA 18/04/18

COMENTARIO Cepa aislada del tracto gastrointestinal de Oecocormis niloticus (Tlapé).

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galería API 50 CHL V5.2 Perfil Nota

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Lactobacillus rhamnosus	99.6	0.7	S EE 92% MDG 85% ESC 85%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Lactobacillus paracasei sup paracasei 1	0.3	0.46	G LY 20% RHA 1% ESC 99% SAC 99%

Cerrar

Imprimir

Figura N° 36. Resultados de la identificación con el sistema API de la cepa J14T13.