

Efecto de dos probióticos comerciales en la ganancia de peso, parámetros hematológicos e histología intestinal del chame *Dormitator latifrons*

Effect of two commercial probiotics on weight gain, hematological parameters and intestinal histology in the Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons*

Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medranda, Gabriela Lucas, Estefanía Vilela Marcillo, Juan Carlos Vélez-Chica, Yanis Cruz-Quintana, Anderson Mesías, Yanko Vásconez, Mercedes Espinoza, Esperanza Piaguage, Ana María Santana-Piñeros

Grupo de Investigación en Sanidad Acuicola, Inocuidad y Salud Ambiental; Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Calle Gonzalo Loo Velasco s/n, Ciudadela Universitaria, Bahía de Caráquez, Manabí 130104, Ecuador

Correspondencia: Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medranda  E-mail: abermudez@utm.edu.ec

Artículo original | Original article

Palabras clave

Intestino
Sangre
Tratamientos
Alimento
Control

RESUMEN | Los probióticos en acuicultura son conocidos por sus efectos benéficos sobre el tracto digestivo y el sistema inmune de los hospederos; sin embargo, muy poco se conoce sobre su aplicación en *Dormitator latifrons*, una especie con gran potencial acuícola. En ese sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos probióticos comerciales sobre la ganancia en peso, parámetros sanguíneos y cambios histológicos en el tejido intestinal del *Dormitator latifrons*. Se implementó un diseño experimental aleatorio conformado por un control y dos tratamientos, con tres réplicas cada uno, y una duración de 22 días. Todos los organismos (n= 45), con un peso inicial promedio de $20,8 \pm 7,5$ g, fueron alimentados con concentrado comercial para tilapia al 35% de proteína a una tasa del 3% de biomasa. A los tratamientos 1 (T1) y 2 (T2) se les adicionó probióticos en concentraciones de 2×10^9 UFC/g y 6×10^9 UFC/g, respectivamente, administrado en el alimento. Se registraron diariamente los parámetros de calidad del agua (temperatura, salinidad, pH y oxígeno) y se contabilizaron los organismos muertos en cada unidad experimental. Al final del experimento, a cada organismo se le determinaron los parámetros sanguíneos (hematocrito (%), hemoglobina (g/dL) y conteo diferencial), y cinco peces de cada tratamiento fueron sacrificados para la muestra de tejido intestinal, que fueron fijadas en formalina neutra al 10% para análisis histológicos. A pesar de no observarse diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), se observó una clara tendencia de que el T1 presenta mejores resultados en cuanto al crecimiento, ganancia en peso y supervivencia (60%) y en los parámetros sanguíneos e histológicos respecto al largo de las vellosidades. Aunque son preliminares, los resultados son alentadores en cuanto a las ventajas del uso de probióticos comerciales en chames para mejorar su cultivo.

Keywords

Intestine
Blood
Treatments
Food
Control

ABSTRACT | Probiotics in aquaculture are well known for their beneficial effects on the digestive tract and immune system of hosts; however, very little is known about their application in *Dormitator latifrons*, a species with great aquaculture potential. In that sense, the objective of this study was to evaluate the effect of two commercial probiotics on weight gain, blood parameters and histological changes in the intestinal tissue of the *Dormitator latifrons*. We implemented a randomized experimental design consisting of a control and two treatments, with three replicas each, and a duration of 22 days. All organisms (n= 45) with an initial average weight of 20.8 ± 7.5 g, were fed commercial tilapia concentrate at 35% protein at a rate of 3% biomass. To treatments 1 (T1) and 2 (T2) probiotics were added in concentrations of 2×10^9 CFU/g and 6×10^9 CFU/g, respectively, administered in the feed. No probiotics were administered to the control group. Water quality parameters (temperature, salinity, pH and oxygen) were recorded daily and the dead organisms in each experimental unit were counted. At the end of the experiment, each organism was determined blood parameters (hematocrit (%), hemoglobin (g/dL) and differential count), and five of each treatment were sacrificed and intestinal tissue samples were taken, which were fixed in 10% neutral formalin for

histological analysis. In spite of not observing significant differences between the treatments ($p > 0,05$), a clear tendency is observed that the T1 presents better results in terms of growth, weight gain and survival (60%) and in the blood and histological parameters regarding the length of the villi. Although preliminary, the results are encouraging in terms of the advantages of using commercial probiotics in chames to improve their culture.

INTRODUCCIÓN

La intensificación de la producción acuícola ha incrementado la aparición de patógenos y enfermedades en los cultivos. Esto ha llevado a implementar dietas enriquecidas con probióticos, para mejorar la degradación del alimento, promover el crecimiento, estimular el sistema inmune de los organismos y mejorar el comportamiento productivo animal sin producir efectos para el consumidor (Nutrivet 2009). Los probióticos contribuyen al equilibrio microbiano intestinal mejorando la degradación del alimento y favoreciendo una mayor absorción y utilización de los nutrientes. Según Lara *et al.* (2002) los microorganismos probióticos una vez asentados en el tracto intestinal, inhiben otras poblaciones bacterianas, comúnmente patógenos oportunistas, y aumentan sus productos terminales, especialmente aminoácidos libres que favorecen el sistema inmune de los peces. La adición de probióticos en el alimento también promueve una mejora en el crecimiento, como lo ha señalado Martínez (2011), quien incorporó probióticos a la dieta de larvas y juveniles de lenguado senegalés y obtuvo un mayor contenido de proteína en músculo y mayor ganancia en peso con respecto a los organismos con dietas no suplementadas.

En Ecuador, el chame *D. latifrons* es una especie muy apetecida que se cultiva principalmente en la provincia de Manabí, Ecuador, en sistemas extensivos con densidades de siembra que no sobrepasan los 5 organismo/m² (FAO 2011). En la actualidad existen productores que han intensificado los esfuerzos por cultivar la especie, lo que podría aumentar el riesgo de aparición de enfermedades, principalmente de origen bacteriano. Por ejemplo, Centeno (2009) ha mencionado que el chame cultivado es afectado por forunculosis bacteriana, una enfermedad infecciosa causada por *Aeromonas* sp.; mientras que Freire (2001) ha reportado *Vibrio anguillarum* como un patógeno oportunista que habita en el microbiota intestinal de chames silvestres y cultivados, capaz de provocar cuadros septicémicos y mortalidades. Estas y otras bacterias como las *Pseudomonas* spp., son consideradas bacterias oportunistas que forman parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos y de la pared intestinal de muchas especies de peces, pero que en condiciones de estrés pueden ocasionar mortalidades de los hospederos. En ese sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos probióticos comerciales sobre la ganancia en peso, parámetros sanguíneos y cambios histológicos en el tejido intestinal de *Dormitator latifrons* en condiciones experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron un total de 76 ejemplares de chames en el Sistema Carrizal-Río Chone (La Segua), provincia de Manabí, Ecuador. Los organismos fueron transportados al laboratorio de nutrición en la Escuela de Acuicultura y Pesquería de la Universidad Técnica de Manabí, extensión Sucre, donde fueron aclimatados por 48 horas en un tanque de fibra con un volumen de 500 litros de agua. Durante este tiempo fueron alimentados y se observó su comportamiento, para detectar mortalidad o signos clínicos de enfermedad.

Se seleccionaron aleatoriamente 45 ejemplares de tamaño homogéneo, los cuales fueron colocados en acuarios de 25 litros de capacidad a razón de cinco animales por unidad muestral. Se distribuyeron los acuarios en tres grupos, un control y dos tratamientos, con tres réplicas cada uno. La temperatura, el oxígeno, salinidad y pH fueron similares en todas las unidades experimentales. Todos los organismos fueron alimentados al 3% de la biomasa con una frecuencia de tres raciones por día (08:00, 12:00 y 17:00 horas), con alimento balanceado de tilapia 35% de proteína, ajustada semanalmente durante tres semanas, acorde al incremento de la biomasa. Al alimento del T1 se le adicionó el probiótico comercial Terminate, cuya composición se basa en *Bacillus coagulans*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus EHC 100 strain*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*, con una concentración de 2

X 10^9 UFC/g, mientras que al T2 se le adicionó el probiótico comercial PondToss™, compuesto por *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* con una concentración de 6 X 10^9 UFC/g. Las dosificaciones de los probióticos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante en una dosis diaria de aplicación. Al grupo control no se le administró probiótico en el alimento.

Durante todo el experimento se monitorearon los parámetros de calidad de agua (temperatura, oxígeno, pH y salinidad) dos veces al día (10:30 am y 15:30 pm) con una sonda multiparamétrica (Apera Instruments PC60). Se realizaron recambios de agua del 30% del volumen total, cada 72 h. Semanalmente se realizó la biometría y se registraron los datos de talla con una cinta métrica y de peso con una balanza gramera (Scout Pro OHAUS de 0,1 gramos). La relación peso-longitud se estimó mediante la función alométrica $P = aL^b$ (Csirke 1980) donde P es el peso en g y L la longitud en cm del pez, a es el origen de la función o factor de condición y b es el coeficiente de alometría, que es un indicador del tipo de crecimiento que exhibe una especie.

Para realizar los análisis hematológicos, al finalizar el ensayo (luego de tres semanas) se realizó la extracción de sangre a los ejemplares ($n = 18$), por el método de punción caudal con una jeringa de 1 ml impregnada de EDTA (anticoagulante) a una concentración de 1.8 mg/ml. Inmediatamente se realizaron extendidos sanguíneos los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente, y posteriormente fueron fijados con metanol por 5 minutos y teñidos con May-Gruwanld-Giemsa (Malachowski y Romanowskyen 1890). Para el conteo diferencial se contabilizaron 200 células y se determinó la proporción de tipos celulares respecto al total de células contadas con ayuda de un microscopio óptico (Olympus® BH53). El valor del hematocrito se determinó por la técnica de micro hematocrito mediante la centrifugación a 4000 g por 10 min de los capilares con sangre heparinizada; de acuerdo al procedimiento descrito por Martínez (2012), mientras que la hemoglobina se determinó con un hemoglobínómetro Mission®.

Para los análisis histológicos fragmentos de 3 mm³ de intestino de cinco ejemplares por tratamiento fueron colectados posteriormente al sacrificio. Los fragmentos de tejido fueron fijados en formalina neutra al 10%, procesados mediante la técnica histológica de inclusión de parafina, cortados en secciones finas de 5 μ m y teñidas con los colorantes de rutina hematoxilina y eosina (Humason 1979).

Para determinar diferencias de crecimiento y de parámetros hematológicos e histológicos entre los tratamientos, se realizaron ANDEVA con un nivel de significancia $p < 0,05$, después de confirmar la homogeneidad de varianzas (test de Levene) y la normalidad de los datos (test de Shapiro – Wilk) (Zar 2010), se usó un modelo potencial de regresión de la forma $P = aL^b$, donde b es el coeficiente de alometría Csirke (1980). Los datos se presentan con el valor promedio \pm desviación estándar.

RESULTADOS

El oxígeno promedio durante el estudio fue de $3,66 \pm 0,71$ mg/l, la temperatura fue de $28,12 \pm 0,40$ °C, el pH fue de $8,29 \pm 0,21$ y la salinidad fue de $0,21 \pm 0,03$ UPS.

Los modelos de regresión peso-talla mostraron un mejor ajuste en los organismos del control ($P = 0,014$ $L^{2,940}$ con $R^2 = 0,764$) y T1 ($P = 0,011$ $L^{3,043}$ con $R^2 = 0,794$) que los organismos del T2 ($P = 0,137$ $L^{2,028}$ con $R^2 = 0,509$). Control y T1 mostraron una relación positiva, mientras T2 mostró una relación negativa (Fig. 1).

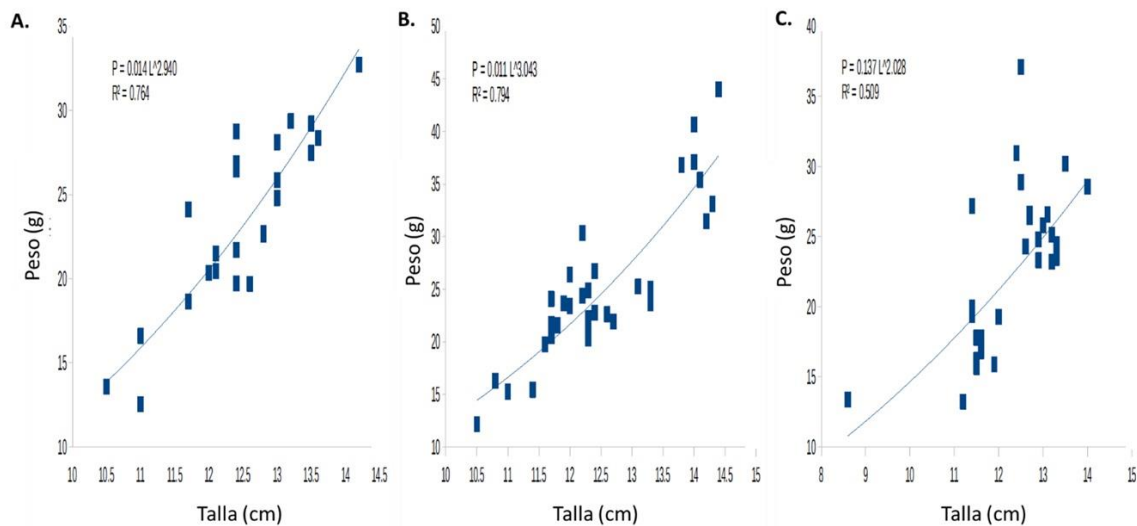


Figura 1 Modelos de regresión peso-talla de juveniles de *D. latifrons* alimentados con complementos de probiótico durante 21 días de cultivo. A. Control; B. Tratamiento 1; C. Tratamiento 2.

La talla y el peso de los organismos del Control, T1 y T2 ($F_{0,43} = 0,65$; $p > 0,05$) no mostraron diferencias significativas, sin embargo, los peces del T1 mostraron una tendencia a una mayor ganancia de peso (Tabla 1).

Tabla 1 Análisis de varianza (ANDEVA) de una vía de las variables peso y talla de juveniles de *D. latifrons* alimentados con un complemento probiótico durante 21 días de cultivo.

Tratamiento	Peso	Talla
Control	23,43 ± 5,17	12,47 ± 0,88
Tratamiento 1	25,41 ± 7,32	12,49 ± 1,05
Tratamiento 2	22,75 ± 5,78	12,27 ± 1,06

Los valores de hemoglobina ($H_{(1,8)} = 2,30$; $p > 0,05$), hematocrito ($H_{(2,16)} = 0,87$; $p > 0,05$) y conteos diferencial de neutrófilos ($H_{(2,16)} = 1,65$; $p > 0,05$), de monocitos ($H_{(2,15)} = 1,95$; $p > 0,05$) y de linfocitos ($H_{(2,16)} = 0,52$; $p > 0,05$) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Los valores de hematocrito, hemoglobina y neutrófilos mostraron valores más bajos en el tratamiento 2 con relación al control y tratamiento 1; mientras los linfocitos y monocitos mostraron valores más altos en el tratamiento 2 que en el control y tratamiento 1 (Tabla 2).

Tabla 2 Valores hematológicos obtenidos posteriormente a los tratamientos con probióticos en el chame *Dormitator latifrons*.

Parámetros	Control (n= 3)	Tratamiento 1 (n= 9)	Tratamiento 2 (n= 6)
Hematocrito (%)	24,66 ± 4,51	24,88 ± 7,36	21,25 ± 6,18
Hemoglobina (g/dL)	5,6 ± 0,99	7,16 ± 1,72	N/D
Neutrófilos (%)	30,66 ± 22,37	24,88 ± 8,43	19 ± 8,17
Linfocitos (%)	65 ± 25,12	71 ± 11,54	73 ± 12,75
Monocitos (%)	3,33 ± 2,51	4,38 ± 3,42	7 ± 4,55

N/D: No datos

n: tamaño de muestra

El largo de las vellosidades intestinales no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Sin embargo, se observa una tendencia a vellosidades de mayor tamaño en el T1 respecto al control y T2 (Figs. 2-3).

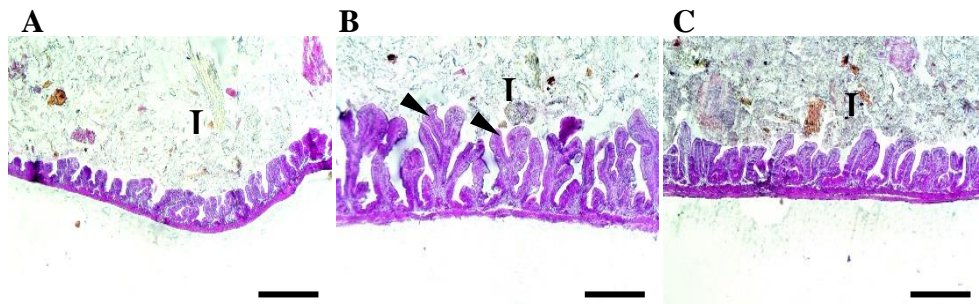


Figura 2 Sección longitudinal de intestino (I) de *Dormitator latifrons* mostrando las vellosidades. A) Control. B) Tratamiento 1. C) Tratamiento 2. Nótese el mayor tamaño y ramificación (flechas) en las vellosidades de los organismos del tratamiento 1. H-E, Escala de barra = 300 μ m.

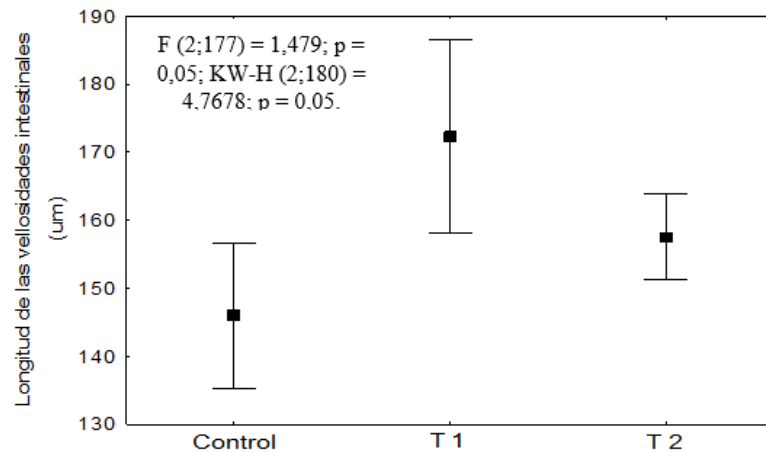


Figura 3 Tamaño promedio y desviación estándar de las vellosidades intestinales de *Dormitator latifrons* por tratamiento. Control: Tratamiento 1; Tratamiento 2.

DISCUSIÓN

El modelo de regresión peso – talla mostró una relación positiva para el T1 y negativa para T2. El T1 tuvo un coeficiente de alometría de 3,04, indicando un crecimiento proporcional entre peso y talla (Csirke 1980); mientras que el T2 tuvo un coeficiente de 2,028, mostrando una alometría negativa entre peso y talla (Delgadillo *et al.* 2012). El crecimiento alométrico positivo indica ganancia de peso en carne, lo cual es favorable en la acuicultura. Este crecimiento puede estar dado porque los organismos asimilaron mejor el alimento suministrado con los probióticos, lo que refuerza el criterio del efecto beneficioso de los probióticos hacia una forma de crecimiento más favorable (Froese, 2006). En otros estudios, se obtuvieron valores alométricos positivos de 3,19 en el chame dando peces cada vez más robustos conforme crecen. En el caso de T2, el crecimiento alométrico negativo indica que los organismos no aprovecharon o fueron incapaces de asimilar el alimento y los probióticos. Sin embargo, estudios posteriores podrán esclarecer las causas de este resultado.

Los parámetros hematológicos, hemoglobina, hematocrito, monocitos y linfocitos de los animales alimentados con probióticos podrían indicar una mejora en la respuesta inmune de chames mantenidos en los tratamientos 1 y 2 respecto al grupo control. A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre unidades experimentales, la mayoría de los parámetros fueron más altos en el tratamiento 1, seguido del tratamiento 2. Algunos estudios en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y tilapia roja *Oreochromis niloticus* han encontrado que dietas suplementadas con probióticos incrementan los parámetros hematológicos de los organismos (Merrifield *et al.*, 2010c; Álvarez, 2014; Elsabagh *et al.*, 2018). Mientras que otros autores mencionan que los parámetros hematológicos no han mostrado diferencias significativas con el uso de probióticos (Raida *et al.*, 2003; Merrifield *et al.*, 2010a). Estos resultados podrían estar de acuerdo con Merrifield *et al.* (2010c) que sugieren que los parámetros hematológicos pueden variar como

una respuesta específica para cada especie ante el uso de probióticos. Dado el poco conocimiento sobre *Dormitator latifrons* en sistemas de cultivo, nuestros hallazgos son resultados preliminares, por lo que recomendamos incluir en futuras investigaciones parámetros hematológicos que evalúen estrés (cortisol, glucosa), respuesta inmune (conteo de eritrocitos y linfocitos) y respuesta metabólica (creatinina), lo que permitiría dar resultados más concluyentes.

En este estudio no se observaron diferencias significativas entre tratamientos respecto al largo de las vellosidades, probablemente debido al corto tiempo de experimentación (tres semanas). Los análisis histológicos para evaluar el efecto de probióticos en el tamaño de las vellosidades intestinales han sido ampliamente utilizados en otras especies de peces como truchas (Harper *et al.*, 2011; Gisbert, 2013) y tilapias (Mello *et al.*, 2013; Reda & Selim, 2015; Ramos *et al.*, 2017), con tiempos de experimentación que variaron entre cinco y nueve semanas. Por ejemplo, Merrifield *et al.* (2010b) demostraron que el uso de *Pediococcus acidilactici* como probiótico en truchas *Oncorhynchus mykiss* aumenta la altura de las microvellosidades en un tiempo de cinco semanas; mientras que Elsabagh *et al.* (2018) reportó que el uso de alimento enriquecido con probióticos comerciales produjo un incremento significativo del largo intestinal y de las vellosidades en Tilapias *Oreochromis niloticus* al cabo de 10 semanas de experimentación. Los resultados de este estudio muestran una tendencia a que los organismos tratados con probióticos tengan vellosidades intestinales más largas que los organismos no tratados, lo cual podría corroborarse ampliando el tiempo de experimentación dado que los cambios histológicos necesitan períodos de tiempo más largos para manifestarse que los cambios bioquímicos o los parámetros sanguíneos (Nayak, 2010). El aumento en la altura de las vellosidades implica un aumento de la superficie que mejora la absorción de los nutrientes, lo que se traduce en un incremento en peso o en talla (Caspary 1992, Gisbert, 2013). Esta podría ser la explicación a que el tratamiento 1 nos solo muestre una tendencia a mayor tamaño de las vellosidades intestinales sino también a un mayor incremento en peso de los organismos. Sin embargo, se necesitará reproducir el experimento incrementando el tiempo de aplicación de probióticos para demostrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos a un tiempo mayor de exposición.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados demostraron que la suplementación dietética con cepas de Bacillus probiótico del T1, con 2×10^9 UFC/g tuvo una mejor tendencia en la ganancia de peso, mejorando también ciertos marcadores fisiológicos y de respuesta inmune de manera particular en la hemoglobina, hematocrito, monocitos y linfocitos. Además, de mejorar la altura de las vellosidades en el intestino del pez.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de investigación “Aspectos biológicos del chame (*Dormitator latifrons*) en ambientes naturales y de producción” financiado por la UTM. A Byron Reyes Mero y Leonela Muñoz Chumo por su apoyo con los análisis de laboratorio.

REFERENCIAS

- Álvarez D. (2014). Suplementación de diferentes niveles de probióticos (*Lactobacillus* sp) en la ración, sobre los parámetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos y zootécnicos de alevines de paiche (*Arapaima gigas*, cuvier). Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Perú. pp:98.
- Caspary W. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55:299S-308S.
- Centeno A., Reyes J. (2009). Enfermedades del chame (*Dormitator latifrons*) en cultivo. Tesis de pregrado, Escuela de Acuicultura y Pesquería, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Ecuador. pp:150.
- Csirke B. (1980). Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. (N° 192). Manual Técnico de la FAO. Roma, Italia. pp: 82.

- Delgadillo A., Martínez C., Berruecos J., Ulloa R., López R., Vásquez C. (2012). Caracterización de la curva de crecimiento en dos especies de pez blanco *Chirostoma estor*, *C. promelas* y sus híbridos. *Veterinaria México*, 43:113-121.
- Elsabagh, M., Mohamed R., Moustafa, E., Hamza A., Farrag, F., Decamp O., Dawood M., Eltholth, M. (2018). Assessing the impact of Bacillus strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture nutrition*, 24:1613-1622.
- FAO (2011). Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo. ISBN 978-92-5-306658-2, pp:63-70. <http://www.fao.org/3/i1773s/i1773s00.htm>.
- Freire L. (2001). Enfermedades del Chame. *Revista Raíces Productivas*, 44:32-33.
- Froese R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:241-253. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>.
- Gisbert E., Castillo M., Skalli A., Andree K., Badiola I. (2013) *Bacillus cereus* var. toyoi promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91:2766–2774.
- Harper G., Saoud I., Emery M., Mustafa S., Rawling M., Eynon B., Davies S., Merrifield D., Monfort M. (2011) An ex vivo approach to studying the interactions of probiotic *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio (Listonella) anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Aquaculture Research and Development* S1(4):2-6. DOI: <https://doi.org/doi:10.4172/2155-9546.S1-004>.
- Humason G. (1979). Animal tissue techniques, 4th Edition. San Francisco, Estados Unidos. pp: 661.
- Lara F., Escobar L., Olvera M. (2002). Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). (en línea). Mérida Yucatán, MX. Consultado 09 mayo 2019. Disponible en: http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VI/archivos/A22.pdf.
- Malachowski E., Romanowsky D. (1890). On the question of the structure of malaria parasites. *Vrach* 11: 1171-1173. [http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky1\(orig\).pdf](http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky1(orig).pdf) (accessed January 2019) [Russian]; [http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky/romanowsky1\(en\).pdf](http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky/romanowsky1(en).pdf)
- Martínez D. (2011). Efectos de la administración del probiótico *Shewanella pdp 11* en juveniles de lenguado senegalés (*Solea Senegalensis*, Kaup 1858) y desarrollo de un método para su microencapsulación. Tesis de pregrado, Universidad de Almería. pp:98.
- Martínez T. (2012). Manual de prácticas de laboratorio “Biometría Hemática”. México, México. pp:57.
- Mello H., Moraes J., Niza I., Moraes F., Ozório R., Shimada M., Filho E., Jair R., Claudiano G. (2013). Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33:724–730. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>.
- Merrifield D., Bradley G., Baker R., Dimitroglou A., Davies S. (2010a) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition, Early View*. 16(5):504-510. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x>.
- Merrifield D., Harper G., Dimitroglou A., Ringø E., Davies S. (2010b). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, 41:1268-1272.
- Merrifield D., Bradley G., Baker R., Davies S. (2010c). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, 16:496-503.

- Nayak S. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:2–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- Nutrivet. (2009). (Nutrición Veterinaria, GT) información técnica del *Bacillus subtilis* y del producto BIOTEC Guatemala, GT, Nutrivet (trifolio).
- Raida M., Larsen J., Nielsen M., Buchmann K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish diseases*, 26:495–498.
- Ramos M., Batista S., Pires M., Silva A., Pereira L., Saavedra M., Ozório R., Rema P. (2017). Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *Animal*, 11: 1259–1269. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731116002792>.
- Reda R., Selim K. (2015). Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 23:203–217. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9809-z>.
- Zar J. (2010). *Biostatistical Analysis* (5th ed. pp:994) Englewood Cliff, NJ: Prentice Hall.

Recibido: 19-11-2019
Aprobado: 16-01-2020
Versión final: 26-02-2020

