

Effect of probiotic microorganisms isolated from *Hypostomus plecostomus* in *Oreochromis sp* juveniles

Efecto de microorganismos probióticos aislados de *Hypostomus plecostomus* en juveniles de *Oreochromis sp*

Yuri Vela-Gutiérrez¹ Ing Pec, Mayra Contreras-Rojas^{1*} M.Sc, Lady Suarez-Suarez¹ Ph.D.

¹Universidad Francisco de Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente, Avenida Gran Colombia No. 12E-96 Barrio Colsag. San José de Cúcuta, Colombia. *Correspondencia: mayracontreras@ufps.edu.co.

Received: November 2015; Accepted: August 2016.

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to assess the behavior of red tilapia juveniles (*Oreochromis sp.*) in presence of the possible probiotic microorganisms isolated from the gastrointestinal tract of *panche* fish (*Hypostomus plecostomus*). **Materials and methods.** During the phase of assessment of probiotics, 120 red tilapia (*Oreochromis sp*) juveniles were selected, with average weight of 1.28 ± 0.22 g and average length of 2.99 ± 0.27 cm. Three experimental treatments were formulated taking into account the nourishment needs of red tilapia (*Oreochromis sp.*). The statistical method employed was a completely random design. **Results.** The three strains of *Lactobacillus* genus (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*) isolated from the digestive tract of *H. plecostomus*, yielded diverse results in the biometrical variables considered, as well as in the SGR, PER, AE, AC. **Conclusions.** The best reports regarding the gain in length were for the treatment with native probiotics, and it is deduced that they were easily settled in the intestines of the fish (*Oreochromis sp.*). It is also determined that there are significant differences in the results or gain in length for the Control Concentrate feed (CC) against Concentrate feed plus Native Probiotic (CNP) for red tilapia (*Oreochromis sp.*) in the juvenile stag for a 30 day time span.

Keywords: Concentrate feed, Intestine, *Lactobacillus*, Loricariidae, Tilapia. (Source: AGROVOC)

RESUMEN

Objetivo. El objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) frente a los posibles microorganismos probióticos aislados del tracto gastrointestinal del pez panche (*Hypostomus plecostomus*). **Materiales y métodos.** En la fase de evaluación del probiótico, se seleccionaron 120 juveniles de Tilapia roja (*Oreochromis sp*) con un peso promedio de 1.28 ± 0.22 g y una longitud promedio de 2.99 ± 0.27 cm. Se formularon tres tratamientos experimentales teniendo en cuenta las necesidades nutricionales de la tilapia roja (*Oreochromis sp.*). El modelo estadístico que se empleó fue un diseño completamente al azar. **Resultados.** Las tres cepas del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*) aisladas del tracto digestivo del *H. plecostomus*, dieron resultados diversos en las variables biométricas consideradas, así como

en la TCE, TEP, EA y CA. **Conclusiones.** Los mejores reportes en cuanto a ganancia en longitud fueron para el tratamiento con el probiótico nativo y se deduce que se establecieron con facilidad en el intestino del pez (*Oreochromis* sp.) se determinó que si existen diferencias significativas en los resultados de ganancia de longitud, para Concentrado Control (CC) vs., Concentrado más Probiótico Nativo (CPN) para Tilapia roja (*Oreochromis* sp.) en la etapa de juveniles por un período de 30 días.

Palabras Clave: Alimento concentrado, intestinos, Lactobacillus, Loricariidae, tilapia. (Fuente: AGROVOC)

INTRODUCCIÓN

The fish (*Hypostomus plecostomus*), commonly known as "Panche" dwells in shallow freshwaters, and it is part of the indigenous fauna of fish in the department of Norte de Santander and the country. It belongs to the most important catfish family (*Loricariidae* family) in Colombia regarding the amount of known forms. They are vegetarian or detritophage due to the size of their intestines and their buccal adaptations which are especially designed for the suction of phytoplankton, detritus and small crustaceans, which they mainly obtain from the surface of rocks and submerged plants. They are monogastric fish and the micro flora present in their digestive system is unknown, since up to date there is not a written record which demonstrates the different microbial species existent in the gastrointestinal tract of these animal species.

In the last few years there have been significant advances regarding the production of a wide range of aquatic organisms. One of the most successful freshwater species in aquaculture is tilapia (*Oreochromis* sp). These species, at commercial standards, are grown in intensive and semi intensive systems, where the nourishment requirements are met through complete artificial diets. Because of the growth conditions, such as high sowing density and limited amount of water, the organisms are subjected to a constant stress that is translated to low growth rates and alimentary efficiency, as well as the presence of opportunistic disease. In order to avoid these problems, studies have been directed to identify new additions such as the microorganisms called probiotics, which represent an option in order to improve the health and growth of the organisms, resulting on a greater production. The knowledge of the use of probiotics can substitute of antibiotic therapy as a less aggressive method, and it has resulted in a new vision in livestock industry, when considering a global technology from the isolation of probiotics of specific ecosystems, for instance the microbial flora indigenous to the species or geographic region of interest, the selection and characterization of the bacteria responsible of the probiotic action, their industrial production, process and reintroduction to the diet of the animal.

INTRODUCCIÓN

El pez (*Hypostomus plecostomus*), conocido comúnmente como "Panche" habita frecuentemente en aguas dulces poco profundas, formando parte de la fauna autóctona de los peces del departamento Norte de Santander y del país; pertenece a la familia de bagres (familia Loricariidae) más importante de Colombia en cuanto al número de formas conocidas. Son vegetarianos o detritívoros, debido al tamaño de su intestino y sus adaptaciones bucales que están diseñadas especialmente para la succión de fitoplancton, detritus y pequeños crustáceos, que principalmente obtienen de la superficie de rocas y plantas sumergidas. Son peces monogástricos, la microflora existente en el sistema digestivo es desconocida, pues hasta la fecha no existe un registro escrito que evidencie las diferentes especies microbianas existentes en el tracto gastrointestinal de esta especie animal.

En los últimos años se han presentado adelantos significativos en cuanto a la producción de una amplia variedad de organismos acuáticos. Una de las especies dulceacuícolas más exitosa en acuicultura es la tilapia (*Oreochromis* sp). Esta especie, a nivel comercial, se cultiva en sistemas intensivos y semiintensivos, donde los requerimientos nutricionales son satisfechos mediante dietas artificiales completas. Debido a las condiciones de cultivo, como son altas densidades de siembra y limitada calidad del agua, los organismos se encuentran sujetos a un estrés constante que se traduce en bajas tasas de crecimiento y baja eficiencia alimenticia, así como presencia de enfermedades oportunistas. Para evitar estos problemas los estudios se han dirigido a identificar nuevos aditivos como lo son los microorganismos a los que se les ha llamado probióticos, los cuales presentan una opción para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos, dando por resultado una mayor producción. El conocimiento del uso de los probióticos puede sustituir la terapia con antibióticos al ser un método menos agresivo, ha dado como resultado una nueva visión en la industria pecuaria, al contemplar una tecnología global desde el aislamiento del probiótico de ecosistemas específicos, como la flora microbiana autóctona de la especie de interés o región geográfica, selección y caracterización de

The use of probiotic in feeds to improve growth of different fish species including African catfish (*Clarias gariepinus*) (1); Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (2); Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (3, 4); Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (5); gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (6) has been investigated. The effects of probiotics have been linked to modulation of gut microbiota and establishment of the beneficial microorganisms, higher specific and total digestive enzyme activities, in the brush border membrane, which increases the nutrient digestibility and feed utilization (7, 8).

The isolation and characterization of probiotic microorganisms can constitute an alternative for aquaculture feeding, which is going to be reflected on the health of the host animal, in this case, red tilapia (*Oreochromis sp.*), as well as a significant reduction in the use of antibiotic therapy, the improvement in the assimilation of nutrients and substantial increase in weight gain and growth (9). The assessment of the application of probiotic microorganisms in the aquaculture industry gives the department of Norte de Santander a choice to improve the quality and innocuousness of the fish raised in the fish farm stations.

Along with the development of this work, it is also sought to strengthen the educational and scientific knowledge, for the information of these new nourishment alternatives with cultivable bacteria present in the samples object of this study. Nevertheless, since this practice is still recent in aquaculture, the microorganism species used are few, which is why strains with probiotic characteristics are still being selected which are preferably found in the digestive tract, liver, kidney, gills and skin of the fish. This means that it is important for future researchers to deepen in this kind of studies to generate new knowledge and alternatives in both aquaculture and livestock production (7). The aim of this study was to assess the behavior of red tilapia juveniles (*Oreochromis sp.*) in presence of the possible probiotic microorganisms isolated from the gastrointestinal tract of *panche* fish (*Hypostomus plecostomus*).

MATERIALS AND METHODS

Obtaining probiotics. The three strains of *Lactobacillus* genus (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*) chosen to make up the probiotic, were isolated from a section of the intestines of *Panche*

las bacterias responsables de la acción probiótica, producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas a la dieta del animal.

El uso de probióticos en los alimentos mejora el crecimiento de diferentes especies de peces incluyendo el Pez Gato Africano (*Clarias gariepinus*), (1); Lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), (2); Tilapia (*Oreochromis niloticus*), (3,4); Platija Japonesa (*Paralichthys olivaceus*), (5); Dorada (*Sparus aurata*) y Róbalo (*Dicentrarchus labrax*) (6). Los efectos de los probióticos se han relacionado con la modulación de la microbiota intestinal y el establecimiento de microorganismos benéficos, alta especificidad y las actividades totales de enzimas digestivas, en la membrana del borde en cepillo, lo que aumenta la digestibilidad de los nutrientes y alimentos (7,8).

El aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos puede constituir una alternativa para la nutrición acuícola, en la que se refleje la salud del animal anfitrión, en este caso en la tilapia roja (*Oreochromis sp.*), así como una disminución sustancial en el uso de terapias antibióticas, la mejora de la asimilación de nutrientes y rendimientos sustanciales en la ganancia de peso y crecimiento (9). La evaluación de la aplicación de microorganismos probióticos en la industria acuícola abre al departamento Norte de Santander una opción para mejorar la calidad e inocuidad de los peces criados en estaciones piscícolas.

Inherente al desarrollo de este trabajo también se busca fortalecer el conocimiento educativo y científico, para el conocimiento de estas nuevas alternativas nutricionales con bacterias cultivables, presentes en las muestras objeto de este estudio. Sin embargo, debido a que esta práctica aún es reciente en la acuicultura, son pocas las especies de microorganismos que se usan, por lo que se continúa seleccionando cepas con características probióticas que preferentemente se encuentren en el tracto digestivo, el hígado, el riñón, las branquias y la piel de los peces, por lo tanto es importante que futuros investigadores profundicen más en este tipo de estudios que generan nuevos conocimientos y alternativas en las producciones tanto acuícolas como pecuarias (7). El objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) frente a microorganismos posibles probióticos, aislados del tracto gastrointestinal del pez *panche* (*Hypostomus plecostomus*).

fish *Hypostomus plecostomus*, which was homogenized in 10 ml of Thioglycollate Broth. Dilutions of (10^{-3}) were done and 0.1 ml were inoculated in MSR agar plates (Merck), by duplicate. The plates were incubated at 37°C during 24 hours in aerobic and anaerobic conditions. After the incubation period the count of colony forming units was done for each dilution (CFU/ml) and through successive recultivations, the strains were purified and characterized microbiologically and molecularly (10). The probiotic capacity of the strains was determined by four techniques: resistance to acid pH, resistance to bile salts, pathogen inhibition against pathogens as *Pseudomonas sp*, *Sthapylococcus sp*, *Salmonella sp* and *Escherichia coli* and resistance to antibiotics (11).

Formulation of native probiotics. The indigenous probiotic was made up by three strains of *Lactobacillus* and compared to the commercial probiotic *L. rhamnosus* (Elmor). The inoculum of native isolates was prepared having an axenic fresh culture of the three isolates that were selected for the conformation of the native probiotic, cultivated in MRS agar (Merck) at 37°C for 48 hours, inoculated in 5 ml of MRS broth (Merck) at 37°C between 8-10 hours, obtaining a suspension in the OD range of 0.10 – 0.130 equivalent to $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (11). After the adjustment of the three probiotic agents, 1 mL of each probiotic was inoculated into 12 mL of MRS broth, to obtain a stock solution of the native probiotic.

Probiotics in relation to quantity of feed in (g) supplied. The probiotic solution for both native and commercial was prepared to a relation 5: 2 Water-Molasses, a relation of five liters of water plus two liters of molasses for a bag of food (Itacol) of 40 kg, and this relation was taken for 1 kg, placing 125 mL of water, 50 mL of molasses and 100 mL of probiotic (12,13). This water-molasses-probiotic feed with the concentrate was homogenized and fractionated in rations to feed the fish six times a day.

Production of diets. Three experimental treatments were formulated taking into account the nourishment needs of red tilapia (*Oreochromis sp.*). All the treatments were made with the same commercial concentrate feed (Table 1).

Treatment 1 CC (Control Concentrate): Concentrate feed without the addition of the probiotic.

Treatment 2 CNP (Concentrate plus Native Probiotic): Concentrate feed plus the native probiotic extracted from the Panche fish

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de probióticos. Las tres aislamientos del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*) seleccionadas para conformar el probiótico, fueron aisladas de una porción del intestino del pez panche *Hypostomus plecostomus*, que se homogeneizó en 10 ml de Caldo de Tioglicolato. Se realizaron diluciones de (10^{-3}) y se inoculó 0.1 ml en placas de agar MSR (Merck), por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones aerobias y anaerobias. Transcurrido el período de incubación se efectuó el conteo de las unidades formadoras de colonias para cada dilución (UFC/ml) y mediante resiembra sucesivas, las cepas fueron purificadas y caracterizadas microbiológicamente y molecularmente (10). La capacidad probiótica de las cepas se determinó por medio de cuatro técnicas: la resistencia al pH ácido, la resistencia a sales biliares, la actividad antimicrobiana contra patógenos como *Pseudomonas sp*, *Sthapylococcus sp*, *Salmonella sp* y *Escherichia coli*. y resistencia a antibióticos (11).

Formulación de los probióticos nativos. El probiótico nativo fue conformado por tres aislamientos del género *Lactobacillus* y se comparó con el probiótico comercial *L. rhamnosus* (Elmor). El inóculo de las cepas nativas, fue preparado teniendo un cultivo axénico y fresco de las tres cepas que fueron seleccionadas para la conformación del probiótico nativo, luego de sembradas en agar MRS a 37°C por 48 h, se inocularon en 5 mL de caldo MRS a 37°C entre 8 a 10 horas, obteniendo una suspensión en el rango D.O de 0.10 – 0.130 equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (11). Posterior al ajuste de los tres agentes probióticos, se inoculo 1 mL de cada probiótico en 12 mL de caldo MRS, esto para obtener una solución madre del probiótico nativo.

Probióticos en relación a cantidad de alimento en (g.) suministrado. La solución de los probióticos tanto para los nativos como para el comercial se preparó en una relación 5:2 de Agua-Melaza, una relación de cinco litros de agua más dos litros de melaza para un saco de alimento (Itacol) de 40 kg, y se llevó esta relación para 1 kg, colocando 125 mL de agua, 50 mL de melaza y 100 mL de probiótico (12,13). Este alimento agua-melaza-probiótico con el concentrado se homogenizó y fue fraccionado en raciones para alimentar a los peces seis veces al día.

Elaboración de dietas. Se formularon tres tratamientos experimentales teniendo en cuenta las necesidades nutricionales de la tilapia roja

Table 1. Composition of the commercial concentrate feed in the nourishment of *Oreochromis* sp.

Content	%
Minimum protein	40
Minimum grease	6
Maximum fiber	6
Maximum humidity	12
Maximum ashes	12

Source. Itacol S.A

(*Hypostomus plecostomus*) in a concentration of 10^8 CFU.

Treatment 3 CCP (Concentrate plus Commercial Probiotic): Concentrate feed plus the commercial probiotic made up by *Lactobacillus rhamnosus* adjusted to a concentration of 10^8 CFU.

Bioessay. 12 aquariums made of 5mm thick glass with dimensions of 45 cm height, 48 cm width and 65.35 cm length and a total capacity of 140.42 liters were used. The aquariums were kept with a volume of 110.31 liters of water, 11.031 liters per fish, a pH of 8.09 ± 0.13 and a temperature of $28.99 \pm 1.05^\circ\text{C}$. These conditions were maintained throughout the experiment; the aquariums were cleaned from food remains and feces daily. In a random way 10 juvenile organisms of *Oreochromis* sp were introduced into each aquarium. With average values of 1.28 ± 0.22 g weight; 2.1 ± 0.28 cm length. The organisms were weighed in an analytical balance (Mettler PM 460 DeltaRange®; Mettler Instrument Corp., Highstown, NJ, USA) and their total length was measured with a vernier. The fish were fed six times a day (6:30, 8:30, 10:30, 12:30, 14:30 y 16:30 hours), according to the 8% of their biomass. The experiment had a duration of 30 days.

Statistical analysis. The statistical model employed was a completely random design. For the data analysis, the statistical software InfoStat version 2014 was used. The variance analysis was done to determine the existence of significant differences among treatments, with a significance level with $\alpha = 0.05$. The Duncan test was used to make the multiple comparisons among the media.

Furthermore, the data obtained regarding food consumption, biometrics, initial-final weight, initial-final length and environmental conditions were noted and digitalized through the use of the program Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Corp., Washington, EU). Thus the data were processed through descriptive statistics and expressed in averages \pm standard deviation.

(*Oreochromis* sp.). Todos los tratamientos estaban conformados por el mismo alimento concentrado comercial (Tabla 1).

Tratamiento 1 CC (Concentrado Control): Alimento concentrado sin inclusión de probiótico.

Tratamiento 2 CPN (Concentrado más Probiótico Nativo): Alimento concentrado más el probiótico nativo extraído del pez panche (*Hypostomus plecostomus*) en una concentración de 10^8 UFC

Tratamiento 3 CPC (Concentrado más Probiótico Comercial): Alimento concentrado más el probiótico comercial conformado por *Lactobacillus rhamnosus* ajustado a una concentración de 10^8 UFC.

Bioensayo. Se utilizaron 12 acuarios de vidrio de 5mm de grosor, con dimensiones de 45 cm de alto, 48 cm de ancho y 65.35 cm de largo, con una capacidad total de 140.41 L los acuarios fueron mantenidos con volumen de 110.31 L de agua, 11.031 L/pez, con pH de 8.09 ± 0.13 y temperatura de $28.99 \pm 1.05^\circ\text{C}$. Estas condiciones se mantuvieron a lo largo del experimento; los acuarios se limpiaron diariamente de restos de alimento y heces. De forma aleatoria en cada acuario se introdujeron 10 organismos juveniles de *Oreochromis* sp., con valores promedio de peso de 1.28 ± 0.22 g; longitud de 2.1 ± 0.28 cm. Los organismos se pesaron en una balanza analítica (Mettler PM 460 DeltaRange®; Mettler Instrument Corp., Highstown, NJ, USA) y se midió su longitud total con un vernier. Los peces fueron alimentados seis veces al día (6:30, 8:30, 10:30, 12:30, 14:30 y 16:30 horas), de acuerdo con el 8% de su biomasa. El experimento tuvo una duración de 30 días.

Análisis estadístico. El modelo estadístico que se empleó fue un diseño completamente al azar. Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico InfoStat versión 2014. El análisis de varianza se realizó para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. La prueba de Duncan fue usada para realizar las comparaciones múltiples entre las medias.

Además, los datos obtenidos en cuanto a consumo de alimento, biometrías, peso inicial-final, longitud inicial-final y condiciones ambientales fueron anotados y digitalizados en Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Corp., Washington, EU) y fueron procesados por medio de una estadística descriptiva y expresada en promedios \pm desviación estándar.

Las variables analizadas en el experimento de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) fueron

The variables analyzed in the experiment on red tilapia (*Oreochromis sp*) juveniles were the following:

Weight gain (WG) = [Final weight (g)-Initial weight (g)]

Length gain (LG) = [Final length (cm)-Initial length (cm)]

Alimentary conversion (AC) = (Serving consumption (g))/(Weight gain (g))

Alimentary efficiency (AE) = (Weight gain (g))/(food consumption (g)) × 1000

Specific Growth Rate (SGR) = $(\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / (\# \text{ feeding days}) \times 100$

Proteic efficiency rate (PER) = ((Weight gain (g))/(Gross protein consumed (g)))

Survival (S) = $100 - [((\text{Initial number of fish} - \text{Final number of fish}) / (\text{Initial number of fish})) \times 100]$

% of incidence = (# of diseased fish)/(# of healthy fish) × 100

RESULTS

Length (L). The organisms fed with the diet enriched with CNP got the greatest length gain (4.16 ± 0.770 cm), while the lowest value was obtained with the CC diet (3.76 ± 0.948 cm) (Figure 1). The analysis pointed out that the CC y CCP diets did not show significant differences ($p > 0.05$) between each other. CC and CNP diets showed significant differences between each other (Table 2).

Specific growth rate (SGR). CNP diet presents the highest value (206.98 %/day), followed by CCP with 199.35 %/day; and CC only got an increase of 199.04 %/day. (Table 2, Figure 2)

Proteic efficiency rate (PER). CC and CCP diets obtain the lowest values (2.78 and 2.75 g, respectively), with CNP obtaining the highest rate of 3.08 g. (Table 2, Figure 2)

Alimentary efficiency (AE). This was the highest with CNP diet (1230.83 g) and the lowest with CCP (1099.51 g). (Table 2, Figure 2)

Weight (W). On table 2 the average values of gain weight and final weight of the organisms fed with the three diets are presented, as well as the results of their statistical analysis. The organisms fed with the diet enriched with CNP are the ones

las siguientes:

Ganancia de peso (GP) = [Peso Final (g)-Peso inicial (g)]

Ganancia en longitud (GL) = [Longitud final (cm)-Longitud inicial (cm)]

Conversion alimenticia (CA) = (Consumo de ración (g))/(Ganancia de Peso (g))

Eficiencia alimenticia (EA) = (Ganancia de peso (g))/(consumo alimento (g)) × 1000

Tasa específica de crecimiento (TEC) = $((\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / (\# \text{ días alimentados})) \times 100$

Tasa de eficiencia proteica (TEP) = ((Ganancia de peso (g))/(Proteína bruta consumida (g)))

Sobrevivencia (S) = $100 - [((\text{N}^\circ \text{ de peces inicio} - \text{N}^\circ \text{ de peces final}) / (\text{N}^\circ \text{ de peces inicio})) \times 100]$

% de incidencia = (# de peces enfermos)/(# de peces sanos) × 100

RESULTADOS

Longitud (L). Los organismos alimentados con la dieta enriquecida con CPN alcanzaron la mayor ganancia de longitud (4.16 ± 0.770 g), mientras que el valor más bajo se obtuvo con la dieta CC (3.76 ± 0.948 g) (Figura 1). El análisis estadístico señaló que las dietas CC y CPC no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. Las dietas (CC y CPN) presentaron diferencias significativas entre ellas (Tabla 2).

Tasa específica de crecimiento (TEC). La

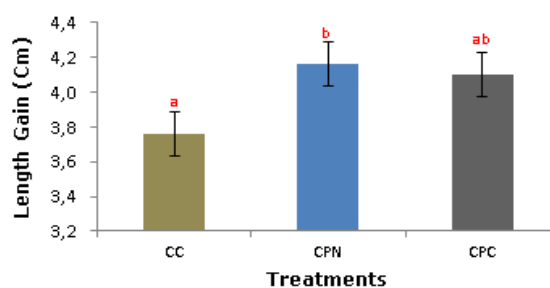


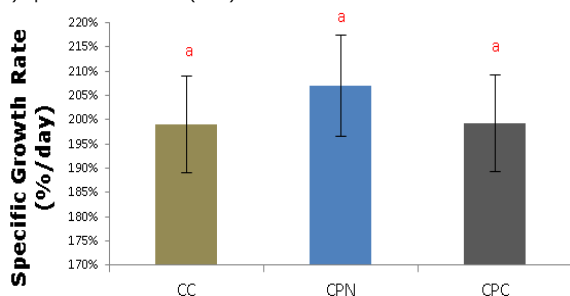
Figure 1. Length gain in *Oreochromis sp* regarding Control Concentrate (CC), Concentrate plus Native Probiotic (CNP) and Concentrate plus Commercial Probiotic (CCP) at 30 days of culture.

Table 2. Indexes of productive yielding observed during the growth of red tilapia (*Oreochromis sp.*) juveniles comparing control concentrate (CC), concentrate plus native probiotic (CNP) and concentrate plus commercial probiotic (CCP) at 30 days of culture.

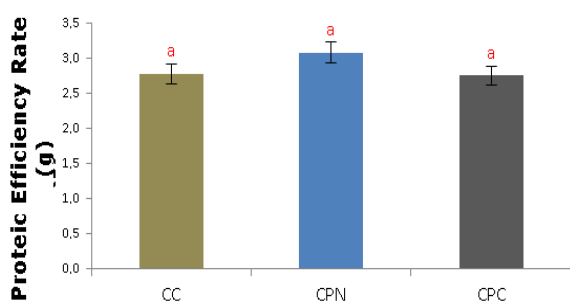
Productive Indexes	CC	CNP (1X10 ⁻⁸ CFU)	CCP (1X10 ⁻⁸ CFU)
Weight Gain (g)	6.51±2.330 ^a	7.22±2.780 ^a	6.46±2.130 ^a
Length Gain(cm)	3.76±0.948 ^a	4.16±0.770 ^b	4.10±0.630 ^{ab}
Initial weight (g)	1.28±0.220	1.28±0.220	1.28±0.220
Final weight (g)	7.79±2.330 ^a	8.5±2.780 ^a	7.74±2.130 ^a
Alimentary Conversion (g)	1.14±0.910 ^a	1.01±0.620 ^a	1.10±0.750 ^a
Alimentary Efficiency (g)	1112.71±399.25 ^a	1230.83±473.92 ^a	1099.51±363.06 ^a
Specific Growth Rate (%/day)	199.04±35.65 ^a	206.98±37.74 ^a	199.35±32.32 ^a
Proteic Efficiency Rate (g)	2.78±1.25 ^a	3.08±1.18 ^a	2.75±0.91 ^a
% Survival	95.00	97.50	97.50
% Disease Incidence	5.26	2.56	2.56

Equal letters in lines point at the lack of significant difference ($p < 0.05$) between the diets. Average values (\pm standard deviation). CFU: Colony Forming Units

a) Specific Growth Rate (SGR)



b) Proteic Efficiency Rate (SPR).



c) Alimentary Efficiency (AE).

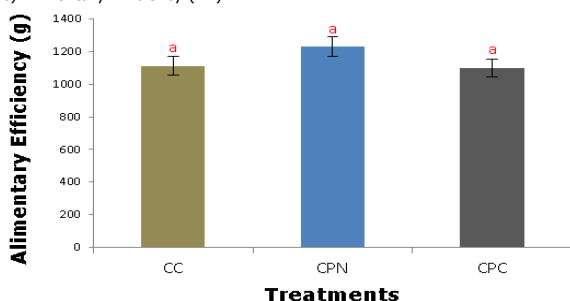


Figure 2. a) Specific growth rate (SGR) Values, b) Proteic efficiency rate (SPR) and c) Alimentary efficiency (AE) in relation to the weight of the organisms fed with the three treatments CC, CNP and CCP at 30 days of culture.

dieta CPN presentó el mayor valor (206.98%/día), seguido de la CPC con 199.35%/día; y la CC sólo obtuvo un incremento de 199.04%/día (Tabla 2, Figura 2).

Tasa eficiencia proteica (TEP). Las dietas CC y CPC obtuvieron los valores más bajos (2.78 y 2.75 g, respectivamente), siendo el valor más alto para CPN con una tasa de 3.08 g (Tabla 2, Figura 2).

Eficiencia alimenticia (EA). Fue mayor con la dieta CPN (1230.83 g) y la menor con CPC (1099.51 g). (Tabla 2, Figura 2)

Peso (P). En la Tabla 2 se presentan los valores promedio de ganancia de peso y peso final de los organismos alimentados con las tres dietas evaluadas, así como los resultados del análisis estadístico. Los organismos alimentados con la dieta enriquecida CPN son los que obtuvieron el mayor peso (8.5±2.780 g), mientras que el valor más bajo fue con la dieta CPC (7.74±2.130 g).

El análisis estadístico indicó que al final del experimento (30 días), las dietas CPN y CPC no presentaron diferencias significativas entre ellas, así como las dietas CC y CPN. La mejor ganancia de peso fue con la dieta CPN (7.22±2.780 g) y la menor con CPC (6.46±2.130 g), (Figura 3).

Sobrevivencia (S). Los organismos alimentados con los tratamientos CPN y CPC mostraron la mejor sobrevivencia con un valor de 97.50%, mientras que con el tratamiento CC se registró un valor de 95% (Figura 4).

Conversión alimenticia (CA). El tratamiento CPN presentó el mejor resultado de conversión alimenticia con 1.01 g, mientras que con los tratamientos CPC y CC no se obtuvieron los mejores registros con 1.10 g y 1.14 g, respectivamente (Figura 5).

that got the greatest weight (8.5 ± 2.780 g), while the ones with the lowest values are those fed with the CCP diet (7.74 ± 2.130 g).

The statistical analysis indicates that at the end of the experiment (30 days), the CNP and CCP did not present significant differences between each other, just as the CC and CNP diets. The best weight gain was with the CNP diet (7.22 ± 2.780 g) and the lowest was with CCP (6.46 ± 2.130 g) (Figure 3).

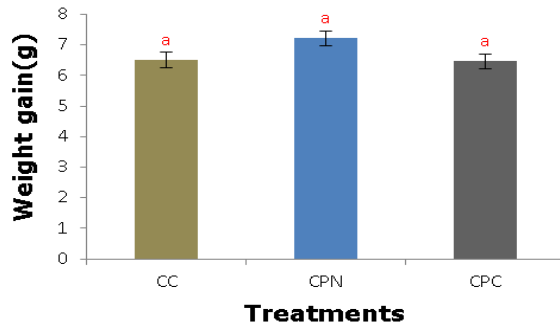


Figure 3. Weight gain in *Oreochromis* sp regarding the treatments with CC, CNP y CCP at 30 days from culture.

Survival (S). The organisms fed with the treatments CNP and CCP showed a better survival with a value of 97.50%, while the CC treatment recorded a value of 95% (Figure 4)

Alimentary conversion (AC). CNP treatment presented the best result of alimentary conversion with 1.01 g, while with CCP and CC the records were 1.10 g y 1.14 g, respectively (Figure 5).

DISCUSSION

It was observed that the three strains of *Lactobacillus* used for the native probiotic, isolated from the digestive tract of *H. plecostomus*, gave diverse results in the biometric variables considered, as well as in the SGR, PER, AE and AC. The best results were obtained with the CNP treatment, while CCP and CC generally gave lower values.

These variations could be caused because some *Lactobacillus* used as probiotics do not adhere properly to the digestive tract of some fish, due to other bacteria which may be establishing competition in the colonization of the fish's digestive tract (14). It is mentioned that the bacteria used as probiotics actually suffer from

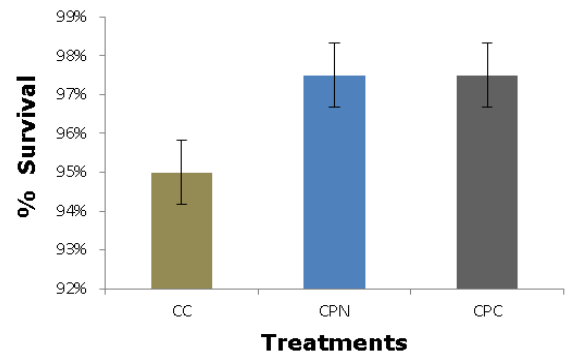


Figure 4. Survival data of the organisms fed with the three assessed treatments.

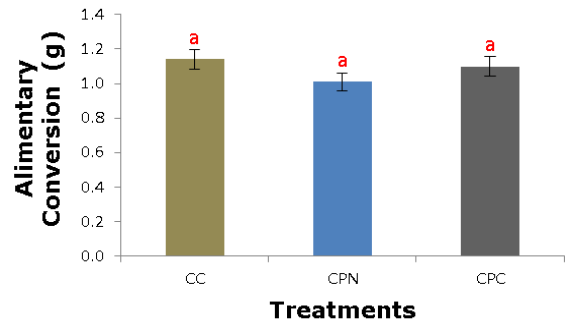


Figure 5. Data of the Alimentary Conversion of the organisms fed with the three assessed treatments.

DISCUSIÓN

Se observó que los tres aislamientos de *Lactobacillus* utilizadas para el probiótico nativo, aislados del tracto digestivo del *H. plecostomus*, dieron resultados diversos en las variables biométricas consideradas, así como en la TCE, TEP, EA y CA. Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento CPN, mientras que los tratamientos CPC y CC por lo general arrojaron valores más bajos.

Estas variaciones podrían deberse a que ciertos *Lactobacillus* usados como probióticos no se adhieren de forma adecuada en el tracto digestivo de algunos peces, debido a que otras bacterias pueden estar estableciendo competencia en la colonización del tracto digestivo del pez (14). Estos mencionan que las bacterias utilizadas como probióticos en realidad sufren una exclusión competitiva en el tracto digestivo del hospedero, ya sea por alimento o por espacio, por lo que la inclusión de bacterias benéficas en las dietas para animales acuáticos puede tener efectos muy variados. En este estudio, los peces alimentados con los probióticos aislados del pez *H. plecostomus*,

a competitive exclusion in the digestive tract of the host, either because of food or space, which is why the inclusion of beneficial bacteria in the diet of aquatic animals can have varied effects. In this study, the fish fed with the probiotics isolated from the fish *H. plecostomus*, acquired a greater gain in length, which may be caused by the probiotic strains isolated from a fish, regardless their coming from another species, giving greater benefits than commercial probiotics isolated from human beings or other mammals, as in the case of *L. ramosus* (15)

In this investigation it was observed that by using strains with probiotic characteristics of native fish isolated *Hypostomus plecostomus* as a probiotic dietary supplement *Tilapia Oreochromis sp* have greater benefit with respect to the parameter of survival compared to Control treatment CC. Similar researches by Lara-Flores et al (3), in the cultivation and the survival time of *Oreochromis niloticus*, were evaluated two types of probiotics mixed in food such as *S. cerevisiae* and a mixture of *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, concluding that *S. cerevisiae* provides better performance in gaining weight, specific growth rate and better survival after nine weeks of cultivation of Nile tilapia.

Other studies also entrench the ability of the use of microorganisms as promoters of growth and survival in fish farming Hoseinifar et al (16), this research evaluated the effects of inactive brewer's yeast (*S. cerevisiae var ellipsoideus*) on the growth, physiological response and gut microbiota of juvenile Beluga (*Huso huso*) by including it in the diet at concentrations of 1% and 2% (w/v), presenting better results in gaining weight, specific growth rate and survival after six weeks of cultivation.

Other similar work in tilapia cultivation introduced by Mello et al by (17) indicates that the use of strains of *Bacillus cereus* at a concentration of $4,0 \times 10^8$ UFCG⁻¹ and *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^8$ UFCG⁻¹ as probiotic strains in diet of juvenile Nile Tilapia, they have demonstrated a survival rate of 89.47% compared to the control fish without the addition of probiotics with a percentage of 76.61% survival, contrary to the results of the study presented by Albuquerque et al (18) by using *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* var. Toyoi C-3102 as probiotic strains supplied individually or in combination in the diet of juvenile tilapia, the results had no significant difference in the growth rate parameter after 127 days cultivation.

Recent researches on the introduction of bio-preparations with probiotic characteristics in

adquirieron mayor ganancia en longitud, lo que puede deberse a que los aislamientos probióticos aislados de un pez, independientemente de que provengan de otra especie, confieren mayores beneficios que probióticos comerciales aislados del ser humano u otros mamíferos, como es el caso de *L. ramosus* (15).

Uno de los factores más importantes que se deben tomar en cuenta en la producción de peces es la sobrevivencia de los organismos en cultivo. En esta investigación se observó que al utilizar aislamientos con características probióticas aisladas de peces nativos *Hypostomus plecostomus* como suplemento probiótico en la dieta de la Tilapia *Oreochromis sp.*, se tiene mayor beneficio con respecto al parámetro de sobrevivencia en comparación con el tratamiento Control CC. Investigaciones similares desarrolladas por Lara-Flores et al (3), en el cultivo y el tiempo de sobrevivencia de *Oreochromis niloticus*, evaluaron dos tipos de probióticos mezclados en el alimento como son *S. cerevisiae* y una mezcla de *Streptococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*, concluyendo que *S. cerevisiae* proporcionó mejor desempeño en ganancia en peso, tasa de crecimiento específico y mejor sobrevivencia después de nueve semanas de cultivo de la tilapia del Nilo.

Igualmente otros estudios soportan la capacidad del uso de microorganismos como promotores de crecimiento y sobrevivencia en el cultivo de peces Hoseinifar et al (16), en esta investigación evaluaron los efectos de la levadura cervecera inactiva (*S. cerevisiae var ellipsoideus*) sobre el crecimiento, respuesta fisiológica y microbiota intestinal de juveniles de Beluga (*Huso huso*) incluyéndolo en la dieta alimenticia a concentraciones del 1% y 2% (p/v), presentando mejores resultados en ganancia de peso final, tasa específica de crecimiento y sobrevivencia tras un período de seis semanas de cultivo.

Otros trabajos similares en el cultivo de Tilapia es el realizado por Mello et al (17); los autores indican el uso de cepas de *Bacillus cereus* a una concentración de 4.0×10^8 UFCG⁻¹ y *Bacillus subtilis* 4.0×10^8 UFCG⁻¹ como cepas probióticas en la dieta de juveniles de Tilapia de Nilo, demostrando un porcentaje de sobrevivencia de 89.47% en comparación con los peces control sin la adición de probióticos con un porcentaje de sobrevivencia de 76.61%; contrario a estos resultados se presenta el estudio de Albuquerque et al (18) que al emplear *Bacillus cereus* var. *toyoi* y *Bacillus subtilis* C-3102 como cepas probióticas suministradas individualmente o en combinación en la dieta de juveniles de tilapia, no observaron diferencias significativas en el parámetro de tasa de crecimiento después de 127 días de cultivo.

the diet for growing red tilapia *Oreochromis sp* proposed by Mantilla et al (19), presented similar results to those presented in this study, such as: greater productive performance and survival compared to control treatment for 45 days cultivation.

With the analysis of the results of this work, it is recommended to carry out more nourishment tests increasing the period of assessment of the given probiotic strains, since the productive variables in these kinds of experiments are better expressed after 60 days of treatment, as authors like propose the possible hypothesis that after this time the probiotic microorganisms yield a better competitive exclusion in the intestine.

In conclusion the best reports regarding length gain were for the native probiotic and it is deduced that they were easily settled in the fish intestine (*Oreochromis sp.*). It is determined that there are significant differences in the result of length gain for the Control Concentrate (CC) against the Concentrate plus Native Probiotic (CNP) for the red Tilapia (*Oreochromis sp.*) in the juvenile stage for a period of 30 days.

The percentage of disease incidence was favorable for the Concentrate plus Native Probiotic (CNP) and Concentrate plus Commercial Probiotic (CCP) since a lower number of mortality was recorded compared with the Control Concentrate (CC).

It is desirable to substitute the use of antibiotics in favor of probiotic microorganisms, since the result of their consumption would be less aggressive when compared to the effects of antibiotics. This has been one of the hints for the industries to want to research this kind of bacteria, isolating them from non-conventional samples and incorporating them to human and animal diets.

Acknowledgments

In honor of Yary Zulay Guerrero Jaimes, Ph.D (Q.E.P.D) principal director of this project, for his friendship, dedication, delivery. Margarita Caballero Chaparro assistant of the Laboratory (UFPS, headquarters Los Patios), Ph.D. Camilo Ernesto Alvarado Guerrero, director of the program of Engineering-UFPS, and to the Doctors Alejandro Hipólito Pabón Valverde and Pilar Ximena Lizarazo Medina for their collaboration.

Investigaciones recientes sobre la introducción de bio-preparados con características probióticas en la dieta alimentaria para el cultivo de tilapia roja *Oreochromis sp.*, propuesto por Mantilla et al (19), presentaron resultados similares a los presentados en este estudio como son: mayor desempeño productivo y sobrevivencia comparado con el tratamiento control durante 45 días de cultivo.

Con el análisis de los resultados de este trabajo se recomienda realizar más pruebas de alimentación, aumentando el período de evaluación de los aislamientos probióticos suministradas, debido a que las variables productivas en estos tipos de experimentos se expresan mejor a partir de los 60 días de tratamiento, pues algunos autores plantean la posible hipótesis de que a partir de este tiempo los microorganismos probióticos presentan una mejor exclusión por competitividad en el intestino.

En conclusión los mejores reportes en cuanto a ganancia en longitud fueron para el probiótico nativo y se deduce que se establecieron con facilidad en el intestino del pez (*Oreochromis sp.*). Se determinó que si existen diferencias significativas en los resultados de ganancia de longitud, para Concentrado Control (CC) vs., Concentrado más Probiótico Nativo (CPN) para Tilapia roja (*Oreochromis sp.*) en la etapa de juveniles por un período de 30 días.

El porcentaje de incidencia de enfermedades fue favorable para el Concentrado más Probiótico Nativo (CPN) Concentrado más Probiótico Comercial (CPC) pues se registró un menor número de mortalidad con respecto al Concentrado Control (CC).

Se desea sustituir el uso de antibióticos por microorganismos probióticos, debido a que el resultado de su consumo sería menos agresivo en comparación con los efectos de los antibióticos, esto ha sido uno de los indicios para que las industrias deseen investigar a este tipo de bacterias, aislándolas de muestras no convencionales e incorporándolas en dietas humanas y de animales.

Agradecimientos

En honor a Yary Zulay Guerrero Jaimes, Ph.D (Q.E.P.D) directora principal de este proyecto, por su amistad, dedicación, entrega. Margarita Caballero Chaparro asistente del Laboratorio (UFPS, sede Los Patios), al Ph.D Camilo Ernesto Alvarado Guerrero, director del programa de Ingeniería Pecuaria- UFPS, y a los Doctores Alejandro Hipólito Pabón Valverde y Pilar Ximena Lizarazo Medina por su colaboración.

REFERENCES

1. Al-Dohail MA, Hashim R, & Aliyu-Paiko M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) fingerling. *Aquacult Res* 2009; 40(14):1642-1652.
2. Sáenz de Rodrigáñez MA, Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Smidt H, Arijo S, León-Rubio JM, Alarcón FJ, Balebona MC, Moriño MA, Cara JB & Moyano FJ. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionally of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquacult Nutr* 2009; 15(2):177-185.
3. Lara-Flores M, Olivera-Castillo LC & Olvera-Novoa MA. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int J Fish Aquacult* 2010; 2(4):93-101.
4. El Haroun ER, Goda AS, & Chowdhury K. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac Res* 2006; 37(14):1473-1480.
5. Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K & Koshio S. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Sci* 2006; 72(2):310-321.
6. Carnevali O, De Vivo L, Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I, Silvi S & Cresci A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 2006; 258(1):430-438.
7. Balcázar JI, De Blas I, Ruiz ZI, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 2006; 114(3-4):173-186
8. Kesarocodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ and Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 2008; 274(1):1-14
9. Castro T, Monroy MC, Castro J, De Lara R y Castro G. Efecto de cuatro probióticos en el crecimiento y la sobrevivencia de *Carassius auratus*. *Cienc Pesq* 2011; 19(1):21-28.
10. Monroy-Dosta MC, Castro-Barrera T, Fernández-Perrino FJ, & Mayorga-Reyes L. Inhibition of *Aeromonas hydrophila* by probiotic strains isolated from the digestive tract of *Pterophyllum scalare*. *Rev Mex Ing Quím* 2010; 9(1):37-42.
11. Shiva CM, Calvo MA. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento [Tesis Doctoral]. España: Universidad autónoma de Barcelona; 2007.
12. Ortiz Á, Reuto J, Fajardo E, Sarmiento S, Aguirre A, Arbeláez G & Quevedo-Hidalgo B. Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Univ Sci* 2008; 13(2):138-148.
13. López BR, Benavides C, & Adalberto, L. Elaboración de un probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la tilapia roja (*Oreochromis spp.*) en etapa de engorde en la zona de Santo Domingo [Tesis Doctoral]. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Santo Domingo de los Tsáchilas; 2011.
14. Su P, Henriksson A, & Mitchell H. Survival and retention of the probiotic *Lactobacillus casei* LAFTI® L26 in the gastrointestinal tract of the mouse. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44(2):120-125.
15. Chythanya R, Karunasagar I, & Karunasagar I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquacult* 2002; 208(1):1-10.

16. Hoseinifar S, Mirvaghefi A, Merrifield D. The effect of dietary inactive brewer's yeast *S. cerevisiae* Ellipsoideus on the growth, psychological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquacult* 2011; 318(1):90- 94.
17. Mello HD, Moraes JRE, Niza IG, Moraes FR, Ozorio ROA, Shimada MT, Engracia Filho JR & Claudiano G. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq Vet Bras* 2013; 33(6):724-730.
18. Albuquerque DM, Marengoni NG, Boscolo WR, Ribeiro RP, Mahl I & Moura MC. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *Cienc Rural* 2013; 43(8):1503-1508.
19. Mantilla CL, Furnieles JPV, Pérez DPG, & Buelvas VMP. Desempeño del crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Oreochromis ssp.* utilizando un probiótico en el alimento. *Rev. Colomb. Biotecnol* 2016; 18(1):90-94.