

**Uso de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorula* sp.
como promotores de crecimiento en alevines
de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*)**

Tulfo Gabriel Marcillo Moreira

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Uso de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorula* sp.
como promotores de crecimiento en alevines
de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Tulfo Gabriel Marcillo Moreira

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Uso de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorula* sp. como promotores de crecimiento en alevines de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*)

Tulfo Gabriel Marcillo Moreira

Resumen. La implementación de promotores de crecimiento está teniendo auge en investigaciones como probióticos en animales. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de dos promotores de crecimiento sobre los parámetros de sobrevivencia, biomasa, peso por alevín, ganancia diaria de peso e índice de conversión alimenticia. La investigación se llevó a cabo en Zamorano, Honduras y duró 30 días en los que se administraron los promotores de crecimiento mezclados con el concentrado de 45% de proteína cruda. Se obtuvo, en la mezcla de concentrado con *Rhodotorula* sp. 1.85×10^8 UFC/g y con *B. subtilis* 2.25×10^8 UFC/g de alimento respectivamente. Se utilizó una densidad de 700 alevines por tanque. El análisis se hizo con un diseño completo al azar con medidas repetidas en el tiempo. Los tratamientos fueron: tratamiento uno, control, el cual consistió únicamente del alimento convencional si ningún tipo de aditivo, dos, Alimento + *Rhodotorula* sp. y tres, Alimento + *B. subtilis*. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. Los parámetros de calidad de agua fueron excelentes. El tratamiento de control mostro los mejores resultados, siendo superior en cada parámetro evaluado en comparación con los tratamientos dos y tres. A excepción del índice de conversión alimenticia donde el promedio acumulado muestra que el tratamiento de control no tuvo diferencia significativa comparado con el tratamiento de Alimento + *Rhodotorula* sp. Bajo las condiciones del estudio, al incluir la levadura *Rhodotorula* sp. o la bacteria *B. subtilis* se reducen los parámetros productivos de los alevines comparado con la dieta convencional.

Palabras clave: Bacteria, cíclido, levadura, probiótico.

Summary. The implementation of growth promoters is booming in animal probiotic investigations. The objective of this study was to evaluate the effect of two growth promoters on the parameters of survival, biomass, weight per fingerling, daily weight gain and feed conversion rate. The research took place in Zamorano, Honduras and lasted 30 days in which growth promoters were administered mixed with the 45% crude protein feed. The feed had a concentration with *Rhodotorula* sp. of 1.85×10^8 CFU / g and with *B. subtilis* 2.25×10^8 CFU / g respectively after the mixture. Seven hundred fingerlings were used per tank. The statistical analysis was done with a randomized complete design with repeated measurements over time. The treatments were; treatment one, control, which consisted only of the conventional feed with no additive, two, Feed + *Rhodotorula* sp. and three, Feed + *B. subtilis*. Each treatment had three replicates. The water quality parameters were excellent. The control treatment showed the best results, being higher in each parameter evaluated compared to treatments two and three. With the exception of the feed conversion rate where the accumulated average shows that, the control treatment had no significant difference compared to the treatment of Feed + *Rhodotorula* sp. Under the conditions of the study, when including the yeast *Rhodotorula* sp. or the bacterium *B. subtilis*, it reduces the productive parameters of the fingerlings compared to the conventional diet.

Key words: Bacteria, cichlid, probiotic, yeast.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	11
5. RECOMENDACIONES	12
6. LITERATURA CITADA.....	13
7. ANEXOS	15

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Parámetros de calidad de agua medidos con los promotores de crecimiento en tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	7
2. Datos de SB (%) de los alevines de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) obtenidos en los tres tratamientos.....	8
3. Comparación de BM en gramos obtenida por los alevines de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) durante los 30 días con los promotores de crecimiento...	8
4. Comparación de PPA de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) en gramos obtenida con los promotores crecimiento en los respectivos tratamientos.....	9
5. Comparación de ganancia GDP medida en gramos utilizando alimento comercial y alimento comercial más los microorganismos en alevines de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	10
6. Comparación de ICA registrada durante los 30 días con los promotores de crecimiento en alevines de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	10
Anexos	Página
1. Presencia de microorganismos en el alimento.....	15
2. Presencia de microorganismos en el intestino de los alevines.....	15
3. Cuadro de análisis de contenido intestinal de los alevines de tilapia gris (<i>O. niloticus</i>) 18 horas posalimentación.....	16
4. Cuadro de componentes de medio líquido para <i>Rhodotorula</i> sp.....	16
5. Cuadro de componentes de medio líquido para <i>Bacillus subtilis</i>	16

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es la acción de cultivar organismos acuáticos en las costas de los mares, en lagunas naturales o artificiales, ríos y estructuras artificiales. Realizar acuicultura implica la intervención de la mano del hombre en los procesos de crianza con la finalidad de aumentar la producción reduciendo el tiempo de crianza, para obtener rendimientos por encima de lo que se produciría naturalmente. En los últimos años la acuicultura ha tenido gran auge, gracias a esto representa cerca del 50% de la producción pesquera destinada a la alimentación mundial. En los años 70, gracias a la acuicultura se produjeron cerca de 3 millones de toneladas de peces, ya para el año 2015 se registraron 76.6 millones de toneladas, que fueron valoradas en 157,900 millones de dólares (FAO 2017). Tan solo en Honduras, en el año 2016 se exportaron más de 20 millones de libras de tilapia que generaron más de 60 millones de dólares en divisas. Esto coloca a Honduras como el líder a nivel de Latinoamérica en exportar tilapia a los mercados de Estados Unidos. Este rubro es tan importante que en producciones industriales y semiindustriales generan 6 mil puestos de empleo teniendo al Lago de Yojoa como uno de los principales productores con más 594 jaulas flotantes repartidas en 24 hectáreas (Secretaría de Agricultura y Ganadería Honduras 2017).

La tilapia es originaria de África, se desarrolla muy bien en aguas cálidas y son muy adaptables a condiciones de producción intensiva. Al ser una especie muy fácil de cultivar ha tenido un gran impacto en la economía de cerca de 85 países alrededor del mundo, en especial en América Latina. Se caracterizan por ser una especie muy resistente a enfermedades, su fácil y rápida reproducción hace que su tasa de supervivencia sea alta aun si el medio en el que se desarrollan presenta niveles bajos de oxígeno. La reproducción, en su medio natural puede variar de acuerdo a las especies; en las especies que pertenecen al género de *Oreochromis* (*O. aureus*, *O. mossambicus* y *O. niloticus*) el macho se encarga de fertilizar a los huevos depositados por la hembra en el suelo, una vez que han sido fertilizados la hembra los recoge y los incuba en la boca. En la producción de tilapia hay que tener cuidado en el manejo para evitar la sobrepoblación y por ende la competencia por espacio y alimento (Mundo Acuícola 2008).

La tilapia gris o tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) tiene sus inicios en el antiguo Egipto con pruebas que datan de tumbas egipcias de hace 4000 años de antigüedad, en donde las cultivaban en forma ornamental. De las tilapias del género *Oreochromis*, la que se distribuyó alrededor del mundo por los años 1940 y 1950 fue la *Oreochromis mossambicus*. Por otro lado, la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) no fue diseminada sino hasta 1960 y mantuvo gran auge hasta 1980. Fue introducida de Japón a Tailandia en 1965 y en el mismo año fue llevada hasta Filipinas. A Brasil llegó por parte de Costa de Marfil en 1971 y posteriormente sería llevada a Estados Unidos cuatro años después. A

China llegó en el año 1978 y desde entonces se ha mantenido a la cabeza como el principal productor a nivel mundial (FAO 2017).

La alimentación es una parte fundamental en toda producción animal, por este motivo se han realizado muchas investigaciones para que el alimento sea aprovechado en su totalidad en el intestino de los animales. Por ende, las investigaciones apuntan al desarrollo de alimentos con diferentes características o a la introducción de algún tipo de microorganismo benéfico.

Los promotores de crecimiento o probióticos fueron definidos en 1989 por Roy Fuller, quien dijo que para que un microorganismo sea considerado probiótico debía presentarse en estado viable. Fue de allí donde se originó la idea de que podían presentar beneficios para la salud del huésped. También se los define como “*Microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando se los administra en cantidades adecuadas*” (World Gastroenterology Organisation 2011). Los probióticos, al ser microbios vivos, se pueden agregar en la formulación de alimentos, medicamentos y suplementos de dieta. Dentro de las especies más utilizadas como probióticos están los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* e incluso se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y también algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* (World Gastroenterology Organisation 2011).

En el caso de las levaduras, la *Rhodotorula* no ha tenido mucha importancia como probiótico. Sin embargo, al aislar el contenido estomacal del salmón del atlántico (*Salmo salar*) se encontró que existe presencia de dos especies de *Rhodotorula* como son la *Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula glutinis*, entre otras especies de levaduras (Ochoa y Velázquez Juárez 2004). La *Rhodotorula*, en específico *Rhodotorula* sp., junto a microalgas, ciliados, rotíferos, nemátodos y bacterias se encuentran dentro de la microfauna de lo que se conoce como biofloc que es una mezcla de componentes que generan una alta relación de carbono: nitrógeno en el agua. El biofloc es una técnica de producción acuícola intensiva que ahorra agua y alimento para los productores y la *Rhodotorula* sp. es uno de los microorganismos encontrados en el muestreo y aislamiento del flóculo de biofloc (Monroy Dosta *et al.* 2013).

Otro de estos microorganismos benéficos es la bacteria *Bacillus subtilis*, con la que se han desarrollado investigaciones en aves y se ha demostrado que al asociarse con otras especies de bacterias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* tienen un aspecto positivo en los procesos digestivos del intestino (Milián *et al.* 2008). Otra investigación demuestra que al utilizar probióticos como *B. subtilis* en la alimentación para cerdas gestantes mejora el peso de los lechones al nacimiento y reduce la incidencia de diarreas al momento del destete (Lázaro *et al.* 2005). No solo en animales terrestres se aplica probióticos, también se utiliza en la producción acuícola. Uno de los rubros acuícolas en los que se ha utilizado *B. subtilis* como probiótico es en la producción de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) obteniendo como resultado un incremento en el peso promedio de los animales que se les suministró alimento con *B. subtilis* (Corrales Suazo 2015).

- El objetivo de este estudio fue comparar la eficiencia de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorula* sp. como promotores de crecimiento en tilapia gris (*O. niloticus*) sobre la sobrevivencia, biomasa, peso por alevín, ganancia diaria de peso e índice de conversión alimenticia.

2. METODOLOGÍA

Laboratorio. La investigación dio inicio en el laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. En el laboratorio se contó con el equipo y las instalaciones para la reproducción de los microorganismos destinados a la investigación los cuales fueron una cepa de levadura *Rhodotorula* sp. y una cepa de bacteria *Bacillus subtilis* respectivamente. La reproducción inició en placas Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA por sus siglas en inglés).

Al comprobarse la pureza de los microorganismos en las placas Petri, se procedió a inocularlos en un medio líquido con componentes específicos para levaduras y bacterias respectivamente. En el medio ocurrió fermentación líquida. Este proceso duró 72 horas en una mesa orbital a 210 revoluciones por minuto (RPM).

Finalizado el proceso de fermentación se realizó un control de calidad en una cámara de Neubauer. El control de calidad se realizó utilizando la relación 1:10 (1 ml de solución: 10 ml de agua) para análisis de diluciones sólidas y líquidas elaborado por Arana *et al.* (2011). En *Rhodotorula* sp. se obtuvo una concentración de 4.1×10^8 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias) de solución. En el caso de *B. subtilis*, la concentración encontrada fue de 6.15×10^8 UFC/ml de solución. En dos libras de concentrado para alevines se mezclaron 300 ml de solución de *Rhodotorula* sp. Se realizó el mismo proceso para *B. subtilis*.

La mezcla pasó por un proceso de secado y posteriormente molida. Después de la molienda se tomó 1 g de la mezcla de *Rhodotorula* sp. y 1 g de mezcla de *B. subtilis*. Cada muestra fue diluida en un matraz con 100 ml de agua para realizar el segundo control de calidad. El control realizado para el concentrado se hizo con la relación 1:100 (1 gramo de concentrado: 100 ml de agua) (Arana *et al.* 2011). Los resultados de la cámara de Neubauer mostraron que la concentración de *Rhodotorula* sp. fue de 1.85×10^8 UFC/g de alimento y para *B. subtilis* fue de 2.25×10^8 UFC/g de alimento. Cuando se finalizó este proceso, las mezclas fueron introducidas en un cuarto frío a 5 °C para preservarlas.

Unidades de Producción. Se utilizaron nueve tanques de fibra de vidrio con una capacidad de 0.27 m³ cada una. El agua que se utilizó para llenar los tanques proviene de la laguna de Monte Redondo, reservorio que abastece a la unidad de acuicultura. Los tanques fueron puestos dentro de un invernadero para evitar la depredación de los alevines por la presencia de aves.

Peces. Los alevines usados en este estudio fueron producidos en la Unidad de Acuicultura “Daniel E. Meyer” y se usaron 700 alevines de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) por

tanque. La siembra se hizo después de que los alevines salieron del proceso de reversión sexual, el cual tiene una duración de 28 días. Los alevines fueron pesados antes de liberarlos a cada uno de los tanques del estudio.

Alimentación. El alimento utilizado en el experimento es de la marca ALCON con una dieta comercial de 45% de proteína cruda (PC), que se utiliza normalmente en la unidad acuícola de Zamorano durante la etapa de alevín de los peces. Se alimentaron por un lapso de 30 días con las dietas correspondientes a cada pila la cual se calculó para el día uno del experimento con la fórmula indicada en la ecuación 1. Dicha fórmula es utilizada en la unidad de acuicultura para calcular la cantidad de alimento a aplicar a los peces. La cantidad de alimento suministrada se basó en un porcentaje de biomasa realizando dos alimentaciones por día, por lo que la ración se hizo una vez en la mañana entre (9:00 am) y una en la tarde (14:00 pm). Una vez realizado el primer muestreo a los 10 días después de la siembra se volvió a calcular la cantidad de alimento a aplicar a los alevines a partir del día 11. Esto repitió para la segunda toma de datos y se aplicó las nuevas dosis a partir de los 21 días.

$$P_i \times 0.05 \times n = C_d \quad [1]$$

P_i: Peso inicial por pez (alevín)

0.05: Representa el 5% del peso de cada alevín

n: Número total de peces (alevines) por tanque

C_d: Cantidad de alimento (g/día)

Unidades experimentales. Las unidades experimentales fueron nombradas de la siguiente manera: tratamiento uno o control (CT), tratamiento dos, Alimento + *Rhodotorula* sp. (RD) y tratamiento tres, Alimento + *B. subtilis* (BS). Cada tratamiento constó de tres repeticiones y estuvieron comprendidos por dos libras del concentrado de 45% de PC. El tratamiento uno (CT) el cual fue el tratamiento de control, se alimentó únicamente con concentrado sin ningún tipo de suplemento o aditivo. Las dos libras del tratamiento dos (RD) fueron mezcladas con 300 ml de solución de *Rhodotorula* sp. en el cual la concentración de microorganismos final fue de 1.85×10^8 UFC/g en el alimento seco. De la misma forma, las dos libras de concentrado para el tratamiento tres (BS) también fueron mezcladas con 300 ml de solución de *B. subtilis* obteniendo una concentración de 2.25×10^8 UFC/g en el alimento seco.

Muestreo. Para el muestreo se realizó un conteo de 25% de los peces (175 peces/tanque), contados individualmente y pesados en una báscula Ohaus ES100L. Para evitar más estrés en los peces, al momento de los muestreos se realizaron recambios de agua a los tanques. Dicho procedimiento se realizó cada 10 días. En las fechas establecidas para los muestreos, realizados en la mañana, no se alimentó a los peces para reducir el estrés por manipulación. Sin embargo, por la tarde se les aplicó normalmente la dosis de alimento a cada tanque y se observó que los alevines consumieron el alimento normalmente.

Diseño Experimental. En el experimento se utilizó un diseño completo al azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo, donde los factores principales fueron los tres tratamientos y las tres repeticiones de cada uno. Las variables medidas fueron: sobrevivencia (SB),

biomasa (BM), peso por alevín (PPA), ganancia de peso diaria (GPD) e índice de conversión alimenticia (ICA). Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA), el cual se hizo con el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS® 9.4 2013), con una probabilidad exigida de $P \leq 0.05$ y para la separación de medias se utilizó una prueba de Duncan.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad de agua. A lo largo de la investigación se midieron los parámetros de calidad de agua (Cuadro 1). La temperatura (T°) promedio del agua de los tanques se mantuvo dentro del rango óptimo para la producción de tilapia según el manual de manejo de cultivo de tilapia elaborado por Saavedra Martinez (2006), el cual indica que el rango óptimo es desde los 25 °C hasta los 32 °C. El oxígeno disuelto (OD) en el agua también se mantuvo dentro de los rangos óptimos para la tilapia establecidos por Saavedra Martinez (2006), los cuales no deben ser menores a 5mg/L ni mayor a 9 mg/L. Según Alcántar Vázquez *et al.* (2014) los rangos ideales de amonio en el agua pueden ser menores a tres (<3), sin embargo, en los tanques donde se estableció la investigación el promedio de amonio fue de 2.61 mg/L, por lo que no se observó incremento en mortalidad ni reducción de apetito. El pH promedio también se mantuvo dentro de los rangos establecidos por Saavedra Martinez (2006), donde indica que los valores correctos deben ir entre 6.0-9.0.

Cuadro 1. Parámetros de calidad de agua medidos con los promotores de crecimiento en tilapia gris (*Oreochromis niloticus*).

Parámetros	Máximo	Mínimo	Promedio
Temperatura (°C)	28.90	28.40	28.70
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.64	6.34	6.41
Amonio (mg/L)	3.50	2.00	2.61
pH	8.20	6.80	7.82

Sobrevivencia (SB). Durante el ensayo, los valores de sobrevivencia fueron muy buenos (Cuadro 2). Sin embargo, se observa que en el primer muestreo (día 10) los tres tratamientos muestran diferencia significativa siendo el tratamiento de control (CT) el que mostró mejor sobrevivencia (100%). Para el segundo y tercer muestreo (día 20 y día 30) ya no se observa diferencia significativa entre el tratamiento de Alimento + *Rhodotorula* sp. y el tratamiento de Alimento + *B. subtilis*. El tratamiento control siguió mostrando mejor sobrevivencia. El promedio de sobrevivencia del tratamiento control (CT) fue del 100%. Estos datos están por encima de los reportados por Corrales Suazo (2015), donde su promedio de sobrevivencia del tratamiento control en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) en condiciones similares de investigación fue de 99%. En el tratamiento de Alimento + *Rhodotorula* sp. (RD), la sobrevivencia promedio fue de 97%. Este promedio fue menor al reportado por Patt Sibaja (2015), quien en su estudio probó 14 cepas de microorganismos (seis cepas de bacterias y ocho cepas de levaduras) dentro de las cuales se encontraba una cepa del género *Rhodotorula* y la sobrevivencia registrada fue de 98%. Dicho estudio fue realizado en larvas de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Patt Sibaja 2015). El promedio de sobrevivencia del

tratamiento de Alimento + *B. subtilis* (BS) fue de 98%. Este resultado fue menor al reportado por Corrales Suazo (2015), dado que en su investigación la sobrevivencia del tratamiento de Alimento + *B. subtilis* en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) fue de 99% (Corrales Suazo 2015). En las condiciones en las que se manejaron los alevines, el estrés a la manipulación durante el transporte y la siembra pudieron haber sido los factores que infirieron en la sobrevivencia.

Cuadro 2. Datos de SB (%) de los alevines de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) obtenidos en los tres tratamientos.

Tratamientos	Días de muestreo			Promedio
	10	20	30	
Control	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Alimento + <i>Rhodotorula</i> sp.	97 ^b	97 ^b	96 ^b	97 ^b
Alimento + <i>B. subtilis</i>	98 ^c	97 ^b	97 ^b	98 ^b
Probabilidad				< 0.0001
Coeficiente de Variación (%)				0.75

ab – columnas con letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Biomasa. En la biomasa (Cuadro 3), en los tres muestreos realizados (días 10, 20 y 30) sí hubo diferencia significativa en el promedio entre el tratamiento de control (CT) comparado con el tratamiento de Alimento + *Rhodotorula* sp. (RD) y el tratamiento de Alimento + *B. subtilis* (BS). Pero los tratamientos RD y BS no muestran diferencia significativa en las fechas en las que se realizaron los muestreos. Le promedio registrado muestra que durante todo el ensayo si hubo diferencia significativa entre el tratamiento CT y los tratamientos de RB y BS respectivamente. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Corrales Suazo (2015) quien menciona que no encontró diferencia significativa entre el tratamiento control y el de Alimento + *B. subtilis* en el tiempo que duró su investigación con los probióticos (Corrales Suazo 2015). Al realizar el segundo muestreo en el día 20 de la investigación, los tres tratamientos mostraron un incremento considerable en la biomasa. Pero, al realizar el tercer muestreo (día 30), la biomasa obtenida por los alevines del tratamiento RD fue menor que el tratamiento de CT y el de BS.

Cuadro 3. Comparación de BM en gramos obtenida por los alevines de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) durante los 30 días con los promotores de crecimiento.

Tratamientos	Días de muestreo			Promedio
	10	20	30	
Control	600.00 ^a	817.33 ^a	906.67 ^a	774.67 ^a
Alimento + <i>Rhodotorula</i> sp.	140.00 ^b	264.00 ^b	293.33 ^b	232.44 ^b
Alimento + <i>B. subtilis</i>	140.00 ^b	242.67 ^b	406.67 ^b	263.11 ^b
Probabilidad				< 0.0001
Coeficiente de variación (%)				11.55

ab – columnas con letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Peso por alevín (PPA). Este parámetro (Cuadro 4) muestra que sí hubo diferencia significativa entre el tratamiento de Control (CT) y los tratamientos Alimento + *Rhodotorula* sp. (RD) y Alimento + *B. subtilis* (BS) registrados en los días de cada muestreo (día 10, 20 y 30). El promedio muestra que si hubo diferencia significativa entre el tratamiento CT y los tratamientos RD y BS. Estos datos no concuerdan con los encontrados por Corrales Suazo (2015), donde menciona que en su investigación no tuvo diferencia significativa entre el tratamiento de control y el tratamiento de Alimento + *B. subtilis* (BS) (Corrales Suazo 2015). Pero no hubo diferencia significativa entre los tratamientos de RD y BS respectivamente. La mayor ganancia de peso de los tres tratamientos se vio entre el día 10 y el día 20 del muestreo. Al realizarse el tercer muestreo (día 30), el tratamiento que mostró un incremento mayor de peso de los alevines fue el tratamiento de BS.

Cuadro 4. Comparación de PPA de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) en gramos obtenida con los promotores crecimiento en los respectivos tratamientos.

Tratamientos	Días de muestreo			Promedio
	10	20	30	
Control	0.9 ^a	1.2 ^a	1.3 ^a	1.1 ^a
Alimento + <i>Rhodotorula</i> sp.	0.2 ^b	0.4 ^b	0.4 ^b	0.3 ^b
Alimento + <i>B. subtilis</i>	0.2 ^b	0.4 ^b	0.6 ^b	0.4 ^b
Probabilidad				< 0.0001
Coeficiente de variación (%)				12.03

ab – columnas con letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.05$)

Ganancia diaria de peso (GDP). En la GDP (Cuadro 5), el tratamiento que mostro mayor promedio fue el control (CT). Por lo tanto, sí hubo diferencia significativa entre el tratamiento CT y los tratamientos de Alimento + *Rhodotorula* sp. (RD) y Alimento + *B. subtilis* (BS) respectivamente. Se realizó el primer muestreo (día 10) y la GDP en los tratamientos de RD y BS fue igual durante los 10 días. Al realizar el segundo muestreo de los alevines (día 20), los tratamientos de RD y BS no mostraron diferencia significativa en la GDP, siendo estas similares. En el tercer muestreo (día 30) el tratamiento BS tuvo un incremento mínimo (0.02 g) en comparación al tratamiento RD, en el que la GDP fue similar al de los días desde el 20 hasta el día 30 del tratamiento. Tampoco se observó diferencia significativa en estos dos tratamientos. Sin embargo, el promedio registrado indica que si hubo diferencia entre el tratamiento de CT y los tratamientos de RD y BS. Pero los tratamientos de RD y BS no muestran diferencia significativa.

Cuadro 5. Comparación de ganancia GDP medida en gramos utilizando alimento comercial y alimento comercial más los microorganismos en alevines de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*).

Tratamientos	Días de muestreo			Promedio
	10	20	30	
Control	0.09 ^a	0.12 ^a	0.13 ^a	0.11 ^a
Alimento + <i>Rhodotorula</i> sp.	0.02 ^b	0.04 ^b	0.04 ^b	0.03 ^b
Alimento + <i>B. subtilis</i>	0.02 ^b	0.04 ^b	0.06 ^b	0.03 ^b
Probabilidad				< 0.0001
Coeficiente de variación (%)				11.50

ab – columnas con letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Índice de Conversión Alimenticia (ICA). El ICA (Cuadro 6), se esperaba que se redujera en cada toma de datos. Sin embargo, el tratamiento control (CT) fue el único que se redujo durante el ensayo. El tratamiento de Alimento + *Rhodotorula* sp. (RD) se registró un ICA bajo (<1) en el día del primer muestreo (día 10). Para el segundo muestreo realizado en el día 20 de la investigación se encontró un ICA alto (>1), pero, para la última toma de datos realizada en el día 30 el ICA fue igual al del control CT. Ocurrió algo similar desde el día 10 al día 20 en el tratamiento de Alimento + *B. subtilis* (BS) con la diferencia de que en este tratamiento al día 30 el ICA estuvo por encima de 1 (>1). A lo largo de la investigación no se observó diferencia significativa entre los tres tratamientos. Pero, el ICA promedio entre los tratamientos de RD y BS no presentaron diferencia significativa, y el tratamiento de CT y el de BS sí hubo diferencia significativa siendo el tratamiento CT el más efectivo. Estos datos no concuerdan con lo reportado por Corrales Suazo (2015) ya que en su investigación muestra que no hubo diferencia significativa entre el tratamiento control y Alimento + *B. subtilis* (Corrales Suazo 2015).

Cuadro 6. Comparación de ICA registrada durante los 30 días con los promotores de crecimiento en alevines de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*).

Tratamientos	Días de muestreo			Promedio
	10	20	30	
Control	0.77	0.73 ^a	0.22 ^a	0.57 ^a
Alimento + <i>Rhodotorula</i> sp.	0.60	1.78 ^b	0.22 ^a	0.86 ^{ab}
Alimento + <i>B. subtilis</i>	0.61	1.49 ^b	1.30 ^b	1.13 ^b
Probabilidad				< 0.0004
Coeficiente de variación (%)				30.73

ab – columnas con letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.05$)

4. CONCLUSIÓN

- Bajo las condiciones del estudio, al incluir la levadura *Rhodotorula* sp. o la bacteria *B. subtilis* no se mejoran los parámetros productivos de los alevines comparado con la dieta convencional.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un nuevo estudio utilizando *Rhodotorula* sp. y *B. subtilis* en diferentes concentraciones (altas y bajas) a las que se evaluaron en esta investigación y volver a medir los parámetros establecidos.
- Utilizar otros microorganismos con características probióticas como levaduras del género *Saccharomyces* y *Kluyveromices* y bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

6. LITERATURA CITADA

- Alcántar Vázquez JP, Santos Santos C, Moreno de la Torre R, Antonio Estrada C. 2014. Manual para la producción de supermachos de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). UNPA-PIFI, Oaxaca. México. 81 p.
- Arana I, Orruño M, Barcina I. 2011. Diluciones y concentraciones. Guía práctica, España: Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología, 1-11. https://ocw.ehu.es/pluginfile.php/1654/mod_resource/content/1/Tema_1._Diluciones_y_concentraciones.pdf.
- Corrales Suazo CM. 2015. Uso de promotores de crecimiento *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* en el alimento de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 17 p.
- FAO. 2017. Acuicultura: Desarrollo de la acuicultura [internet]. Roma: FAO; [consultado 2017 sep 22]. <http://www.fao.org/aquaculture/es/>.
- FAO. 2017. Programa de información de especies acuáticas *Oreochromis niloticus* [internet]. Roma: FAO; [consultado 2017 sep 22] http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es.
- Lázaro CD, Carcelén F, Torres M, Ara M. 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. Rev Inv Vet Perú 16(2):97-102.
- Milián G, Pérez M, Bocourt R. 2008. Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp y de sus endosporas en la producción avícola. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 42(2): 1-7.
- Monroy-Dosta MC, De Lara-Andrade R, Castro-Mejía R, Castro-Mejía G, Coelho-Emerenciano MG. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. Revista de Biología Marina y Oceanografía 48(3): 511-520.
- Mundo Acuícola. 2008. Antecedentes de la especie del futuro [internet]. Puerto Montt: Mundo Acuicola; [consultado 2017 sep 22] <http://www.mundoacuicola.cl/index.php?/revista/118/-antecedentes-de-la-especie-del-futuro-/2>.

- Ochoa JL, Velázquez Juárez R. 2004. Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Universidad y Ciencia* 1: 39-50.
- Patt Sibaja MC. 2015. Selección de un consorcio microbiano probiótico para el cultivo larvario del ostión japonés *Crassostrea gigas* [Tesis]. Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S.-Mexico. 83 p.
- Rodríguez Ogliastri JE. 2011. Aislamiento e identificación de microorganismos con presuntivo potencial probiótico a partir de heces de animales de producción industrial [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia. 42 p.
- Saavedra Martínez MA. 2006. Manejo de cultivo de tilapia. Managua, Nicaragua, USAID. 24 p.
- Secretaría de Agricultura y Ganadería Honduras. 2017. Productores de tilapia potenciarán producción y consumo [internet]. Tegucigalpa: SAG; [consultado 2017 sep 22] <http://www.sag.gob.hn/sala-de-prensa/noticias/ano-2017/enero-2017/productores-de-tilapia-potenciaran-produccion-y-consumo/>.
- World Gastroenterology Organisation. 2011. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. Milwaukee, Estados Unidos, WGO. 29 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Presencia de microorganismos en el alimento. Después de finalizada la investigación (día 30) se tomó 1 g de alimento del tratamiento Alimento + *Bacillus subtilis* y 1 g de alimento del tratamiento Alimento + *Rhodotorula* sp. Las muestras fueron llevadas al laboratorio y diluidas en 100 ml de agua utilizando el mismo procedimiento del control de calidad.

Para la mezcla de Alimento + *Rhodotorula* sp. la concentración encontrada fue de 1.4×10^8 UFC/g de alimento. En la muestra de Alimento + *B. subtilis* la concentración fue de 1.7×10^8 UFC/g de alimento.

Anexo 2. Presencia de microorganismos en el intestino de los alevines. Para este análisis se seleccionaron cinco ejemplares de alevines de cada tanque de la investigación. Los peces seguían siendo alimentados con la dieta correspondiente a cada tanque. Para esta evaluación no se alimentó a los peces por un lapso de 24 horas. Los ejemplares seleccionados fueron llevados al laboratorio y diseccionados en condiciones asépticas. Se extrajo todo el tracto digestivo, se lo pesó y se lo diluyó en agua pectonada. Para este proceso se utilizó una relación de 10:90 (10 g de intestino de peces:90 ml de agua pectonada), proceso utilizado por Rodríguez Ogliastri (2011) en su trabajo de grado.

Se realizó la inoculación en placas Petri con medio PDA y por método de vaciado en placa. Los parámetros medidos fueron ausencia o presencia de *Rhodotorula* sp. y *Bacillus subtilis* respectivamente (Anexo 2). Las placas inoculadas se llevaron a la incubadora y se esperó 48 horas para observar formación de colonias. Para este proceso se realizaron seis diluciones en tubos de ensayo de los cuales las inoculaciones se las hizo de los tubos cinco y seis.

Cuadro de análisis de contenido intestinal de los alevines de tilapia gris (*O. niloticus*) 24 horas posalimentación.

Diluciones	Microorganismos	
	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>
Placa 5	A	P
Placa 6	A	P

A – denota ausencia y P – denota presencia

Se realizó un segundo análisis (Anexo 3) con el mismo procedimiento que el primero, con la diferencia que para este análisis los alevines no fueron alimentados por 18 horas.

Anexo 3. Cuadro de análisis de contenido intestinal de los alevines de tilapia gris (*O. niloticus*) 18 horas posalimentación.

Diluciones	Microorganismos	
	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>
Placa 5	P	P
Placa 6	P	P

A – denota ausencia y P – denota presencia

En los siguientes Anexos (4 y 5) se observan los componentes utilizados en el laboratorio de control biológico para la reproducción de levaduras y bacterias respectivamente.

Anexo 4. Cuadro de componentes de medio líquido para *Rhodotorula* sp.

Medio de cultivo líquido para <i>Rhodotorula</i> sp.	
Componentes	Cantidad (g/L)
Azúcar	100.00
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	1.80
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.27
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	0.36
Sulfato de Hierro (FeSO ₄)	0.045
Casaminoácidos	2.50

Anexo 5. Cuadro de componentes de medio líquido para *Bacillus subtilis*.

Medio de cultivo líquido para <i>Bacillus subtilis</i>	
Componentes	Cantidad (g/L)
Azúcar	40.00
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	4.10
Fosfato de Sodio (NA ₂ HPO ₄)	4.26
Nitrato de Amonio (NH ₄ NO ₃)	4.00
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	0.007
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ *7H ₂ O)	0.197
Sulfato de Hierro (FeSO ₄ *7H ₂ O)	0.278
Sodio EDTA	0.00148