



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta

Melisa Giset Núñez De La Rosa

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2011

Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta

Melisa Giset Núñez De La Rosa

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias- Microbiología

Directora:

Olga Lucia Mayorga Mogollón PhD
Investigadora Asociada
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Codirector:

José Manuel Lozano Moreno DrSc
Profesor Asociado Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

Centro de Biotecnología y Bioindustria - CORPOICA

Grupo de Microbiología y Nutrición del Trópico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2011

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo principalmente a Dios por acompañarme en cada momento de mi vida y mostrarme que nada es imposible.

A mis padres María y Boris por su incondicional amor y apoyo en todos los proyectos que he emprendido en la vida.

A mis hermanos Jonatan, Yamid y Jeison por impulsarme a seguir siempre adelante.

A mi hermanita Katerine por ser la persona por la cual lucho cada día y representar la fuerza ante las adversidades.

A Luis Carlos por ser mi compañero y mi apoyo moral en los tiempos difíciles.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y CORPOICA por mi formación, al Ministerio de agricultura y desarrollos rural por el apoyo financiero, al grupo de Microbiología y Nutrición animal, en especial a mi Directora Olga Lucia Mayorga por su apoyo incondicional en lo académico y personal, de igual forma a la Dr. Claudia Ariza, Dr. Germán Afanador quienes me apoyaron en el desarrollo de este trabajo, a las personas que me ayudaron en mi formación en el laboratorio de microbiología molecular en especial a Vienvilay y Carlitos, a Yesid Avellaneda y Daniel R. por sus asesorías en el análisis estadístico, a Diego Rodríguez por su dedicación y esfuerzo en el cultivo de los peces y participar activamente en el desarrollo inicial de este estudio, a mis compañeros de laboratorio por su apoyo moral y académico durante el desarrollo de la tesis (Daniel O., Edwin, Vanessa, Erika, Andrés, Pipe, Julito, Jazmín, Diana V.) a los auxiliares del laboratorio de química y todas aquellas personas contribuyeron al desarrollo de este trabajo. Al Profesor José Lozano por sus asesorías en el desarrollo de la tesis, a Socorrito por su apoyo moral y sus consejos, la profe Martha Fontanilla por mi formación y por las lecciones de vida que nos enseñó durante la maestría. Agradezco a todos que de alguna u otra forma hayan contribuido a que este estudio se realizara con éxito.

Resumen

El efecto de los aceites esenciales orégano (AEO) sobre la diversidad bacteriana del tracto intestinal (TI) de *Oreochromis niloticus* fue evaluado por la suplementación con diferentes relaciones de carvacrol:timol en la dieta. El estudio se realizó en la estación piscícola la Terraza (Villavicencio). Los peces fueron alimentados con una dieta basal con 200 ppm de AEO. El TI fue muestreado de 24 tilapias adultas, seguido de la extracción del ADN total usando un protocolo modificado, la amplificación de la región 16S ADNr por PCR y la cuantificación de bacterias por Q-PCR. La diversidad bacteriana fue descrita por el análisis de pirosecuenciación 454. Se identificaron 10 phylum, 62 familias y 154 géneros bacterianos. Los phylum Fusobacterias (54,59%) y Proteobacteria (38,56%) fueron los más representativos en los tratamientos. Los géneros predominantes fueron *Cetobacterium* (45,97%) y *Plesiomonas* (15,08%). Los resultados indicaron cambios en la comunidad bacteriana del TI de tilapia por efecto de los AEO.

Palabras clave: *Oreochromis niloticus*, Aceite esencial de orégano, diversidad bacteriana, análisis de pirosecuenciación.

Abstract

The effect the oregano essential oil (OEO) on the bacterial diversity associated with the intestinal tract (IT) of *Oreochromis niloticus* was evaluated by supplementing with different ratios of carvacrol: thymols. The study was carried out in an experimental farm located in Villavicencio. The animals were fed with a basal diet with 200 ppm of OEO. The IT were sampled from 24 adult tilapias. The total DNA was extracted using a modified protocol, followed by amplification of the 16S rDNA using PCR and total bacteria quantification using Q-PCR. The microbial diversity was described by 454 pyrosequencing analysis. 10 phyla, 63 families and 158 genera of bacteria were identified. The phylum Fusobacteria (54.5%) was the most representative in all treatments, followed by the phylum Proteobacteria (38.6%). The most representative genera were *Cetobacterium* (45,97%) and *Plesiomonas* (15,08%). The results demonstrated that the bacterial community of the IT of tilapia was affected by OEO.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, oregano essential oil, bacterial diversity, pyrosequencing analysis.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de fotos	XVI
Lista de anexos	XVII
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	5
1.1.1 Producción de tilapia en Colombia	5
1.1.2 Comunidades microbianas asociadas al tracto gastrointestinal de tilapia.....	7
1.2 Aceites esenciales como aditivo	13
1.2.1 Aceite esencial de orégano	13
1.2.2 Utilización de aceites esenciales de orégano como aditivo antimicrobiano.....	14
1.3 Métodos para evaluar comunidades microbianas	17
1.3.1 Métodos dependientes de cultivos	18
1.3.2 Métodos no dependientes de cultivos	19
2. Materiales y métodos	27
2.1 Aceites esenciales de orégano (AEO)	27
2.2 Cultivo de la tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	29
2.3 Dietas experimentales	30
2.4 Colección y procesamiento de los tractos intestinales de tilapia	32
2.5 Selección de protocolo de extracción de ADN total del TI tilapia.....	33
2.5.1 Protocolo basado en la extracción de ADN de comunidades microbianas de matrices de suelos	35
2.5.2 Protocolo basado en la extracción de ADN de comunidades microbianas de matrices de heces	36
2.5.3 Protocolo basado en la extracción de ADN de comunidades microbianas de contenido ruminal	38
2.6 Comparación de las huellas moleculares para la región 16S ADN _r de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de tilapia.....	39
2.6.1 Extracción del ADN total del tracto intestinal de Tilapia.....	39
2.6.2 Cuantificación de las poblaciones bacterianas por Q-PCR.....	39

2.6.3	Identificación de las poblaciones bacterianas presentes en el tracto intestinal de tilapias.....	42
2.6.4	Asignación taxonómica de las pirosecuencias del 16S ADNr.....	45
2.6.5	Evaluación de la diversidad bacteriana del tracto intestinal de tilapia ..	46
3.	Resultados	47
3.1	Comparación y selección de un protocolo de extracción de ADN total del tracto intestinal de tilapia.....	47
3.2	Comparación de las huellas moleculares para la región 16S ADNr de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de la tilapia	51
3.2.1	Extracción del ADN total del TI de tilapia	51
3.2.2	Cuantificación de las poblaciones bacterianas por Q-PCR	53
3.3	Diversidad bacteriana del TI por diferentes relaciones de carvacrol:timol por la técnica de pirosecuenciación	56
3.3.1	Evaluación de los iniciadores para la pirosecuenciación	56
3.3.2	Procesamiento y análisis de las pirosecuencias	57
3.3.3	Clasificación taxonómica y diversidad de las pirosecuencias.....	58
3.3.4	Efecto de los aceites esenciales orégano sobre las poblaciones bacterianas del TI de tilapia	60
3.3.5	Análisis de la comunidad bacteriana del TI de tilapia por componentes principales.....	63
3.3.6	Comparación de las bacterias benéficas y potencialmente patogénicas presentes en el TI por efecto de los AEO.....	64
4.	Discusión y análisis.....	67
1.	Protocolo para la extracción de ADN total del tracto intestinal de tilapia	67
2.	Cuantificación bacteriana del tracto intestinal por PCR en tiempo real.....	69
5.	Conclusiones y recomendaciones	79
5.1	Conclusiones.....	79
5.2	Recomendaciones.....	80
A.	Anexo: Riqueza de géneros bacterianos del tracto intestinal de la tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	83
B.	Anexo: Presentaciones en eventos nacionales e internacionales.....	85
	Bibliografía	87

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Producción de tilapia a partir de 1950 de la acuicultura reportada en Colombia.....	7
Figura 1-2: Tracto intestinal de tilapia.....	8
Figura 1-3: Estructura química del carvacrol y del timol (Burt, 2004).....	14
Figura 1-4: Actividad hipotética del carvacrol(Ultee <i>et al.</i> , 2002)	16
Figura 1-5: Química de la pirosecuenciación: reacciones bioquímicas y enzimas involucradas en la generación de señales de luz por pirosecuenciación del ADN (Petrosino <i>et al.</i> , 2009).....	25
Figura 2-1: Esquema de definición de tratamientos experimentales.....	32
Figura 2-2: Diseño de iniciadores empleados para el análisis de 454 pirosecuenciación (a) Iniciador Forward (42 pb) y (b) Iniciador Reverse (39 pb).....	43
Figura 3-1: Gel de agarosa al 1,4% del perfil de ADN total extraído de TI de tilapias adultas T111: T1 el tratamiento 1 (Control), segundo número: individuo, tercer numero: indica la réplica para ese tratamiento.....	52
Figura 3-2: Curva de amplificación de Q-PCR, obtenidas para la mezcla de ADN el grupo de bacterias totales.....	53
Figura 3-3: Temperaturas de disociación obtenidas en la amplificación del ADN de los iniciadores para bacterias totales.....	54
Figura 3-4: Curvas de calibración de Q-PCR obtenidas para la mezcla de bacterias con iniciadores para bacterias totales.....	54
Figura 3-5: Curva de amplificación de Q-PCR, obtenidas para el ADN bacteriano total del TI de tilapia.....	55
Figura 3-6: Curvas de calibración de Q-PCR obtenidas para los iniciadores para bacterias totales.....	55
Figura 3-7: Gel de agarosa al 1,4% de la amplificación con iniciadores destinados para pirosecuenciación con ADN total del tracto intestinal de una tilapia del tratamiento Control. Carriles 1-12 corresponden a un iniciador diferente en orden según Tabla 2-3. Marcador 100pb empleado y ADN (2 µL por reacción a 50 ng/µL).....	57
Figura 3-8: Efecto de las relaciones carvacrol:timol de los AEO sobre las poblaciones bacterianas a nivel taxonómico de phylum del TI de tilapia. a) T1, tratamiento sin AEO, b, c y d) corresponden a las relaciones carvacrol:timol: T2, 0,15:1; T3, 3,25:1 y T4, 6,5:1 respectivamente.....	61

Figura 3-9:	Efecto de las relaciones carvacrol:timol de los AEO sobre las poblaciones bacterianas del TI de tilapia. a) T1, tratamiento sin AEO, b, c y d) corresponden a las relaciones carvacrol:timol: T2, 0,15:1; T3, 3,25:1 y T4, 6,5:1 respectivamente.....	62
Figura 3-10:	Agrupación de géneros bacterianos del TI de tilapia nilótica por tratamientos.....	63
Figura 3-11:	Efecto de los AEO sobre grupos bacterianos benéficos asociados al TI de tilapia.....	65
Figura 3-12:	Efecto de los AEO sobre grupos bacterianos asociados con mortalidad en peces.....	65

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Número especies de peces con bacterias Gram negativas y Gram positivas encontradas en los intestinos (Izvekova <i>et al.</i> , 2007).....	7
Tabla 1-2: Principales enfermedades que afectan a la tilapia nilótica.....	12
Tabla 2-1: Composición relativa de AEO de <i>Lippia origanoides</i> y <i>Oregano vulgare</i> Hirtum.....	28
Tabla 2-2: Composición de las dietas en diferentes etapas de producción de la tilapia.....	31
Tabla 2-3: Relaciones de carvacrol/timol de AEO incluidas en la formulación de las dietas experimentales para tilapia.....	31
Tabla 2-4: Iniciadores para evaluar la cantidad de bacterias totales del tracto intestinal de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) (Denman y McSweeney, 2005).....	41
Tabla 2-5: Condiciones de reacción establecidas para determinar las concentraciones de bacterias totales del tracto intestinal de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	41
Tabla 2-6: Iniciadores empleados para el análisis de pirosecuenciación.....	44
Tabla 3-1: Evaluación de protocolos de extracción de ADN procedente del tracto intestinal de tilapia nilótica.....	50
Tabla 3-2: Evaluación del efecto del protocolo de extracción y los niveles de carvacrol:timol sobre la concentración ADN total (ng/ μ L) del TI.....	51
Tabla 3-3: Evaluación de la extracción de DNA total de los TI de tilapia.....	52
Tabla 3-4: Cuantificación del ADN del TI de tilapia nilótica expuesta a AEO por Q-PCR.....	56
Tabla 3-5: Secuencias obtenidas de la región V8–V9 del gen 16S ADNr por pirosecuenciación.....	58
Tabla 3-6: Diversidad microbiana del TI de tilapia con diferentes niveles de inclusión de aceite esencial de orégano.....	59
Tabla 3-7: Índices de diversidad de la comunidad bacteriana del TI de tilapia nilótica expuesta a AEO en la dietas.....	59

Lista de fotos

	Pág.
Foto 2-1: Instalaciones y tanques experimentales de la estación piscícola la Terraza.....	30
Foto 2-2: Muestreo de los tractos intestinales de tilapia a) Colecta de peces; b) Adormecimiento de peces en solución acuosa con Eugenol®; c) Sacrificio mediante corte sagital; d) Extracción del tracto intestinal de tilapia.....	33
Foto 2-3: Procesamiento de las muestras de TI de tilapia para extracción del ADN total. a) Muestras frescas de TI; b) Muestras de TI secadas por liofilización; c) Muestras de TI maceradas.....	34

Lista de anexos

	Pág.
Anexo A: Riqueza de géneros bacterianos del tracto intestinal de la tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	83
Anexo B: Presentaciones en eventos nacionales e internacionales.....	85

Introducción

El cultivo de tilapia es uno de los más importantes a nivel mundial por su rápido crecimiento, su capacidad de adaptación, y a la posibilidad de ser criada en diferentes sistemas de cultivo, su sabor y las características nutricionales de su carne, por tanto la tilapia se ha colocado en el segundo lugar de los peces de agua dulce más cultivados en el mundo (Toledo y García, 2000) y en nuestro país aporta aproximadamente el 75% de la producción a nivel nacional, siendo los departamentos del Huila, Tolima, Antioquia, Santander, Meta y Valle del Cauca los principales lugares de producción (FAO, 2006). Los sistemas de producción acuícolas son básicamente cultivos en estanques en tierra y jaulas flotantes para las especies de clima cálido como la tilapia roja (*Oreochromis sp.*), en estanques en tierra para la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y el camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*).

Estudios microbiológicos del tracto gastrointestinal (TI) de peces han evidenciado la presencia de poblaciones bacterianas asociadas a este órgano complejo, revelando una gran diversidad microbiana asociada a él (Cahill, 1990; (Al-Harbi y Naim Uddin, 2004; Al-Harbi y Uddin, 2005). Las tilapias al igual que otros peces de cultivo pueden ser afectadas por enfermedades producidas por estos microorganismos, destacándose especialmente las afecciones de tipo bacteriano que han generado gran mortalidad en las especies silvestres y cultivadas (Paperna, 1996). Por lo anterior, hasta hace poco las investigaciones se habían centrado en el estudio de grupos específicos causantes de enfermedades que generaban algún daño en los peces y que afectaba los cultivos de forma directa causando cuantiosas pérdidas económicas que afectaban la industria acuícola.

A nivel mundial según un estudio realizado por la Federación Europea de Sanidad Animal (FEDESA, 1999), animales de granja consumieron 4.700 toneladas (35%) de todos los antibióticos que se administran en la Unión Europea, mientras que los humanos

consumen 8.500 toneladas (65%). De los antibióticos que se les suministró a los animales, 3.900 toneladas (29% del uso total) fueron administrados para ayudar a los animales enfermos. Estas estadísticas muestran, además del uso excesivo de antibióticos en la industria acuícola, el problema de resistencia generado (Balcázar *et al.*, 2006) y se suma a ello el costo económico que representa la utilización de estos para los productores y el inconveniente que representa para la población humana por la transferencia de resistencia mediante la cadena alimentaria.

Actualmente los estudios se están orientando a proponer suplementos alternativos al uso de antibióticos como promotores de crecimiento, siendo los aceites esenciales una de las opciones más viables debido a que a nivel *in vitro* han demostrado claramente tener efectos antimicrobiales (Juven *et al.*, 1994). Varias investigaciones muestran la inhibición de diferentes microorganismos por carvacrol (Juven *et al.*, 1994; Kim, *et al.*, 1995; Sivropoulou *et al.*, 1996). La actividad antimicrobiana no se puede atribuir a un solo mecanismo, sino que se da a varios niveles en las células microbianas (Carson *et al.*, 2002). Su sitio de acción aparentemente es la capa fosfolipídica y mediante mecanismos bioquímicos. Estos procesos incluyen la inhibición del transporte de electrones, translocación proteínica, pasos de fosforilización y otras reacciones dependientes de enzimas (Dorman y Deans, 2000).

Los estudios de las poblaciones microbianas del TI de la tilapia han sido realizados mediante técnicas tradicionales de cultivo, generando una valiosa información acerca de la diversidad bacteriana de este órgano complejo. Sin embargo, debido a las dificultades para cultivar la mayoría de las bacterias presentes en el TI, la estructura real y compleja de esta comunidad microbiana es aún desconocida. Por lo anterior, el empleo de técnicas independientes de cultivo se convierte en una alternativa para el estudio de la comunidad bacteriana presente en el ambiente del TI de la tilapia. Dentro de las técnicas moleculares más usadas para evaluar la diversidad y filogenia de las comunidades bacterianas a través de las huellas moleculares que codifican los genes de regiones conservadas del 16S ADNr se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE), T-RFLP y pirosecuenciación, siendo esta última en una de las técnicas más promisorias en el análisis de la composición de las comunidades microbianas en sistemas complejos (Nakayama, 2010).

En Colombia, en el cordón panamericano, zona en desertificación del sur del país, especialmente en la zona del alto Patía abunda de forma silvestre, una especie de orégano, clasificado como *Lippia origanoides* Kunth, un arbusto del cual se vienen utilizando sus aceites esenciales en sistemas de alimentación animal como aditivo nutracéutico por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Los principales componentes de los aceites esenciales de orégano (AEO) corresponden a las moléculas de carvacrol y timol, constituyendo del 78 al 82% del total del aceite y son los que exhiben la actividad antimicrobiana. Es por esto que el grupo de Nutrición Animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de CORPOICA, ha iniciado investigaciones para incluir los AEO en la formulación de dietas para aves y peces como alternativa al uso de antibióticos. Así, en el cultivo de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), estos AEO son considerados de gran potencialidad por su influencia directa sobre la microbiota asociada al TI de esta especie íctica, lo cual juega un papel importante en el desarrollo de la especie, interviniendo en la nutrición y salud de los peces.

En este orden de ideas, el estudio busca evaluar los cambios en la estructura de las poblaciones bacterianas del TI de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por efecto de la presencia y ausencia en las dietas de AEO proveniente del alto Patía, con diferentes relaciones carvacrol:timol. Este estudio fue dividido en dos etapas, la primera de ella fue el establecimiento y comparación de protocolos de extracción del ADN microbiano para una matriz compleja como el TI. La Segunda etapa fue la comparación de las huellas moleculares para la región 16S ADNr de la comunidad bacteriana del TI de los diferentes tratamientos, evaluando cantidad de ADN y diversidad taxonómica. La cantidad de ADN bacteriano total fue cuantificado mediante la técnica de PCR cuantitativa (q-PCR) amplificando las regiones hipervariables V3 del 16S ADNr y para la determinación de la diversidad de la comunidad bacteriana se amplificaron las regiones hipervariables V8-V9 del 16S ADNr por PCR convencional, seguido de la pirosecuenciación usando la plataforma GS-FLX 454 Titanium System (454 Life Sciences). Así, este estudio constituirá una estrategia para evaluar el efecto de los AEO sobre la comunidad bacteriana presente en el TI de la tilapia usando herramientas moleculares y generando una potencial alternativa al uso de antibióticos en sistemas de producción piscícola.

1. Marco teórico

1.1 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Tilapia es un término genérico utilizado para denominar a un grupo de especies de peces de valor comercial que pertenecen a la familia Cichlidae que incluye los géneros Tilapia, *Oreochromis*, *Sarotherodon*, entre otros (con más de 100 especies). Son originarias de África y el Medio Oriente (Lim y Webster, 2006). La tilapia en general es conocida por su rápido crecimiento, reproducción durante todo el año con cuidado parental y su talla mínima de maduración sexual, que le confieren una gran habilidad para invadir y establecerse en casi cualquier tipo de ecosistema acuático (Peterson *et al.*, 2004). De igual forma si bien es reconocida generalmente como omnívora hay fuerte evidencia de que es principalmente herbívora (Dempster *et al.*, 1995) Esta plasticidad trófica, que le permite comer algas, zooplancton, insectos, peces y plantas, es la que le proporciona ese oportunismo dietético que puede ser la base de su éxito colonizador, como fue observado por Njiru y colaboradores (2004) en el lago Victoria. La tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), es una especie tropical que prefiere vivir en aguas someras. Las temperaturas letales son: inferior 11-12 °C y superior 42 °C, en tanto que las temperaturas ideales varían entre 31 y 36 °C.

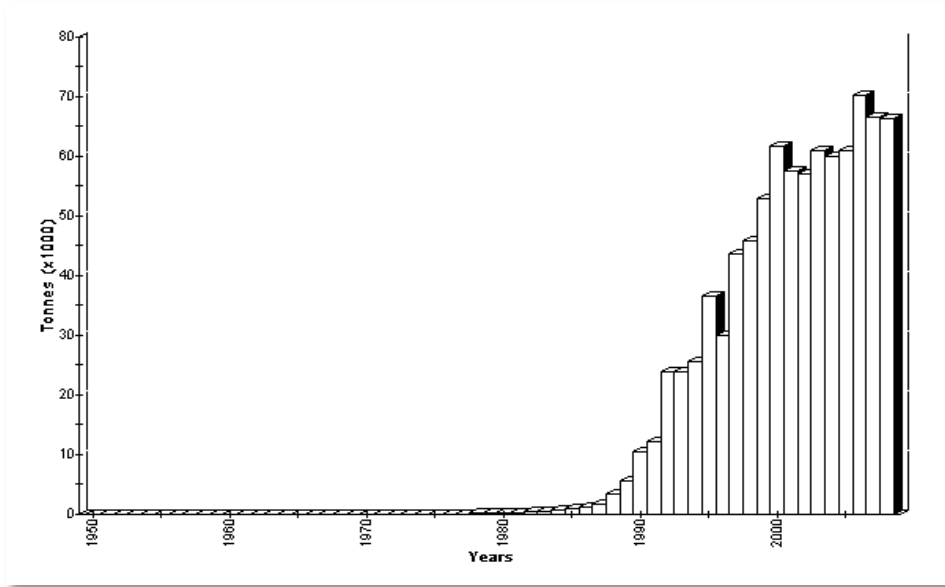
1.1.1 Producción de tilapia en Colombia

La tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* X spp.) fue introducida al país en 1982 por productores particulares y desde esa época se está produciendo a nivel artesanal e industrial. Posteriormente, fueron introduciéndose otros híbridos rojos de tilapia, provenientes de diferentes países, incluyendo la tilapia roja de Sterling (*Oreochromis niloticus*). A partir del año 1995 en Colombia se iniciaron los trabajos de mejoramiento genético de ésta especie con asesoría cubana, de acuerdo con las condiciones medioambientales en que se les cultive, algunos híbridos de tilapia se comportan mejor que otros, lo cual se debe a la composición del híbrido y al peso que tengan las especies que intervienen en su formación.

Para la introducción al país de la tilapia nilótica, se realizaron los estudios de impacto ambiental, tal como lo exigen las autoridades ambientales y para la tilapia roja se realizó un estudio en el que se trató el aspecto trofodinámico. Para su introducción al territorio colombiano fueron exigidas las respectivas certificaciones de origen de la línea y las correspondientes certificaciones sanitarias expedidas por las autoridades competentes del país de origen, en donde se certificaba que las especies estaban libres de las patologías que más afectan las producciones industriales de la especie (FAO, 2006).

Los principales lugares de producción de la tilapia en Colombia son los departamentos del Huila, Tolima, Antioquia, Santander, Meta y Valle del Cauca, que aportan aproximadamente el 75 por ciento de la producción. La superficie aproximada es de 525 hectáreas, aunque existen proyectos en jaulas flotantes que ocupan entre 2 y 5 ha en total, pero en donde se manejan altas producciones por unidad de volumen. Existen proyectos que se han construido en áreas dedicadas a la ganadería donde el agua generalmente es llevada por gravedad, proveniente de ríos o quebradas, aunque en ocasiones se debe bombear. El alimento utilizado es concentrado con 48 por ciento, 30 por ciento y 24 por ciento de valor proteico y se le usa para las diferentes fases de iniciación, preengorde y engorde. La producción por hectárea es de aproximadamente 30 a 50 toneladas/hectáreas/año, con densidades de siembra de hasta 20 peces/m² o 6 - 8 kg/m² en estanques. Esta especie se cultiva también en jaulas flotantes en embalses artificiales, principalmente en el embalse de Betania en el departamento del Huila. En estos últimos se ha desarrollado una tecnología propia, con altas producciones por unidad de volumen, del orden de los 150 peces/m³ o 50 kg/m³. Así, en la Figura 1-1 muestra el incremento de la producción acuícola desde el año 1950 al año 2006, con una mayor tasa de crecimiento desde los años 80' (FAO, 2006).

Figura 1-1: Producción de tilapia a partir de 1950 de la acuicultura reportada en Colombia.



Fuente: FAO Estadísticas pesquería -Fishery Statistic, 2006)

1.1.2 Comunidades microbianas asociadas al tracto gastrointestinal de tilapia

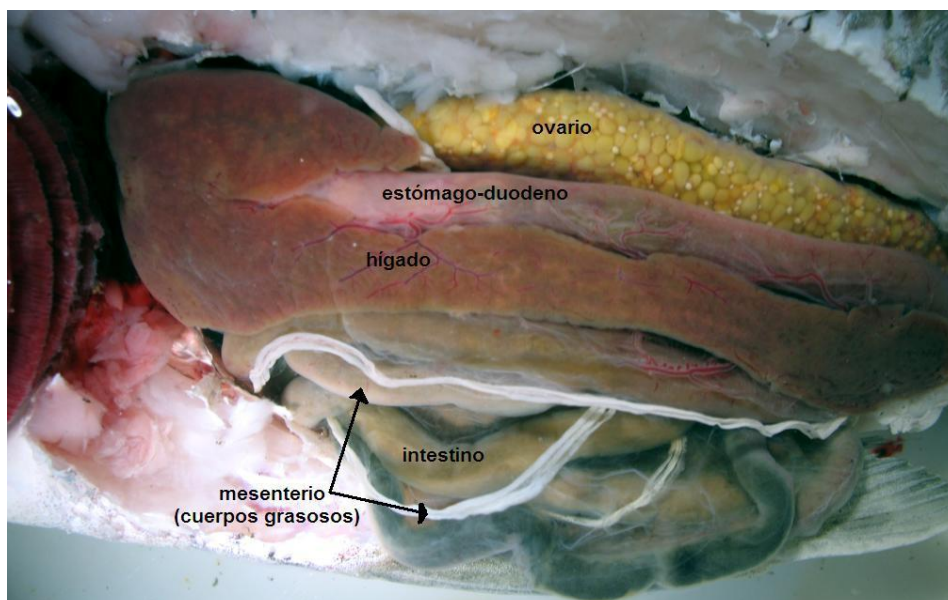
El tracto gastrointestinal de peces dulceacuícolas y marinos, se caracteriza por ser un nicho ecológico favorable para el desarrollo de microorganismos (Cahill, 1990), lo cual ha sido evidenciando por estudios que muestran densas y diversas poblaciones microbianas dentro del contenido intestinal de diversas especies de peces (Ver Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Número especies de peces con bacterias Gram negativas y Gram positivas encontradas en los intestinos (Izvekova *et al.*, 2007).

Grupo de bacteria	Número total	Especies de agua dulce	Especies Marinas	Depredadores	Planciófagos	Bentófagos	Herbívoros	Eurífagos
Aerobias Gram-negativas	47	24	23	14	6	14	6	8
Aerobias Gram-positivas	34	22	12	11	6	7	5	5
Anaerobias Gram-negativas	10	9	1	2	-	1	4	3
Anaerobias Gram-positivas	8	8	-	2	-	1	2	3

El tracto intestinal de la tilapia nilótica es un órgano complejo y multifuncional el cual está dividido en intestino anterior, medio y posterior, y cada una de las regiones son diferentes a nivel funcional. Este órgano se caracteriza por ser largo y delgado, lo que es típico para esta especie de hábito alimenticio herbívoro y omnívoro. La longitud total del intestino en especies adultas varía entre cinco y siete veces el largo total del cuerpo. El tracto de la tilapia presenta a nivel estructural múltiples irregularidades acompañadas de vueltas, anillos y roscas anidados una sobre la otra, se identifican entonces cinco regiones conocidas como: región hepática, anillo proximal mayor, irregularidad gástrica, anillo distal mayor y el segmento terminal (Smith *et al.*, 2000) (Ver Figura 1-2).

Figura 1-2: Tracto intestinal de tilapia.



Fuente: <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/15963>

En los animales acuáticos la microbiota que coloniza el TI no se encuentra como una entidad absoluta sino que hay una interacción constante entre el ambiente y el pez, de tal forma que los hospederos y los microorganismos comparten un mismo ecosistema y estos últimos tienen la opción de vivir en asociación o bien de manera independiente (Al-Harbi y Naim Uddin, 2004; Al-Harbi y Uddin, 2005).

El desarrollo de la microbiota intestinal en peces es un proceso gradual que comienza después que la larva está en contacto con el ambiente circundante, e influenciada por la ingesta del alimento, la secreción de hormonas y la absorción de nutrientes. Inicialmente el intestino es dominado por cepas anaerobias facultativas y posteriormente la variabilidad de las poblaciones dependerá de la dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica, los tratamientos con medicamentos y el estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri *et al.*, 2001). La microbiota intestinal de peces se considera: 1) microbiota alóctona o transitoria (accidental), la cual es escasa y no permanece por mucho tiempo en el intestino, normalmente se encuentra en el agua, la comida y sobre la superficie de los huevos de los peces; 2) la microbiota autóctona o nativa cuando los microorganismos son capaces de colonizar la superficie epitelial del intestino del hospedero, y 3) la microbiota específica que se vuelve estable al llegar a la etapa adulta. Por tanto, la microbiota del TI juega un papel importante e influye de manera directa sobre la nutrición y la salud de los animales en general. Es por esto que, al alterarla se afectan el estatus fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, el crecimiento, su desarrollo general y la calidad del producto. Por otro lado, es importante resaltar que la diversidad microbiana en el TI de peces está asociada tanto a bacterias benéficas como patógenas, un desbalance en el equilibrio de las especies puede generar efectos negativos en la morbilidad y mortalidad de los peces (Al-Harbi y Uddin, 2005). Consecuentemente, las enfermedades de origen microbiano en los peces frecuentemente pueden evitarse manteniendo una alta calidad del ambiente y reducir el estrés del manejo para evitar estos desequilibrios en la microbiota (Verschuere *et al.*, 2000).

Estudios de diversidad microbiana en peces, realizados con técnicas dependientes e independientes de cultivo confirman la influencia por cambios estacionales y dieta sobre el tipo, abundancia y localización de los microorganismos asociados a los órganos de los peces. Kim y colaboradores (2007) estudiaron la comunidad de bacterias provenientes del contenido intestinal y la capa de mucosa del intestino de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), recuperando 41 filotipos microbianos cultivables, y 39 secuencias del 16S ADN y dos de los genes ADN 18S. Las bacterias cultivadas dominantes en este estudio pertenecen a las familias *Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. El ADN genómico aislado de contenido intestinal y el moco se utilizó para generar 104 clones al azar, los cuales fueron agrupados en 32 filotipos, la mayoría de los cuales estaban afiliados a Proteobacteria (>

70% del total). Sin embargo, a diferencia de la colección de contenido intestinal, los phylum Bacteroidetes y Fusobacterias no se encuentran en la mucosa intestinal, lo que indica que la microbiota en la mucosa intestinal es diferente a la del contenido intestinal. Hovda y colaboradores (2007) mediante técnicas tradicionales y análisis molecular de la región 16S ADNr, en muestras de la primera, media y posterior porción intestinal del salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), encontraron que el intestino estaba dominado por especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* sp., *Bacillus* sp., *Photobacterium phosphoreum*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. Por otro lado, Yang y colaboradores (2007) estudiaron la composición bacteriana del pez globo (*Takifugu obscurus*) en la piel, los intestinos, y órganos como el ovario y el hígado. Un total de 38 especies de bacterias fueron aisladas y clasificadas de acuerdo al análisis filogenético. Merrifield y colaboradores (2009) evaluó la comunidad bacteriana transitoria y residente en el tracto intestinal de la trucha arco iris, determinando que *Pseudomonas* spp. y *Enterobacteriaceae* constituyeron cerca del 80% de la población alóctona, pero cerca del 60% de la población autóctona. En el estudio de Wu y colaboradores (2010), once filotipos se detectaron a partir de la microbiota cultivable, y sus parientes más cercanos fueron *Plesiomonas*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Myroides*, lo que sugiere que la abundancia y diversidad de las poblaciones de bacterias en la mucosa puede ser diferente de la microbiota intestinal en los contenidos, y que algunas especies microbianas pobremente colonizaron la capa de la mucosa intestinal.

Estudios de Ringo y Strom (1994), evidenciaron una microbiota adherida a los intestinos delgado y grueso del salvelino (*Salvelinus alpinus*, un pez de vida libre del lago Takvatn al norte de Noruega) e influenciada por las condiciones de incubación y efecto de nuevas dietas. En este estudio, las bacterias asociadas al intestino fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, predominando *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus* y *Lactobacillus*. Además se encontraron otros microorganismos como: *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Coryneformes* y *Streptococcus*.

Existen pocos estudios relacionados con el conocimiento de los microorganismos asociados al intestino de la tilapia. Sin embargo, Al-Harbit y Uddin (2004 y 2005) llevaron a cabo un análisis estacional cuantitativo y cualitativo de la microbiota bacteriana asociada al TI de la tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)

cultivadas en estanques de tierra en Arabia Saudita donde fueron identificados entre 17 y 19 géneros bacterianos, predominando las Gram-negativos con rango de 77-87%; *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Corynebacterium urealyticum*, y *Vibrio cholerae* fueron las especies más abundantes, con una prevalencia de más de 10% en la mayoría de los casos. Moreno y colaboradores (2006) estudiaron el intestino y otros órganos de tilapias silvestres y cultivadas en Venezuela, determinaron la presencia de *Plesiomonas shigelloides*, bacteria potencialmente patógena. En un estudio del efecto de seis dietas experimentales isonitrogenadas e isoenergéticas con adición de los productos de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* (DVAQUA®), sobre las comunidades bacterianas asociadas al TI de la tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) y analizando los amplímeros de la región 16S ADNr por la técnica DGGE, se demostró que la suplementación con DVAQUA afectó a la comunidad autóctona de bacterias intestinales; varias bacterias potencialmente benéficas se estimularon por la dieta, mientras que el potencial de especies dañinas como *Escherichia coli* serotipo O20 se vio reducida con la dieta suministrada (He *et al.*, 2009).

Por otro lado, como fue mencionado en los párrafos anteriores, la diversidad bacteriana en peces está asociada tanto a bacterias patógenas y benéficas (Cahill, 1990), un incremento o introducción de especies patogénicas causa diferentes tipos de enfermedades, en la Tabla 1-2 se muestran los síntomas y tratamientos para algunas enfermedades de origen bacterial asociadas al cultivo de la tilapia de acuerdo con la FAO (2008), en algunos casos se han empleado antibióticos y otros productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, algunas revisiones han sugerido que la microbiota autóctona podría ser una barrera contra la colonización de estos agentes patogénicos (Cahill, 1990; Isolauri *et al.*, 2001).

Tabla 1-2: Principales enfermedades que afectan a la tilapia nilótica.

Enfermedad	Agente	Tipo	Síndrome	Medidas ¹
Septicemia por Aeromonas Móvil (MAS)	<i>Aeromonas hydrophila</i> y especies relacionadas	Bacteria	Pérdida del equilibrio; nado letárgico; respiración en superficie; hemorragia o inflamación de aletas y piel; abultamiento de ojos; córnea opaca; abdomen inflamado que contiene líquido sanguinolento; baja mortalidad crónica cotidiana.	Inmersión indefinida en solución de KMnO ₄ en 2-4 mg/L; o de 4-10 mg/litro durante una hora, antibióticos Terramycin® en el alimento en concentración de 50 mg/kg pez/día durante 12-14 días, 21 días de impedimento comercial.
Vibriosis	<i>Vibrio anguillarum</i> y otras especies	Bacteria	Los mismos que en MAS; causados por stress y mala calidad del agua.	Antibióticos en alimento
Columnaris	<i>Flavobacterium columnare</i>	Bacteria	Aletas deshilachadas y/o manchas irregulares blanquizas y grises en la piel y/o aletas; lesiones pálidas, necróticas en branquias.	Inmersión indefinida con CuSO ₄ en concentración de 0,5-3 mg/L, dependiendo de la alcalinidad
Edwardsiellosis	<i>Edwardsiella tarda</i>	Bacteria	Pocos síntomas externos; líquido sanguinolento en cavidad corporal; hígado pálido y manchado; bazo inflamado y rojo intenso; riñón inflamado y blando.	Antibiótico en alimentos
Streptococcosis	<i>Streptococcus iniae</i> y <i>Enterococcus</i> sp.	Bacteria	Nado letárgico y errático; pigmentación oscura en la piel; exoftalmia con opacidad y hemorragia de ojos; distensión abdominal; opérculo difuso y hemorrágico, alrededor de la boca, ano y base de aletas; bazo agrandado y ennegrecido; alta mortalidad.	Antibiótico en alimentos, Erytromicina en concentración de 50 mg/kg pez/día durante 12 días.

¹ Antibióticos y otros productos farmacéuticos recomendados para el tratamiento de enfermedades no implican una recomendación de la FAO (2008).

1.2 Aceites esenciales como aditivo

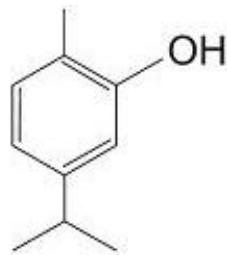
Los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosos compuestos obtenidos de diversas partes de plantas y se caracterizan por tener una composición muy diversa, especialmente compuestos químicos como terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos) y fenilpropanoides (Calsamiglia *et al.*, 2007). Ellos son metabolitos secundarios que generalmente, ejercen una función de defensa de las plantas frente a agresiones externas (Briskin, 2000), su utilización se ha incrementado en los últimos años, ya que pueden actuar como antibacterianos, antioxidantes, antifúngicos, analgésicos, anticancerígenos, insecticidas, anticoccidiales y como promotores de crecimiento (Tipu *et al.*, 2006).

1.2.1 Aceite esencial de orégano

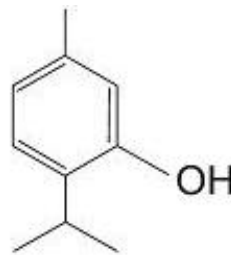
El orégano es el nombre común para el aroma y sabor en general derivado principalmente de más de 60 especies de plantas utilizadas en todo el mundo como una especia. La mayoría de ellos pertenecen a las familias Lamiaceae y Verbenaceae, en la cual hay una gran distinción el orégano europeo (*Origanum* sp.) y orégano mexicano (*Lippia* sp.). El género *Lippia* (familia Verbenaceae) es el más conocido de varias plantas y consta de aproximadamente 200 especies de las cuales 46 han sido examinadas químicamente. Las especies de *Lippia* son pequeños arbustos con hojas más grandes que las especies de *Origanum* y vienen principalmente de México. En Colombia suele encontrarse en los departamentos de Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Norte de Santander y Santander la especie *Lippia origanoides* H.B.K., un arbusto silvestre que alcanza 3 m de longitud, posee hojas verdes ovadas muy aromáticas e inflorescencias en racimo, axilares y blancas. En éste último se encuentra a altitudes entre 500- 800 m.s.n.m formando asociaciones vegetales con otras especies características de la región. (Ruiz *et al.*, 2007). Una característica sobresaliente de esta especie de *Lippia* es la diferencia observada en la composición del aceite esencial reportado de diferentes orígenes geográficos (Stashenko *et al.*, 2010). La cantidad de los componentes principales de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* varía según el sitio del cual provienen, se han encontrado diferentes concentraciones de: p-cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol, 1,8-cineol, acetato de p-timilo y β -cariofileno, entre otros.

En Colombia, específicamente al norte del departamento de Nariño y sur del Cauca se encuentra la región del Alto Patía, que se caracteriza por poseer un clima seco, suelos áridos, devastación forestal, escasez de fuentes hídricas, entre otras dificultades. En dicha zona abunda, de forma silvestre una especie conocida como orégano de monte (*Lippia origanoides*), un arbusto que puede llegar a medir hasta 1,7 m. El uso de aceites esenciales está siendo evaluado como un nuevo aditivo, ya que se constituyen como una alternativa para mejorar la salud y el crecimiento de animales terrestres y acuáticos, debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Burt, 2004), lo cual ha sido atribuido a los monoterpenos, carvacrol ($C_{10}H_{14}O$) y timol ($C_{10}H_{14}O$) (Figura 1-3) considerados los componentes activos principales de los (AEO).

Figura 1-3: Estructura química del carvacrol y del timol (Burt, 2004).



Carvacrol



Timol

1.2.2 Utilización de aceites esenciales de orégano como aditivo antimicrobiano

El cultivo de peces supone un considerable grado de estrés para los peces debido a la alta densidad de éstos en un espacio limitado, y por la presencia del hombre en labores propias del cultivo. Lo anterior en conjunto hace cambiar en forma importante los mecanismos fisiológicos del pez, haciéndolo más vulnerable a las enfermedades. La minimización del estrés se realiza mediante el uso de antibióticos. Sin embargo estos pueden ser liberados al agua ejerciendo potenciales influencias negativas sobre el ecosistema acuático. Los antibióticos comúnmente son utilizados para controlar las

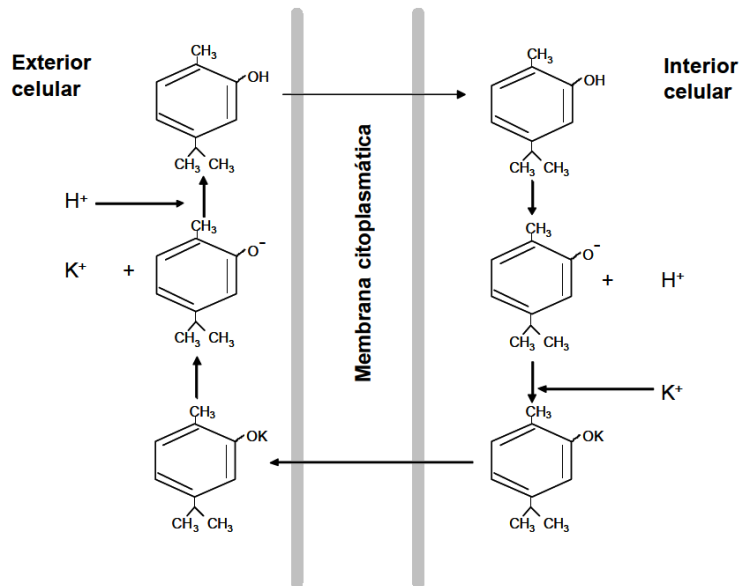
enfermedades de origen microbiano, sin embargo cada nuevo antimicrobiano conduce a un progresivo desarrollo de resistencia en lapsos variables, ya que se promueve la desaparición de cepas susceptibles y la aparición de cepas resistentes (Carmona y Silva, 1994).

Alternativas al uso de antibióticos, en la industria acuícola, están siendo investigadas a nivel internacional, estas incluyen la identificación de nuevos aditivos nutracéuticos, destacándose especialmente los aceites esenciales de origen vegetal. Durante muchos años se ha reconocido la actividad antimicrobiana de estos aceites esenciales, así mismo se cuenta con información relacionada con el amplio rango de actividad de los aceites esenciales *in vitro* (Baydar *et al.*, 2004; Dorman y Deans, 2000; Hammer *et al.*, 1999; Özer *et al.*, 2006). Estudios realizados indican claramente el potencial antimicrobiano de estos aceites extraídos de plantas como: *Melissa officinalis* L. (Bálsamo), *Ocimum basilicum* L. (albahaca), *Hyssopus officinalis* L. (hisopo), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavanda), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Salvia officinalis* L. (Sage) y *Thymus vulgaris* L. (Tomillo), entre otras y su importancia en la acuicultura como alternativa al uso de antibióticos (Lee *et al.*, 2009; Özcan y Erkmen, 2001).

Existen investigaciones que confirman que los aceites esenciales de oregano (AEO) poseen efecto antimicrobiano frente a determinadas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Albado *et al.*, 2001), dicha acción se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. El orégano tiene capacidad antioxidante y antimicrobiana contra muchos microorganismos patógenos dentro de los cuales encontramos *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, entre otros (Arcila, 2004). Helander y colaboradores (1998) observaron que el timol y el carvacrol poseen alta capacidad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y, en particular, sobre las Gram negativa al actuar como desintegradores de la pared celular externa e inhibir su crecimiento. Se ha demostrado que los aceites esenciales de esta planta presentan actividad antimicrobiana *in vitro* demostrada contra *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* MRSA, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Celis y colaboradores (2007) realizaron un estudio en el cual se demuestra que los aceites de *Lippia origanoides* presentan efectos bacteriostáticos, en *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *S. aureus*. *Salmonella typhimurium*.

Ultee y colaboradores (2002) indicaron que el grupo oxidrilo que poseen ambos compuestos parece ser el responsable de su capacidad antimicrobiana. Proponiendo este autor que el carvacrol y el timol podían actuar como portadores de cationes monovalentes a través de la membrana celular (ver Figura 1-4). Estos compuestos podrían atravesar la membrana celular hacia el citoplasma y disociarse, y el grupo oxidrilo intercambiaría su protón por otro ion (por ejemplo el potasio) para volver a salir a través de la membrana citoplasmática al medio externo, arrastrando un ion potasio (u otro catión). Una vez en el espacio extracelular, liberaría el potasio al medio y volvería a tomar otro protón para volver a atravesar la membrana citoplasmática y realizar otro ciclo, causando la pérdida de la fuerza motriz de los protones y, por tanto, reduciendo la síntesis de ATP hasta provocar la muerte celular.

Figura 1-4: Actividad hipotética del carvacrol (Ultee *et al.*, 2002).



Múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano han sido reportados. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis *et al.*, 2001; Elgayyar *et al.*, 2001). Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*;

pero no contra *Pseudomona aeruginosa* (Sivropoulou *et al.*, 1996). Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Sivropoulou *et al.*, 1996; Elgayyar *et al.*, 2001). Otros compuestos, como el g-terpineno y r-cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas (Aligiannis *et al.*, 2001; Sivropoulou *et al.*, 1996). Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0,28-1,27 mg/mL para bacterias, y de 0,65-1,27 mg/mL para hongos (Aligiannis *et al.*, 2001).

1.3 Métodos para evaluar comunidades microbianas

Aunque los métodos tradicionales de cultivo han proporcionado una importante información sobre la diversidad microbiana de muestras naturales y han permitido además, aislar porcentajes mayores de microorganismos con estrategias de cultivo, el porcentaje no cultivable sigue siendo un problema para la caracterización de la comunidad total (Cahill, 1990). Por tal razón las nuevas técnicas moleculares independientes de cultivo como PCR cuantitativo (Q-PCR), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y el uso de pirosecuenciación para la secuenciación de las especies presentes en ambientes complejos, se han convertido en herramientas de gran utilidad al momento de caracterizar comunidades bacterianas complejas como las presentes en el tracto intestinal de peces (Vaughan *et al.*, 2000; González y Saiz, 2005; Ahmadian *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

En la naturaleza los microorganismos pueden encontrarse tanto en ambientes familiares como en lugares poco comunes, como aquellos tan extremos que se consideran inadecuados para formas de vida superiores. Las poblaciones celulares raramente viven solas en la naturaleza, antes bien se relacionan con otras formando las llamadas comunidades microbianas (Madigan *et al.*, 2003).

A continuación se describen las técnicas empleadas para el estudio de las comunidades microbianas.

1.3.1 Métodos dependientes de cultivos

La variación del número de miembros de los linajes microbianos dentro de una comunidad se constituye como el patrón más común usado para describir y comparar las comunidades microbianas. Los métodos tradicionales para el análisis de la comunidad microbiana se basaron principalmente en el cultivo de microorganismos. La principal limitación de los enfoques basados en el cultivo, es que aproximadamente el 80% de todos los miembros de la microbiota gastrointestinal en la actualidad no se pueden cultivar fuera del tracto gastrointestinal (Eckburg *et al.*, 2005). Sin embargo, los avances en los métodos de cultivo de microorganismos han permitido aumentar la fracción de la comunidad que puede ser cultivada y el alto rendimiento de los métodos fenotípicos basados en el cultivo puede ayudar rápidamente a identificar los miembros de la comunidad microbiana con específicas características funcionales.

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. Un material nutritivo preparado para el crecimiento microorganismos en un laboratorio se denomina medio de cultivo. Algunas bacterias pueden crecer bien en casi cualquier medio de cultivo; otras requieren medios especiales y otras no pueden crecer en ninguno de los medios inertes existentes hasta ahora. Los microbios que se introducen en un medio de cultivo para que comiencen a crecer se denominan inóculo. Los microbios que crecen y se multiplican en un medio se denominan cultivo. Para realizar el estudio de microorganismos se han diseñado diversos métodos que han permitido cultivarlos bajo condiciones artificiales.

En la actualidad se dispone de una amplia variedad de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos en el laboratorio. Casi todos esos medios, disponibles en el comercio, están constituidos por componentes mezclados con anterioridad y sólo precisan el agregado de agua y su esterilización. En el estudio de bacterias intestinales los medios más utilizados son: Agar triptona de Soya Tryptone Soy agar (TSA), Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA), Agar Aeromonas (AERO), Agar Pseudomonas (PSEU), Agar MacConkey (MAC), Deman, Rogosa y Sharpe (MRS), Agar Clostridial reforzado (RCA) y una versión modificada de Agar Anacker y Ordal (RIVAOA) (Pond *et al.*, 2006). De manera continua se elaboran y revisan medios de cultivo para ser utilizados en el aislamiento y la identificación de bacterias que son de interés para los

investigadores en los campos de la alimentación, el agua y la microbiología clínica. Cuando se desea que las bacterias se desarrollen sobre un medio sólido se agrega un agente solidificante como el agar. Pocos microorganismos pueden degradar el agar, de modo que permanece en estado sólido, además, el agar se licua a una temperatura de 100°C y al nivel del mar permanece líquido hasta que la temperatura disminuye cerca de los 40°C. Los medios de agar suelen utilizarse en tubos de ensayo o en cajas de *petri* (Tortora *et al.*, 2007).

1.3.2 Métodos no dependientes de cultivos

La historia evolutiva de los seres vivos puede ser contada a través de macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas, ya que estas pueden sufrir cambios al azar en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que las integran, lo cual se ve reflejado de manera lineal en el tiempo. Consecuentemente, esto permite establecer relaciones filogenéticas entre dos seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (Zuckerlandl y Pauling, 1965).

El ARNr 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (16S ADNr). El ARNr 16S en bacterias y arqueas, y ARNr 18S de Eukarya se han utilizado ampliamente para el análisis filogenético de genes (Rodicio y Mendoza, 2004). Los genes de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rRNA) están codificados en los genomas de todos los organismos celulares y son altamente conservados, pero contienen regiones de variabilidad de la secuencia suficiente para distinguir entre grupos específicos de microorganismos. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004).

A mediados de 1990, varias técnicas moleculares para la descripción de la estructura de la comunidad bacteriana se introdujeron a la microbiología intestinal, mediante el análisis de la diversidad de secuencias a partir de los genes que codifican en la región 16S del ADNr, permitiendo obtener datos de secuencias de bacterias del TI, incluyendo a especies no cultivables a la fecha. Lo anterior ha generado que las bases de datos con secuencias de ADN bacterial se hayan expandido dramáticamente, lo que ha permitido

evaluar la biodiversidad en comunidades microbianas provenientes de diferentes ecosistemas naturales.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del 16S ADN incluye cuatro etapas: a) amplificación de los genes a partir de la muestra apropiada; b) separación de los amplímeros, c) determinación de la secuencia de nucleótidos de los amplímeros, y d) análisis de las secuencias. Una vez determinadas las secuencias de los nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los 16S ADN de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio y Mendoza, 2004). Para el estudio de comunidades bacterianas se han empleado una serie métodos que han contribuido al conocimiento de la microbiota de muchos ecosistemas de interés, a continuación se describen las más importantes:

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés): Este proceso permite la amplificación del ADN 16S, ya que puede multiplicar moléculas de ADN hasta miles de millones de veces en el tubo de ensayo, proporcionando grandes cantidades de genes para su clonación, secuenciación o mutagénesis. Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro y en el caso de comunidades complejas, el ADN podrá obtenerse directamente de la muestra. Para la extracción del ADN bacteriano existen protocolos generales pero pueden requerirse modificaciones, dependiendo de la bacteria y/o matriz. La PCR hace uso de ADN polimerasa que copia moléculas de ADN. La técnica de la PCR requiere que se reconozca la secuencia nucleotídica de una región del gen deseado. Esto es necesario porque para que funcione la técnica de amplificación se debe disponer de oligonucleótidos iniciadores cortos, complementarios de secuencias presentes en el gen o genes de interés. Las etapas de amplificación del ADN en la PCR son las siguientes:

En un sintetizador de núcleo se fabrican los dos oligonucleótidos iniciadores que flanquean el ADN diana, y se añaden en gran exceso al ADN diana desnaturalizado por calor; cuando se ha enfriado la mezcla, el exceso de iniciadores relativos al ADN diana asegura que la mayor parte de las cadenas diana hibriden con iniciadores y no entre sí.;

la ADN polimerasa alarga los iniciadores usando las bandas diana como moldes. Después de un periodo de incubación adecuado se calienta de nuevo la mezcla para separar las cadenas. Luego se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se hibriden con las regiones complementarias del ADN recién sintetizado, y se repite todo el proceso. Así, cada ciclo de PCR implica las siguientes etapas: Desnaturalización por calor del ADN bicatenario diana, 2) enfriamiento para permitir el acoplamiento de iniciadores específicos con el ADN diana, y 3) extensión de los iniciadores por la ADN polimerasa (Madigan *et al.* , 2003).

2. PCR cuantitativa o en tiempo real (Q-PCR por sus siglas en inglés): Es un método de PCR cuantitativa, en el cual los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, permitiendo conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004). Hay dos tipos de PCR en tiempo real: los que utilizan sondas y los basados en intercaladores. Ambos métodos requieren un termociclador especial equipado con una cámara sensible que los monitores de la fluorescencia en cada pocillo de la placa de 96 pozos a intervalos frecuentes durante la reacción de PCR (Dorak, 2006). El estudio de comunidades microbológica empleando este método ha sido reportado en trabajos como el de Bartosch y colaboradores (2004) y Matsuki y colaboradores (2004).

3. Electroforesis en gel de gradiente denaturante (DGGE, por sus siglas en inglés): Este método de huellas moleculares, separa tamaños similares (pb), pero de diferentes secuencias de los productos de PCR utilizando gel de acrilamida que contiene gradiente denaturante de urea y formamida. La separación se basa en la disminución de la movilidad electroforética de una molécula de ADN de doble cadena parcialmente denaturada, en los geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal de desnaturantes de ADN (una mezcla de urea y formamida). Al correr el ADN en el gel, la molécula se mantiene como doble cadena hasta que alcanza la concentración denaturante, reduciendo su movilidad en el gel. En teoría, cualquier gen de ARN que se

encuentre en el ADN total de la comunidad puede ser amplificado por PCR y resuelto en un gel DGGE, ya que en este tipo de análisis cada banda en el gel es considerada como una especie distinta en la comunidad y la intensidad de las bandas es tomada como un reflejo de la abundancia de esa secuencia en la comunidad (Muyzer y Smalla, 1998; De Souza *et al.*, 2004).

4. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP's, por sus siglas en inglés): El análisis de fragmentos de restricción terminales es actualmente uno de los métodos más poderosos que existen dentro del campo de la ecología microbiana para comparar rápidamente la diversidad de secuencias de ADN bacteriano amplificado por PCR de muestras ambientales. El método se basa en la variación en la posición de sitios de restricción entre las secuencias y en la determinación de la longitud de fragmentos terminales de restricción marcados con fluorescencia y analizados por medio de electroforesis en geles de alta resolución en secuenciadores de ADN. El resultado es una distribución de abundancia de fragmentos de diferentes tamaños. El método puede ser usado para identificar diferenciación de comunidades, para comparar la riqueza relativa de filotipos y estructura de comunidades, y para identificar organismos específicos en una comunidad a partir de la clonación y secuenciación de fragmentos específicos del 16S ADN_r de dicha comunidad. A pesar de que éste es un método rápido de análisis comparativo de comunidades tiene relativamente baja resolución. Esto se debe a que existe cierta probabilidad de que varios filotipos se encuentren representados por un solo tamaño de fragmento y representen un solo pico en la distribución; esto puede llevar, nuevamente, a subestimar la riqueza de especies, la cual puede ser calculada por otros métodos con mayor resolución filogenética, pero a mucho mayor costo (De Souza *et al.*, 2004).

5. Análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado, (ARDRA, por sus siglas en inglés): Esta es una técnica de huella de ADN que se usa para caracterizar comunidades y poblaciones. Consiste en amplificar por PCR el gen 16S ADN_r de la comunidad total, aislar las diferentes copias que se encuentran en la mezcla y, posteriormente, someter a cada una de las copias a digestiones enzimáticas (restricción); también puede digerirse la muestra total (sin separar las copias) (De Souza *et al.*, 2004).

6. **Hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas ingles):** Es un método usado principalmente con comunidades procariontes y permite la identificación y cuantificación directas de grupos taxonómicos generales o específicos dentro de su ambiente natural. Con FISH todas las células son fijadas y su 16S o 23S ADN_r se hibridiza con sondas de oligonucleótidos de un taxón específicos y marcados con fluorescencia. Posteriormente, las células que hibridaron y quedaron marcadas pueden verse en un microscopio óptico de fluorescencia. Con este método y gracias a que las células completas se hibridan, se evitan artefactos generados por sesgos en la extracción de ADN, amplificación por PCR y clonación. FISH puede usarse para observar organismos no cultivados y es útil para estudiar la distribución ecológica de los organismos a través de hábitats diversos. Tal vez el aspecto en el que se debe tener más cuidado cuando se utiliza el FISH es en el diseño de la secuencia de las sondas de hibridación, ya que de ello depende que se logre una buena caracterización de la comunidad (De Souza *et al.*, 2004).

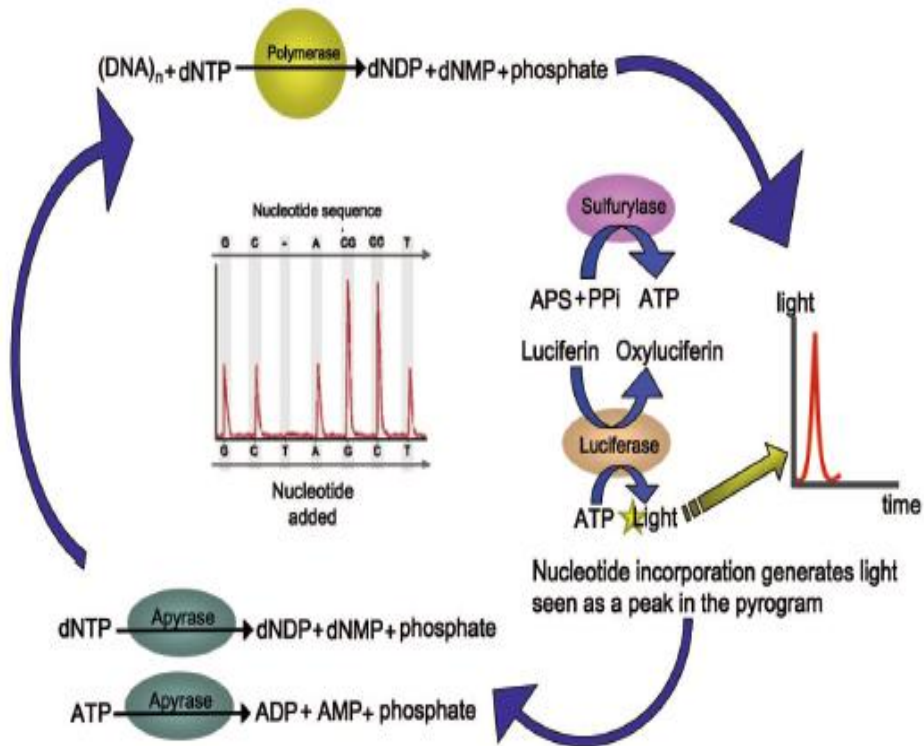
7. **Pirosecuenciación:** La pirosecuenciación del ADN o secuenciación por síntesis, fue desarrollada a mediados de 1990 como un enfoque fundamentalmente diferente de secuenciación del ADN (Petrosino *et al.*, 2009). La pirosecuenciación es un método de secuenciación del ADN basado en la monitorización en tiempo real de la síntesis de ADN, la cual permite el análisis de secuenciación de ultra-alto rendimiento, ofreciendo hasta 350.000 lecturas de 100 bases por corrida en la versión inicial y 1.000.000 lecturas de 400 bases en la versión más reciente (Nakayama, 2010). La secuenciación por síntesis ocurre por una ADN polimerasa que conduce a la generación de fosfato inorgánico, con la formación ATP (Adenosín trifosfato) y la conversión ATP-dependiente de luciferin a oxiluciferina (Ver Figura 1-5). La generación de oxiluciferin provoca la emisión de pulsos de luz, y la amplitud de cada señal es está directamente relacionada a la presencia de uno o más nucleósidos. Una importante limitación de la pirosecuenciación está relacionada al largo de la secuencia de la cadena de ADN (secuencias raramente exceden las 100–200 bases con la primera y segunda generación de pirosecuenciación). El termino 454 de pirosecuenciación se refiere a una plataforma de secuenciación de alto rendimiento (Roche/454 Life Sciences) para metagenómica que están basadas en la química de la pirosecuenciación. (Petrosino *et al.*, 2009). La secuenciación por síntesis ha sido aplicada con éxito a una variedad de estudios, incluyendo genotipación, detección de polimorfismos de nucleótidos únicos e identificación de microorganismos (Marsh, 2007) a partir del análisis de regiones

hipervariables dentro del gen ADNr 16S, inclusive ha sido empleada para detectar mutaciones puntuales. (Petrosino *et al.*, 2009).

A continuación se citan algunos estudios que utilizaron esta herramienta molecular para el análisis de la diversidad microbiológica de algunos ecosistemas:

Jones y colaboradores (2009) al trabajar con suelos se utilizó el método de pirosecuenciación para estimar la abundancia relativa de Acidobacteria en cada comunidad bacteriana mediante la comparación del número de secuencias clasificados como pertenecientes a la Acidobacteria contra el número de secuencias bacterianas clasificadas por muestra. Buée y colaboradores (2009) realizaron un análisis de los suelos forestales revelan una diversidad de hongos inesperadamente alta, mediante pirosecuenciación. Roesch y colaboradores (2007) evaluaron mediante pirosecuenciación del ADN la diversidad bacteriana en cuatro suelos a través de un transecto en el hemisferio occidental. El número de secuencias bacterianas obtenidas a partir del 16S ADNr de cada sitio varió entre 26140 a 53533. Los grupos de microorganismos más abundantes en los cuatro suelos fueron los Bacteroidetes, Betaproteobacteria y Alphaproteobacteria. Investigadores de la Universidad de Washington, compararon la microbiota intestinal de personas obesas vs delgadas sugieren que ésta en las personas obesas es muy diferente a la de individuos delgados mediante pirosecuenciación (Turnbaugh *et al.*, 2006 en: Droege y Hill, 2008). Dowd y colaboradores (2008) evaluaron la diversidad de bacterias en las heces de ganado a partir del 16S ADNr bacteriano, empleando amplímeros para aplicar el método de FLX de pirosecuenciación. Mayorga (2009) realizó un análisis microbiológico del rumen a través del método de pirosecuenciación el cual permitió determinar ciertos filotipos de bacterias asociadas al rumen.

Figura 1-5: Química de la pirosecuenciación: reacciones bioquímicas y enzimas involucradas en la generación de señales de luz por pirosecuenciación del ADN² (Petrosino *et al.*, 2009).



² Cada pico en el pirograma representa un pulso de luz detectado en el instrumento. dNTP, deoxinucleosidos trifosfatos; dNDP, deoxinucleosidos difosfatos; dNMP, deoxinucleosidos monofosfato; PPI, pirofosfato; APS, adenosine 5'-fosfosulfato.

2. Materiales y métodos

Este estudio se realizó en la estación piscícola la Terraza en comodato de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en Villavicencio (Meta) a 467 msnm, a temperatura promedio de 27°C, humedad relativa del 80% y precipitación anual de 6694 mm. El análisis de las muestras se llevó en los laboratorios de Microbiología Molecular y Nutrición Animal del centro de investigación de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), ubicada en el km 14 vía Mosquera, departamento de Cundinamarca. Además, este estudio fue llevado a cabo como parte complementaria del proyecto realizado por el estudiante de Maestría, Diego Rodríguez de la Facultad de Zootecnia y Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, quien diseñó toda la estrategia concerniente al manejo del cultivo de la tilapia y las dietas experimentales suministradas a los peces.

2.1 Aceites esenciales de orégano (AEO)

Los aceites esenciales empleados fueron de origen comercial y nativo, el primero de ellos fue el aceite esencial de *Oreganum vulgare spp* Hirtum con alto contenido en carvacrol (90,3%, Ver Tabla 2-1) distribuido por Ralco Nutrition Inc. El segundo, fue obtenido a partir de plantas orégano nativo (*Lippia origanoides*) con alto contenido en timol (72,3%, Ver Tabla 2-1) recolectados en el Alto Patía de las veredas Alto de Mayo, San Juanito y Las Juntas-Viento Libre ubicadas en los municipios de Taminango en el Norte del departamento de Nariño y Mercaderes al Sur del Cauca y extraídas por el método de hidrodestilación³. Estas plantas fueron clasificadas taxonómicamente por Luis Eduardo

³ Técnica de extracción que consiste en hervir una suspensión de la planta aromática con agua, condensando los vapores. El aceite no miscible con el agua, se separa al condensarse debido a diferencias de densidades. El agua se calienta generalmente a través de fuego directo, o por medio de un serpentín o camisa de vapor. La cantidad de agua debe ser suficiente para generar el proceso de destilación; en caso contrario, el material podría recalentarse y quemarse (Sharapin, 2000).

Forero, director del Herbario José Cuatrecasas Arumí, Sede Palmira, y se describe a continuación:

Dominio: *Eukaryota* Whittaker & Margulis, 1978-eukaryotes
Reino: *Plantae* Haeckel, 1866 - plantas
Subreino: *Viridaeplantae* Cavalier-Smith, 1981 – plantas verdes
Phylum: *Tracheophyta* Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998 – plantas vasculares
Subphylum: *Spermatophytina* (auct.) Cavalier-Smith, 1998 – plantas de semilla
Infraphylum: *Angiospermae* auct.
Clase: *Magnoliopsida* – Brongniart, 1843-dicotiledóneas
Subclase: *Lamiidae* Takhtajan ex Reveal, 1992
Superorden: *Lamianae* Takhtajan, 1967
Orden: *Lamiales* Bromhead, 1838
Familia: *Verbenaceae* (ver-be-NAY-see-ay) Jaume Saint- Hilaire, 1805, nom. Cons.
Tribu: *Lantaneae*
Género: *Lippia* (LIP-pee-uh) Linnaeus, 1753- Lippia
Epíteto específico: *origanoides* Kunth
Nombre botánico: *Lippia organoides* H.B. & K.

Tabla 2-1: Composición relativa de AEO de *Lippia organoides* y *Oregano vulgare* Hirtum.

Localidad	Carvacrol	Timol	ρ -Cimeno	γ -Terpireno	Compuestos entre 1,0 y 4,0% *	Compuestos menores al 1%**
<i>Oregano vulgare</i> Hirtum	90,3	3,5	2,7	1	1	2,7
<i>Lippia organoides</i>	1,1	72,3	7,7	3,6	8,3	5,4

Fuente: Vásquez, 2011. *Los compuestos entre el 1,0 y el 4,0 % son: trans- β -cariofileno, α -humuleno, timol metiléter, terpinen-4-ol y acetato de timilo. **Los compuestos con una concentración $\leq 1,0$ % son α -pineno, β -mirceno, α -felandreno, γ -3-careno, α -terpineno, limoneno, β -felandreno, eucaliptol, trans- β -ocimeno, cis-hidrato de sabineno, terpinoleno, linalool, trans-hidrato de sabineno, umbellulona, cis- α -bergamoteno, γ -muuroleno, viridifloreño, sesquiterpenol, β -bisaboleno, óxido de cariofileno y epóxido II humuleno.

2.2 Cultivo de la tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Los animales del experimento fueron cultivados en la unidad de crecimiento que cuenta con: a) un galpón de 8 m x 21 m para instalación de los tanques, b) dos biofiltros contruidos con dos tanques plásticos circulares (1000 L) conteniendo gravilla de diferentes diámetros, conchas marinas y arena para asegurar la calidad del agua suministrada durante la recirculación, c) dos bombas sumergibles (una para cada biofiltro) para transportar el agua desde el biofiltro hacia el sistema, d) Un "blower" (1 HP) para aireación del sistema, e) y treinta tanques plásticos circulares (560 L) para alimentación y mantenimiento de los peces, de los cuales se usaron durante el ensayo 24 tanques (Ver Foto 2-1).

Para la selección del material biológico se utilizaron larvas con un peso promedio de 5 g, 600 individuos reversados fueron seleccionados de una empresa de recría y trasladados a las instalaciones experimentales. Las larvas se obtuvieron de un mismo pie de cría, libre de enfermedades, sin deformidades, buena actividad natatoria, buen color y con excelentes características fenotípicas, manejados bajo un mismo régimen nutricional. Las larvas fueron criadas por dos meses hasta que alcanzaron el tamaño de alevino (10-14 g). Los alevinos (528) fueron seleccionados en una muestra homogénea (mediana \pm 1 DS) y alojados de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar a una razón de 22 alevinos por tanque. Cuando los alevinos obtuvieron un peso promedio de 40 g, de los 22 se seleccionaron 10 animales por tanque, los cuales fueron marcados de forma individual mediante marcadores electrónicos especializados a los 30 días para un seguimiento sistémico del proceso de crecimiento, a partir de los 45 días se alojaron 15 animales/tanque, mientras a los 105 días del estudio se alojaron 10 peces por tanque de 560 L hasta finalizar el engorde. Los tanques plásticos fueron provistos de aireación y recirculación de agua continua, con un recambio diario del 10% del volumen del agua (Rodríguez *et al.*, 2011).

Foto 2-1: Instalaciones y tanques experimentales de la estación piscícola la Terraza.



2.3 Dietas experimentales

El sistema de alimentación fue formulado por Diego Rodríguez (Estudiante de Maestría, Facultad de Zootecnia y Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia) con el programa "User-Friendly Feed Formulation, Done Again" (UFFDA, 1992) desarrollado por la Universidad de Georgia, EEUU, su composición se presenta en la Tabla 2-2. El sistema de alimentación fue por fases, para las etapas de producción levante, pre-engorde y engorde, así: una dieta tipo comercial para juveniles en crecimiento 1 (38% de proteína cruda) que fue suministrada cinco veces al día durante los 45 días del periodo. Una dieta comercial fue formulada (32% de proteína cruda) durante el crecimiento 2, suministrada tres veces al día. Durante el periodo de engorde y hasta alcanzar el peso comercial, una dieta (29% de proteína cruda) y suministrada tres veces al día. Las dietas fueron procesadas el equipo prototipo de extrusión *Ex Laboratorio* (Exteec®). Los gránulos obtenidos se secaron en un horno con circulación abierta a 55 °C x 24 h. Una vez los pellets fueron secados, se adiciono en forma lenta y homogénea 200 ppm de AEO teniendo en cuenta la proporción de carvacrol: timol para los tratamientos establecidos (Ver Tabla 2-3), como vehículo de inclusión de los AEO se empleó aceite vegetal de girasol.

Tabla 2-2: Composición de las dietas en diferentes etapas de producción de la tilapia.

Ingrediente	Unidad	Fase Levante	Fase Pre-engorde	Fase Engorde
Maíz	%	2,97	14,49	21,09
Arroz Molido	%	20,00	20,00	20,00
Torta de Soya-48	%	33,35	28,48	21,97
Soya cocida	%	1,66	0,00	0,00
Gluten de Maíz-60	%	5,00	5,00	5,00
Aceite de girasol	%	0,15	0,16	0,17
Aceite de pescado	%	0,51	0,65	0,83
Salvado de trigo	%	8,00	8,00	8,00
Harina de pescado-65	%	11,00	11,00	11,00
Harina de pescado nacional	%	14,64	7,36	6,60
Sal común	%	0,15	0,15	0,15
Cloruro de colina	%	0,10	0,10	0,10
BHT (Beta-hidroxi-tolueno)	%	0,05	0,05	0,05
CaCO ₃ (carbonato de calcio)	%	2,03	4,16	4,64
Rovimix (pre mezcla mineral vitamínica)	%	0,33	0,33	0,33

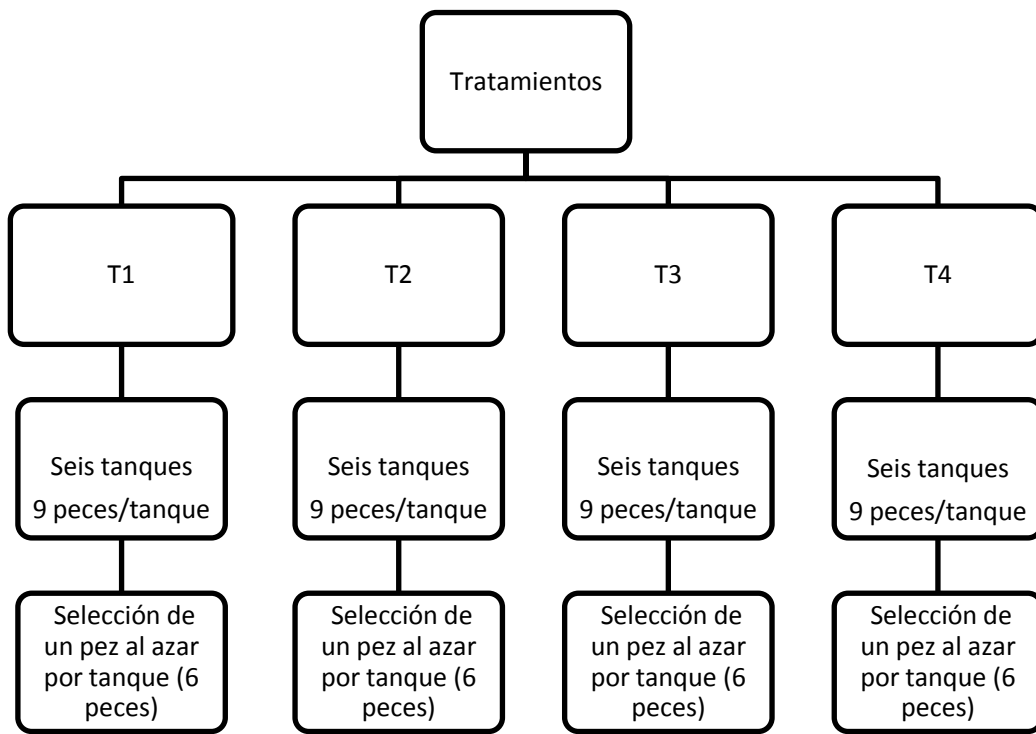
Fuente: Rodríguez *et al.*, 2011

Tabla 2-3: Relaciones de carvacrol/timol de AEO incluidas en la formulación de las dietas experimentales para tilapia.

Tratamiento	Nombre	Relación contrastante carvacrol: timol
1	Control sin suplementar	0:1
2	Alto Timol	0,15:1
3	Mezcla	3,25:1
4	Alto Carvacrol	6,5:1

Para todos los tratamientos fueron usados veinticuatro tanques, distribuidos en seis tanques por tratamiento con nueve peces en cada uno de ellos (Ver Figura 2-1 y Foto 2-1). Para el muestreo del TI se tomó al azar un pez por tanque, con un total de seis peces por tratamiento para un total de 24 tractos intestinales.

Figura 2-1: Esquema de definición de tratamientos experimentales.



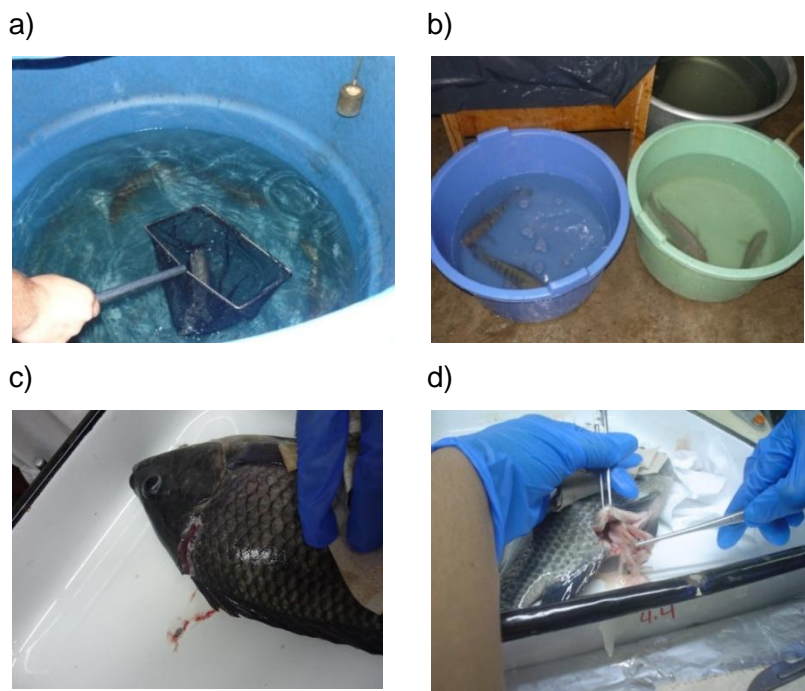
2.4 Colección y procesamiento de los tractos intestinales de tilapia

Los peces con una edad adulta de 183 días y peso promedio de 550 g, fueron colectados de cada tanque mediante redes, inmediatamente identificados y registrados; posteriormente fueron anestesiados utilizando una solución de aceite de clavo (10 ppm – Eugenol®) hasta que se observó que el pez perdió su eje de nado y transportados al laboratorio de la Estación Piscícola donde fueron sacrificados mediante un corte sagital de la medula espinal.

Las muestras intestinales de tilapia nilótica (*O. niloticus* var. Chitralada) fueron extraídas asépticamente mediante disección (corte en la parte ventral) de 24 peces adultos seleccionados al azar de los 24 tanques experimentales (Ver Foto 2-2). Los tractos intestinales fueron empacados en bolsas con sellado hermético previamente

etiquetadas, congelados a -20°C y transportadas el mismo día de la colecta, manteniendo la cadena de frío, al laboratorio de microbiología molecular de CBB-CORPOICA, donde fueron congeladas a -70°C y secadas por liofilización (*Heto-DRYWINNER*, USA) para su posterior análisis.

Foto 2-2: Muestreo de los tractos intestinales de tilapia. a) Colecta de peces; b) Adormecimiento de peces en solución acuosa con Eugenol®; c) Sacrificio mediante corte sagital; d) Extracción del tracto intestinal de tilapia.



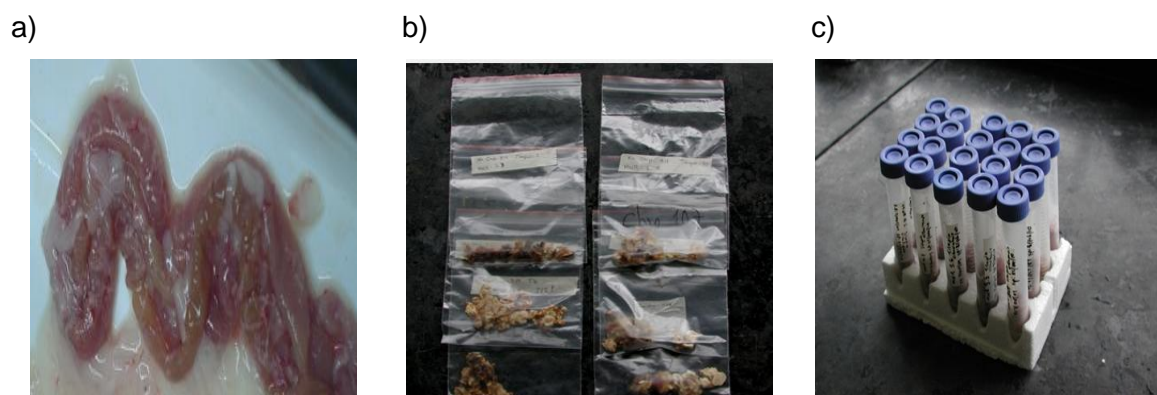
2.5 Selección de protocolo de extracción de ADN total del TI tilapia

La apropiada extracción del ADN en matrices complejas, es un aspecto crítico en estudios basados en PCR y esto asociado a la no disponibilidad de un protocolo único para la extracción del ADN de TI de tilapia, hizo necesario comparar dos protocolos comerciales de extracción de ADN para suelos (*PowerSoil®* ADN Isolation, MO BIO, EUA) y para materia fecal (*QIAamp®* Isolation, QIAGEN, Alemania) y un protocolo modificado para la extracción de ADN total de muestras de contenido ruminal (Yu y Forster, 2005) . Estos protocolos fueron seleccionados debido a su disponibilidad, costo,

facilidad de uso, popularidad, diferencias en los procesos de lisis celular y tipo de matriz compleja a que estaban destinados.

Los ensayos de evaluación de los protocolos fueron realizados en cuatro muestras de TI de tilapia nilótica pertenecientes a los cuatro tratamientos experimentales detallados en la sección 2.3, con tres replicas para cada uno, procesadas de acuerdo a lo descrito en la sección 2.4. Los intestinos liofilizados fueron macerados con mortero bajo condiciones asépticas para homogenizar las muestras y se almacenaron hasta su análisis a -70°C en tubos tipo Falcón de capacidad de 15 mL (Ver Foto 2-3).

Foto 2-3: Procesamiento de las muestras de TI de tilapia para extracción del ADN total. a) Muestras frescas de TI; b) Muestras de TI secadas por liofilización; c) Muestras de TI maceradas.



La selección del método extractivo más adecuado para el manejo de todas las muestras de estudio detallados en la sección 2.3, se determinó con base en la evaluación de dos variables: 1) cantidad de ADN total obtenido ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y 2) calidad en términos de pureza del ADN (260/280), determinados por el espectrofotómetro NanoDrop® ND- 1000 versión 3.3. (Wilmington, Delaware, Estados Unidos). La calidad del ADN se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa 1,4%, (0.56 g de agarosa fue disuelta en 40 mL de TAE 1X (Tris-acetato EDTA) y sometida a calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición, luego se adicionó $0,3 \mu\text{L}$ de SYBR Safe (Invitrogen®) para teñir el gel antes de servir en cámara), se empleó $5 \mu\text{L}$ de un marcador de masas (Mass Ruler ADN Ladder ®Fermentas) peso molecular de 1031 pb. El corrido electroforético se realizó a 73 V por 40 minutos, utilizando TAE 1X (Tris-acetato EDTA)

como buffer de corrida. Los geles se visualizaron en equipo documentador de imágenes Gel Doc® (Bio-Rad).

Los resultados de cada protocolo de extracción en términos de concentración y pureza del ADN se analizaron mediante un análisis de varianza con un diseño factorial 3 x 4, en el cual, los efectos del método, el tratamiento y la interacción se determinaron a través del procedimiento GLM del paquete estadístico SAS versión 9.2, además se hizo un análisis de la comparación de medias por el método de Tukey (Chew, 1976) del mismo paquete estadístico.

La ecuación que define el diseño estadístico mencionado anteriormente es la siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor observado para la variable

μ = Promedio general

A_i = Efecto i-ésimo método de extracción

B_j = Efecto j-ésimo tratamiento experimental

$(AB)_{ij}$ = Interacción método de extracción y tratamiento experimental

e_{ijk} = Error experimental

2.5.1 Protocolo basado en la extracción de ADN de comunidades microbianas de matrices de suelos

El primer protocolo comercial evaluado fue el PowerSoil® ADN Isolation (MO BIO, EUA) usado tradicionalmente para la extracción de ADN de matrices de suelos, el procedimiento fue seguido de acuerdo a la recomendación del fabricante con modificaciones en el peso de la muestra, como es descrito a continuación:

Se pesaron 50 mg de muestra liofilizada de TI en los tubos PowerBead, seguidamente se homogenizo con vortex, se añadió 60 μ L de la solución llamada C1, que contiene dodecilsulfato sódico y otros agentes para lisis celular. La suspensión se agitó brevemente, y se agitó fuertemente en vortex por 10 minutos. Seguidamente se

centrifugaron los tubos a 10000 *g* durante 30 segundos. Se tomaron 400 μ L del sobrenadante y se transfirieron a tubos nuevos de 2 mL y se añadió 250 μ L de la solución C2 (reactivo de precipitación del ADN y otros componentes celulares) y se agitó durante 5 segundos, seguido a esto se incubaron los tubos a 4°C durante 5 minutos. Luego de este lapso se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 *g*. Se tomó 600 μ L de sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio de 2 mL. Luego se adicionó 200 μ L de la solución C3 (reactivo de precipitación del ADN y otros componentes celulares) a cada tubo con sobrenadante y se agitaron brevemente, luego se incubó a 4°C durante 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 *g* y se transfirieron no más de 750 μ L de sobrenadante en un nuevo tubo de 2 mL, y se les adicionó 1200 μ L de la solución C4 (solución concentrada de sal) al sobrenadante y se agitó durante 5 segundos. Luego se cargó aproximadamente 675 μ L de esta mezcla anterior en un tubo con filtro y se centrifugó a 10000 *g* durante 1 minuto a temperatura ambiente, descartando el flujo, este paso se repitió dos veces más. Luego se le añadió al filtro 500 μ L de la solución C5 (solución de etanol) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 *g* y se descartó el flujo. Se centrifugó nuevamente durante 1 minuto a 10000 *g* para desechar residuos de la solución C5 y con cuidado, se colocó el filtro en un tubo limpio de 2 mL, y se le añadió 100 μ L de la solución C6 en el centro de la membrana del filtro, se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 *g* y se desechó el filtro. El ADN en el tubo quedó listo para su uso posterior. Se almacenó el ADN congelado (-20°C).

2.5.2 Protocolo basado en la extracción de ADN de comunidades microbianas de matrices de heces

En el segundo protocolo la extracción del ADN de las muestras de TI de tilapia fue inicialmente evaluado empleando el protocolo de extracción comercial para ADN diseñado para heces (QIAamp® Isolation of DNA from Stool Samples, QIAGEN, Alemania). El procedimiento de extracción del ADN fue seguido de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, con una modificación en la cantidad de muestra. El procedimiento seguido fue el siguiente:

En tubos de capacidad de 2 mL, se pesaron 10 mg de muestra de TI liofilizado y macerado y se colocaron inmediatamente en un baño de hielo; se les adicionó 1,6 mL de buffer ASL (Mezcla de sustancias lisadoras como dodecil sulfato de sodio y ácido edético) y se agitó en vortex un minuto hasta homogenizar la muestra, después se centrifugaron las muestras a 13000 g por un minuto. Se tomo 1,4 mL del sobrenadante en un nuevo tubo y se descartó el pellet. Al sobrenadante se le adicionó una tableta de inhibitex y se agitó inmediatamente en vortex hasta su completa disolución. Seguido a este paso, se incubó la suspensión por un minuto en cuarto atemperado (a 20°C dentro de la centrifuga) permitiendo que los inhibidores absorbieran la matriz inhibitex. Esta solución fue centrifugada a 13000 g por tres minutos para que la muestra y los inhibidores se ligaran a la matrix inhibitex, este paso se repitió dos veces. El sobrenadante fue transferido completamente a un nuevo tubo de 1,5 mL y se descartó el pellet, nuevamente se centrifugó por 3 minutos para remover los residuos.

En un tubo nuevo de 2 mL se adicionó 25 µL de proteinasa K, y luego se adicionaron 600 µL del sobrenadante del centrifugado a cada tubo con el contenido de la proteinasa (no directamente la proteinasa K sobre la muestra), y se adicionó 600 µL de buffer AL que contiene sustancias lisadoras e hidrocloreuro de guanidina. Todo éste contenido se agitó en vortex por 15 segundos y se incubó a 70°C por 10 minutos; pasado el tiempo de incubación se adicionó 600 µL de etanol (96-100%) al lisado y se mezcló por vortex. Cuidadosamente se aplicaron 600 µL del lisado anterior a la columna de un nuevo tubo tubo, se cerró cuidadosamente la tapa y se centrifugó a 13000 g por un minuto y se descartó el tubo que tenía el filtrado, luego se retiró cuidadosamente la columna y se colocó en un tubo nuevo, y se añadió una segunda alícuota de 600 µL del lisado y se centrifugó a toda velocidad por 1 minuto, este paso se repitió una vez más con una tercera alícuota del lisado restante. Cuidadosamente se abrió la columna QIAamp y se adicionó 500 µL de buffer AW1 que contiene sustancias lisadoras, se cerró la tapa y se centrifugó a 13000 g durante un minuto y se descartó el tubo colector. La columna se colocó en un nuevo tubo de 2 mL y se le adicionó 500 µL de buffer AW2 que contiene azida de sodio como preservativo, luego se centrifugó por 3 minutos y se descartó el tubo colector, luego la columna se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL y se le adicionó 200 µL del buffer AE directamente en la membrana QIAamp, se cerró la tapa y luego se incubó por 1 minuto en cuarto atemperado, por ultimo para recuperar el ADN, se centrifugó a toda velocidad por 1 minuto y se almacenó el ADN a -20°C.

2.5.3 Protocolo basado en la extracción de ADN de comunidades microbianas de contenido ruminal

El tercer protocolo evaluado está basado en la extracción de ADN total de contenido ruminal empleando pasos de lisis química, lisis mecánica y choque térmico. Para la extracción de ADN de TI liofilizado y macerado, este protocolo fue adaptado. A continuación se describen las etapas del proceso de extracción:

Se pesaron 20 mg de muestras de TI de tilapia liofilizada en tubos con perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. A cada tubo luego se les adicionó 1000 µL de buffer de lisis (2% SDS, 100 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, 200 mM NaCL), 100 µL de solución de acetato de potasio y 100 µL de agua destilada desionizada, y se agitó la suspensión para homogenizar en Beat beater por dos minutos. Luego las muestras se congelaron rápidamente a -70°C por 10 minutos en nevera y se sometieron a choque térmico sumergiéndolos en agua caliente (en ebullición), seguido agitación mecánica por 4 minutos en Beat beater, este paso se realizó dos veces. Inmediatamente se adicionó 6 µL de la solución de lisozima (30 mg/mL) y se mezcló brevemente en vortex, seguido de incubación en baños de maría por 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras 13000 g a 4°C durante 15 minutos, y se transfirió 300 µL del sobrenadante a un tubo de 1,5 mL y se les adicionó 600 µL de glass milk (3M Guanidine Isotiocianato, 5 gramos de silica) a cada tubo, inmediatamente se mezclaron por inversión manual durante 5 minutos. Después se centrifugaron a 10000 g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 500 µL de etanol frío al 70% y se agitó en vortex hasta homogenizar. Luego se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante, seguidamente se dieron varias centrifugaciones para retirar el etanol residual por evaporación (3 spin finales de 1 minuto cada uno y cuidadosamente se removió el sobrenadante restante). Los tubos con el pellet adherido se dejaron secando por inversión sobre papel absorbente limpio durante toda la noche. En el día siguiente se resuspendió el pellet formado en 100 µL de agua grado molecular y se centrifugaron los tubos a 10000 g por 2 minutos para recuperar el sobrenadante de ADN en tubos de 0,2 mL, las muestras fueron almacenadas a -20°C para análisis posteriores.

2.6 Comparación de las huellas moleculares para la región 16S ADNr de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de tilapia

Para evaluar los cambios en la diversidad bacteriana del TI de la tilapia por efecto de los AEO con diferentes proporciones de carvacrol:timol (Sección 2.3) se tomaron las 24 muestras intestinales como fue descrito en la sección 2.4. El análisis de la comunidad bacteriana se realizó basada en la región 16S ADNr siguiendo las etapas: 1) extracción del ADN total del TI por el protocolo descrito en la sección 2.5.3; 2) cuantificación de la población bacteriana total amplificando la región hipervariable V3 por PCR en tiempo real cuantitativo (Q-PCR); 3) Identificación de las poblaciones bacterianas presentes en el TI amplificando la región hipervariable V8-V9 por PCR convencional, seguida de la secuenciación utilizando la técnica de pirosecuenciación (454 - GS FLX Titanium de Roche); 4) clasificación taxonómica de las secuencias, empleando el programa Sequence Match del RDB (Ribosomal DataBase Project) y 5) análisis de la diversidad bacteriana empleando el programa estadístico PAST Palaeontological Statistics, versión 1.24 (2004). Estas etapas son descritas en detalle en las siguientes secciones.

2.6.1 Extracción del ADN total del tracto intestinal de Tilapia

De las muestras tomadas de TI de tilapia descritas en la sección 2.4, se extrajo el ADN total por duplicado, usando el protocolo de la sección 2.5.3. La cantidad del ADN de cada muestra es reportada en ng/ μ L y la pureza según la relación de absorbancias determinada a 260 y 280 nm por el espectrofotómetro NanoDrop® ND- 1000 versión 3.3. (Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Los ADN extraídos fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

2.6.2 Cuantificación de las poblaciones bacterianas por Q-PCR

A partir del ADN obtenido en la sección anterior, se realizó la cuantificación de bacterias totales presentes en el tracto intestinal siguiendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en el termociclador iQ Cycler, (Bio Rad®, Hercules, California, Estados Unidos). A continuación se describen las etapas realizadas para la cuantificación del ADN bacteriano.

1. Preparación de la curva estándar de ADN bacteriano

Para determinar la cuantificación absoluta de las poblaciones bacterianas, se construyó inicialmente una curva estándar de ADN bacteriano, preparada de cantidades equimolares de ADN de 4 cultivos axénicos de las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028 y *Bifidobacterium breve* ATCC 15700. Estas cepas fueron reactivadas en medio LB, incubándose a 37°C durante 24 horas. Luego se recuperó la biomasa a partir de los medios de cultivo mediante tres pases de centrifugación y tomando los pelletizados. La extracción del ADN de estos pellets se realizó con el protocolo descrito en la sección 2.4.3. La cuantificación (ng/μL) y la pureza (relación 260/280 entre un rango de 1.8 – 2.0) se determinó por Nanodrop ND-100. La concentración para cada cepa se ajustó a una concentración de 20 ng/μL y se mezclaron en un vial hasta un volumen final de 100 μL. La mezcla se ajustó hasta una concentración final de 10 ng/μL y a partir de esta se hicieron diluciones seriadas (1/10) hasta alcanzar una concentración de 10⁻³ ng/μL. La curva de calibración se realizó con cinco diluciones así: 10¹, 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ ng/μL y tres replicas por dilución.

2. Cuantificación del ADN bacteriano total en el tracto intestinal de tilapia

A partir de la extracción y cuantificación del ADN del TI de tilapia (ng/μL) realizado en la sección 2.6.1, se efectuaron las diluciones de las 24 muestras de ADN las cuales fueron ajustadas a una concentración de 10 ng/μL. Para la cuantificación absoluta de las bacterias totales presentes por Q-PCR. Se emplearon los iniciadores para la región 16S ADNr que determinan el grupo de bacterias totales (Ver Tabla 2-4). La mezcla de reacción se preparó adicionando para cada reacción de 15 μL de Q-PCR: 3 μL de ADN de la muestra a una mezcla de 12 μL que contenía 7,5 μL de Platinum SYBR Green Supermix (Invitrogen®), 3,6 μL de agua grado molecular y 0,45 μL de cada iniciador en una concentración de 10μM, y las condiciones de PCR en tiempo real establecidas se muestran en la Tabla 2-5. La temperatura de disociación (T_m) de los fragmentos amplificados se determinó mediante ciclos repetitivos de aumento y disminución de temperatura de 95°C por 2 min y luego 80 repeticiones de 60°C por 15 s y 95°C por 15 s, cada reacción fue realizada por triplicado sobre la placa de 96 pozos y sellada con una lamina óptica (Optical tape). La eficiencia de la reacción de PCR-TR se determinó utilizando el software del iQCyler (Bio Rad®), versión 3.1. Una curva de calibración apropiada fue definida de acuerdo al coeficiente de correlación >0,97 y los datos

generados por la reacción con eficiencia entre 90 y 110% fueron usados para este estudio (Mayorga, 2009). Los datos de concentración de ADN en las muestras fueron expresados en términos del Log_{10} de la concentración de ADN bacterial (ng g^{-1}) de acuerdo con Mayorga (2009) y adaptados de Zhou y colaboradores (2010) para materia seca.

Tabla 2-4: Iniciadores para evaluar la cantidad de bacterias totales del tracto intestinal de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Denman y McSweeney, 2005).

Blanco	Iniciadores	Secuencia	Amplímero
Bacterias totales	BT IAEA-For	5'CGGCAACGAGCGCAACCC 3'	130 pb
	BT IAEA-Rev	5' CCATTGTAGCACGTCTGTAGCC 3'	

Tabla 2-5: Condiciones de reacción establecidas para determinar las concentraciones de bacterias totales del tracto intestinal de tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Ciclo	Paso	Temperatura	Duración
1 (1X)	1	50.0°C	02:00
	2	95.0°C	02:00
2 (45X)	1	95.0°C	00:15
	2	60.0°C	01:00
3 (1X)	1	95.0°C	02:00
4 (80X)	1	60.0°C	00:15
Incrementar la temperatura después del C.2 en 0.5°C			
5	1	95.0°C	00:15

3. Análisis estadístico de la cuantificación de ADN bacteriano por Q-PCR

El análisis estadístico para los datos de cuantificación del ADN bacteriano por Q-PCR comprendió un análisis de varianza empleando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS v. 9.2., con el fin de verificar si existen diferencias significativas en la concentración de ADN bacteriano en el TI de tilapia por efecto de los AEO en las dietas.

2.6.3 Identificación de las poblaciones bacterianas presentes en el tracto intestinal de tilapias

Para realizar la pirosecuenciación de la región V8-V9, usando la plataforma 454 - GS FLX Titanium, Roche y posterior identificación de las bacterias presentes en el TI se debe seguir los siguientes pasos:

1. **Diseño y verificación de los cebadores:** Doce parejas de iniciadores fueron seleccionadas para evaluar poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (Ver Tabla 2-6), para esto se realizó un ensayo con una muestra de ADN extraída del TI de una tilapia del control. Los iniciadores para bacterias totales empleados fueron Forward DG74: con secuencia 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' y el iniciador Reverse RW01 con secuencia: 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3' (Jordan *et al.*, 2005), estos dos iniciadores tiene unido al inicio de su secuencia un adaptador-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG- diseñada para utilizarse durante el proceso de pirosecuenciación como sitio de unión a las esferas de amplificación. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 380 pb que reside dentro de la región conservada del gen 16S ADNr de las bacterias que es flanqueada por las regiones hipervariables V8 y V9. El diseño de los iniciadores empleados para la amplificación de las regiones hipervariables V8 y V9 del gen 16S ADNr se presenta en la Figura 2-2.

La especificidad de los iniciadores se verificó con la técnica de PCR convencional empleando un termociclador PTC-100 (MJ Research®, Inc. Minnesota, Estados Unidos). La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen de 23 µL y contenía: 2,5 µL de buffer 10X, 0,5 µL de BSA 20X, 0,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTPs mix 10 mM, 0,1 µL de Taq polimerasa (5 U/µL), 0,5 µL de cada iniciador en una concentración de 10 µM y 17,9 µL de agua grado molecular. Luego 2 µL del ADN extraído, ajustado a una concentración de 50 ng/µL, se adicionó a la mezcla para obtener una reacción final de PCR de 25 µL.

Las condiciones de corrida empleadas para la PCR fueron las de Edwards y colaboradores (2007) modificadas para este estudio en la fase de extensión, a continuación se describen las condiciones de PCR empleadas: Una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, 10 ciclos de touchdown (95°C por 30 s, anillamiento de 61°C

por 30 segundos con un decrecimiento de temperatura de 0,5°C y una extensión de 70°C por 1 minuto), seguido por 25 ciclos regulares de (95°C por 30 s, 56°C por 30 s y 70°C por 1 min), y una extensión final de 70°C por 5 y refrigeración a 4°C 24 horas.

La verificación de la amplificación se llevo a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,4% (0,56 g de agarosa fue disuelta en 40 mL de TAE 1X (Tris-acetato EDTA) y sometida a calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición, luego se adicionó 0,3 µL de SYBR Safe (Invitrogen®) para teñir el gel antes de servir en cámara), se empleó 4 µL de un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®). La corrida electroforética se realizó a 93 V durante 30 min, utilizando TAE 1X (Tris-acetato EDTA) como buffer de corrida. Los geles se visualizaron en equipo documentador de imágenes Gel Doc® (Bio-Rad).

Figura 2-2: Diseño de iniciadores empleados para el análisis de 454 pirosecuenciación. (a) Iniciador Forward (42 pb) y (b) Iniciador Reverse (39 pb)⁴.

a) Forward

F- Adaptador (19 pb secuencia)	Tag identificador (4 pb secuencia variable)	Target- secuencia específica (Iniciador DG74-19 pb)
-----------------------------------	--	---

b) Reverse

F- Adaptador (19 pb secuencia)	Target- secuencia específica (Iniciador RW01 -20 pb)
-----------------------------------	---

⁴ Las plantillas corresponden a adaptadores 454:: identificador tag:: Target-secuencia específica de la región genómica bacteriana 16S ADNr comprendiendo la región hipervariables V8 y V9 del gen.

Tabla 2-6: Iniciadores empleados para el análisis de pirosecuenciación.

Nombre oligo	Secuencia 5' - 3'	Tratamientos y replicas
F2 TGAC	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GTG ACA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T1a
F2 CTCG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCT CGA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T1b
F2 ACTG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC TGA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T1c
F2 TCGA	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GTC GAA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T2a
F2 CATC	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TCA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T2b
F2 CATG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TGA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T2c
F2 TAGT	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GTA GTA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T3a
F2 GATC	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GGA TCA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T3b
F2 CACT	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA CTA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T3c
F2 CTAG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCT AGA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T4a
F2 GTCA	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GGT CAA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T4b
F2 GCTA	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GGC TAA GGA GGT GAT CCA ACC GCA	T4c
R ADAPT	GCC TTG CCA GCC CGC TCA GAA CTG GAG GAA GGT GGG GAT	PARA TODOS

T1a: T1, Corresponde al tratamiento uno (control) y a, corresponde a replicas del mismo tratamiento (T11 y T12), b (T3 y T14), c (T15 y T16); T2, Corresponde al tratamiento dos (Alto timol); T3, Corresponde al tratamiento tres (Mezcla) y T4, Corresponde al tratamiento cuatro (Alto carvacrol).

2. Amplificación del ADN del tracto intestinal usando los cebadores que incluyen los identificadores y adaptadores: Verificada la amplificación de la región V8-V9 del 16S ADNr en la sección anterior por PCR convencional, el ADN extraído de TI de tilapias fue ajustado a una concentración de 50 ng/μL y se realizó la amplificación de los ADN del TI, para esto se estableció previamente la distribución de los iniciadores de acuerdo con la marcación por tratamiento presentadas en la Tabla 2-6. El producto de la amplificación fue almacenado hasta su utilización a -20°C.

3. Limpieza y concentración de los amplímeros obtenidos por PCR convencional:

Los productos de PCR convencional (amplímeros) de la sección anterior fueron cuantificados en ND-100 y purificados empleando un protocolo de purificación de ADN (DNA gel extraction kit; DNA extraction from Agarosa Gels, range: 100-10000 bp DNA), luego se cuantificaron nuevamente, y ajustado cada producto a una cantidad fija de 400

ng, tomando volúmenes determinados, por ultimo estas cantidades se mezclaron en un vial completando 99,5 μ L, volumen que fue dividido en dos viales (dos replicas) y concentrados en Speed Vac DNA-100, obteniendo 3456 ng de ADN para ser enviados a pirosecuenciación.

4. Pirosecuenciación de los amplímeros: Los amplímeros concentrados en la sección anterior fueron enviados para su secuenciación por el método de pirosecuenciación a Inqaba Biotechnical Industries (Pty) Ltd (Hatfield, South Africa, <http://www.inqababiotec.co.za/new/>) en donde se utilizó nueva serie de secuenciación 454 - GS FLX Titanium de Roche. La pirosecuenciación de los amplímeros se llevó a cabo en un carril 1/16 de una placa de titanio.

2.6.4 Asignación taxonómica de las pirosecuencias del 16S ADNr

La comunidad bacteriana de TI fue evaluada usando las secuencias obtenidas por el método de pirosecuenciación de la sección anterior. Para llevar a cabo la asignación taxonómica de los amplímeros del gen 16S ADNr obtenido por pirosecuenciación 454.

El análisis se llevo a cabo a través de la selección de las secuencias empleando el programa BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999) y el análisis taxonómico de las secuencias fue realizado empleando el programa Sequence Match de la base de datos ribosomal RDP (Ribosomal DataBase Project) (<http://rdp.cme.msu.edu/>, (Cole *et al.*, 2005) con la actualización 10.19, para encontrar secuencias estrechamente relacionadas. La herramienta SeqMatch es un clasificador del k -vecino más cercano (k -NN) (Wang *et al.*, 2007). Esta herramienta asigna consultas para el más bajo taxón compartido para las secuencias de la base de datos de más alto puntaje k . La identidad de la secuencia se expresó como la puntuación S_{ab} , (S_{ab} score) que se basa en los k -vecinos más cercanos (k -NN). Se empleó para el origen taxonómico de las secuencias un S_{ab} score de 0.7 del umbral de identidad. La clasificación obtenida se tuvo en cuenta hasta el nivel taxonómico de género, según la taxonomía de nomenclatura del Manual de Bergey's (Wang, *et al.*, 2007).

2.6.5 Evaluación de la diversidad bacteriana del tracto intestinal de tilapia

Para evaluar los cambios en las poblaciones bacterianas del TI por efecto de los AEO se realizó un análisis de la diversidad bacteriana utilizando el programa estadístico *PAST Palaeontological Statistics*, versión 1.24 (2004) y a partir de un análisis de componentes principales (CP) se examinaron las relaciones entre algunas variables, empleando los datos de clasificación taxonómica de géneros obtenidos del análisis taxonómico de la sección 2.6.4, usando el paquete estadístico SAS versión 9.2.

La evaluación de la diversidad bacteriana del TI de la tilapia mediante *PAST*, determinó índices de diversidad de Shannon-Wiener e índice de Simpson, con los datos de clasificación de las secuencias hasta el nivel de género, obtenidas por el método de pirosecuenciación en la sección 2.6.4. A continuación se describen estos índices:

1. **Índice de Shannon-Wiener:** ($H' = -\sum p_i \ln p_i$), expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección, asumiendo que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra (Magurran 1988).

2. **Índice de Simpson:** ($\lambda = \sum p_i^2$), donde p_i = abundancia proporcional de la especie i ; es decir, el número de individuos de la especie i , dividido entre el número total de individuos de la muestra. Este índice manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente relacionado con la importancia de las especies más dominantes (Magurran, 1988), y como su valor es inverso a la equidad, la diversidad puede calcularse como $1 - \lambda$. Para valores entre 0,0 y 0,5 se considera: muy baja diversidad o muy baja dominancia; para valores > 0,51 – 0,7: baja diversidad o alta dominancia; valores > 0,71 – 0,8: diversidad y dominancia media; cuando el valor es > 0,81 – 0,9 se considera: alta diversidad o baja dominancia y para valores > 0,91 – 1,0 la interpretación de la diversidad para el sistema es muy alta diversidad o muy baja dominancia (Moreno, 2001).

3. Resultados

3.1 Comparación y selección de un protocolo de extracción de ADN total del tracto intestinal de tilapia

En la Tabla 3-1 se presenta los resultados de la evaluación de los tres protocolos de extracción de ADN descritos en la sección 2.5, considerando los criterios de selección de calidad y cantidad del ADN extraído del TI de tilapia, los tres protocolos generaron cantidades de ADN significativamente diferentes ($P < 0,001$). Así, el protocolo modificado de Yu y Forster (2005), identificado como protocolo 3 produjo aproximadamente 4 veces más cantidad de ADN en comparación con los dos protocolos comerciales MO BIO PowerSoil® (protocolo 1) y QIAamp® (protocolo 2), con los cuales se obtuvieron concentraciones más bajas de ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Igualmente, los niveles de carvacrol:timol usados en este estudio afectaron significativamente ($P < 0,001$) la concentración del ADN extraído, pero no se presentó ninguna tendencia por tratamiento, así el valor más alto para el protocolo 1 fue 8,7 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) correspondiente al T1, para el protocolo 2 fue 53,1 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) del T3 y finalmente para el protocolo 3 el mayor fue de 333,7 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) del T4. En cuanto al rango de pureza obtenida, los tres protocolos no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P = 0,1052$), con una relación de absorbancia 260/280 con una pureza promedio general de $1,96 \pm 0,07$. Un análisis más detallado de la concentración del ADN extraído, realizando una comparación de medias (Tukey (Chew, 1976)), permitió determinar que los tratamientos T2, T3 y T4 son iguales, mientras que el tratamiento T1 es diferente (Ver Tabla 3-2). Por otro lado, la concentración de ADN por efecto del método fue significativamente diferente ($P < 0,0001$), confirmando la mayor capacidad de extracción del protocolo 3. Así, considerando los criterios evaluados, el método aplicable para la extracción de ADN total del TI de tilapia será el protocolo 3.

Tabla 3-1: Evaluación de protocolos de extracción de ADN procedente del tracto intestinal de tilapia nilótica.

Ítems	Protocolo 1 (MO BIO PowerSoil® DNA Isolation)				Protocolo 2 (QIAamp® Isolation of DNA from Stool)				Protocolo 3 Yu y Forster (2005)				<i>P</i>			
	Tratamiento				Tratamiento				Tratamiento				SEM	M	T	M*T
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Pureza (260/280)	1,97 (±0,08)	1,93 (±0,12)	2,06 (±0,30)	1,99 (±0,37)	2,04 (±0,05)	2,07 (±0,13)	1,96 (±0,01)	1,98 (±0,09)	1,92 (±0,04)	1,87 (±0,01)	1,86 (±0,02)	1,87 (±0,03)	0,15	0.1052	0.9765	0.8836
ADN (ng/μL)	<u>8,7</u> (±1,45)	6,8 (±0,68)	4,1 (±1,06)	4,5 (±0,47)	41,8 (±6,11)	33,1 (±26,6)	<u>53,1</u> (±20,5)	45,3 (±27,09)	170,5 (±21,90)	314,3 (±62,88)	329,9 (±30,43)	<u>333,7</u> (±58,23)	29,8	<.0001	0.0016	0.0002

La comparación de los protocolos fue hecho usando un ANOVA de 2 vías. Los valores son el resultado del promedio de tres replicas para cada tratamiento. M, efecto del método, T, efecto del tratamiento y M*T, interacción. , *P*= Probabilidad. Con *P* < 0.05. SEM: error estándar de las medias. Tratamiento 1: control sin suplementación; 2, 3 y 4 corresponden a las relaciones carvacrol:timol: 0,15:1; 3,25:1 y 6,5:1 respectivamente.

Tabla 3-2: Evaluación del efecto del protocolo de extracción y los niveles de carvacrol:timol sobre la concentración ADN total (ng/μL) del TI.

	Protocolo			Tratamiento				P	
	1	2	3	1	2	3	4	M	T
Concentración promedio de ADN (ng/μL)	6.07 ^c	43.35 ^b	287.12 ^a	73.69 ^a	118.13 ^b	129.03 ^b	127.86 ^b	<.0001	0.0016

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0.05$. Los valores son el resultado del promedio de doce replicas para cada tratamiento. M, efecto del método, y T, efecto del tratamiento, P = Probabilidad. Tratamiento 1: control sin suplementación; 2, 3 y 4 corresponden a las relaciones carvacrol:timol: 0,15:1; 3,25:1 y 6,5:1 respectivamente.

3.2 Comparación de las huellas moleculares para la región 16S ADNr de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de la tilapia

3.2.1 Extracción del ADN total del TI de tilapia

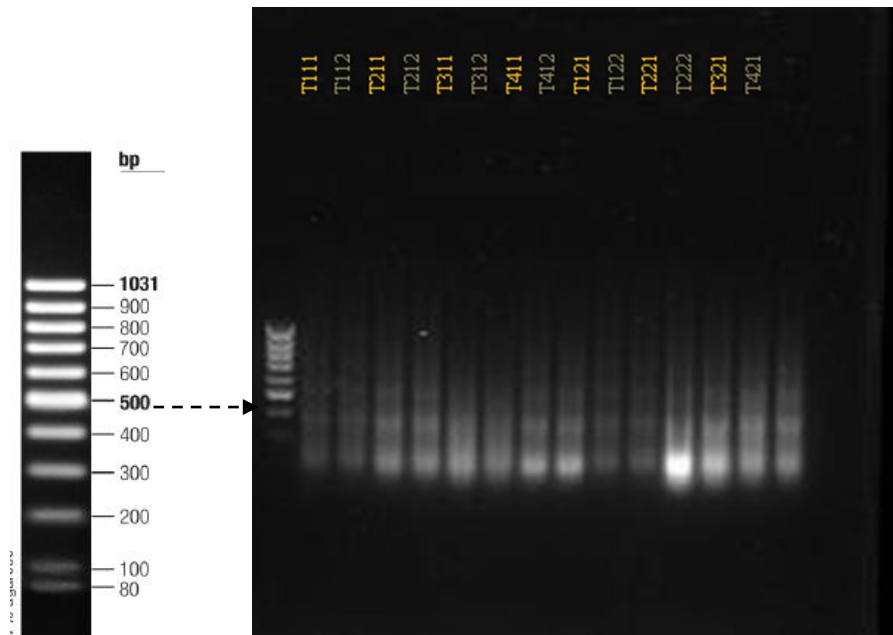
Los ADN totales de los TI de las 24 tilapias del experimento descrito en la sección 2.4 fueron extraído empleando el protocolo 3 (Yu y Forster, 2005). Los resultados esta extracción de ADN se encuentra en la Tabla 3-3, donde se obtuvo un promedio general de 207,91 ng/μL (\pm 67,84) de ADN total y un promedio de pureza (260/280) de 1,91 (\pm 0,17). El perfil del ADN total se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa 1,4%, sembrando 10 μL de ADN extraído de 14 muestras seleccionadas (Ver Figura 3-1), en el cual se muestra el barrido del ADN total extraído, donde se generaron varios bandas posiblemente por la presencia de ARN en la extracción de bajo peso molecular (no utilización de RNAasa).

Tabla 3-3: Evaluación de la extracción de DNA total de los TI de tilapia.

Tratamiento	Pureza (260/280)	ADN (ng/μL)
1	1,92 ± 0,16	174,35 ± 60,07
2	1,93 ± 0,19	260,99 ± 81,18
3	1,93 ± 0,20	202,9025 ± 55,09
4	1,86 ± 0,13	193,41 ± 43,24

Los valores son el resultado del promedio de 12 extracciones, siendo 6 peces replicas x 2 extracciones para cada tratamiento, (±), desviación estándar de la muestra. Tratamiento 1: control sin suplementación; 2, 3 y 4 corresponden a las relaciones carvacrol:timol: 0,15:1; 3,25:1 y 6,5:1 respectivamente.

Figura 3-1: Gel de agarosa al 1.4% del perfil de ADN total extraído de TI de tilapias adultas. T111: T1 el tratamiento 1 (Control), segundo número: individuo, tercer numero: indica la réplica para ese tratamiento.

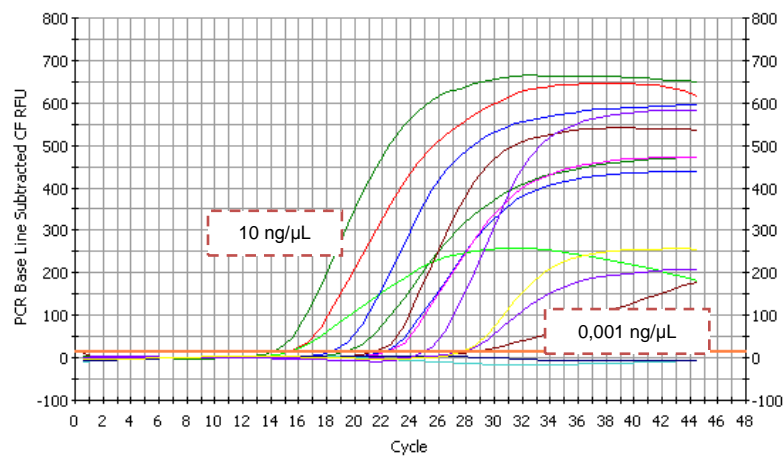


3.2.2 Cuantificación de las poblaciones bacterianas por Q-PCR

En esta sección se describen los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de bacterias totales por Q-PCR de las muestras de ADN extraído de TI de tilapia nilótica descrito en la sección 2.6.

1. **Curva estándar de ADN bacteriano:** La mayor concentración de ADN obtenida a partir de cultivos bacterianos fue de 41,8 ng/μL, en el cultivo de *B. breve* ATCC 15700, seguida por *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922 y *L. acidophilus* ATCC 4356, en los cuales se obtuvo 41,3 ng/μL, 30,1 ng/μL y 16,4 ng/μL, respectivamente. En la Figura 3-2 se presentan las curvas de amplificación obtenidas a partir de la mezcla equimolar de las bacterias arriba mencionadas, en el rango de concentración 10 a 0,001 (ng/μL), encontrándose correlación entre el valor Ct y la concentración de ADN ($r=0.973$). El programa de Q-PCR establecido para cuantificar bacterias totales, requirieron 44 ciclos de amplificación para detectar la menor cantidad de ADN (0,001 ng/μL) y los valores de Ct obtenidos con la mayor concentración de ADN (10 ng/μL) correspondieron al ciclo temprano 14.

Figura 3-2: Curva de amplificación de Q-PCR, obtenidas para la mezcla de ADN el grupo de bacterias totales.



La reacción de Q-PCR obtenida con los iniciadores para bacterias totales fue específica. Así, la representación gráfica de la temperatura de disociación para las bacterias estudiadas fue de 85°C (Ver Figura 3-3), ubicándose en una sola región de la grafica formando un pico de especificidad de los iniciadores. La eficiencia de la reacción para

bacterias totales fue de 97.1%. En la Figura 3-4 se presentan las curvas de calibración para los iniciadores del grupo de bacterias totales con la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación y el porcentaje de eficiencia.

Figura 3-3: Temperaturas de disociación obtenidas en la amplificación del ADN de los iniciadores para bacterias totales.

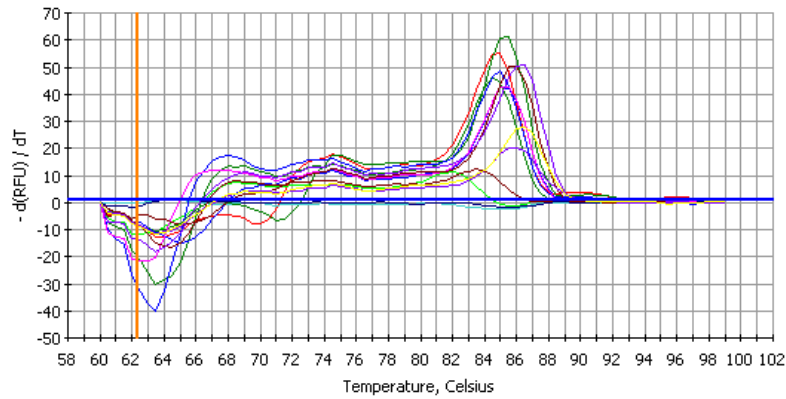
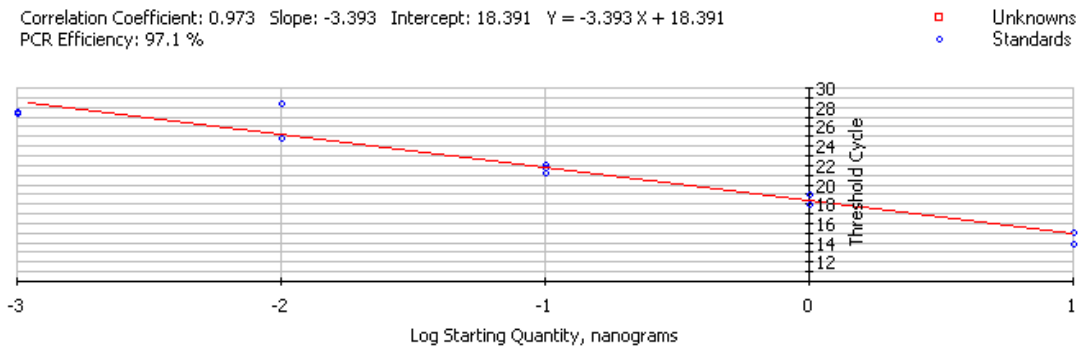


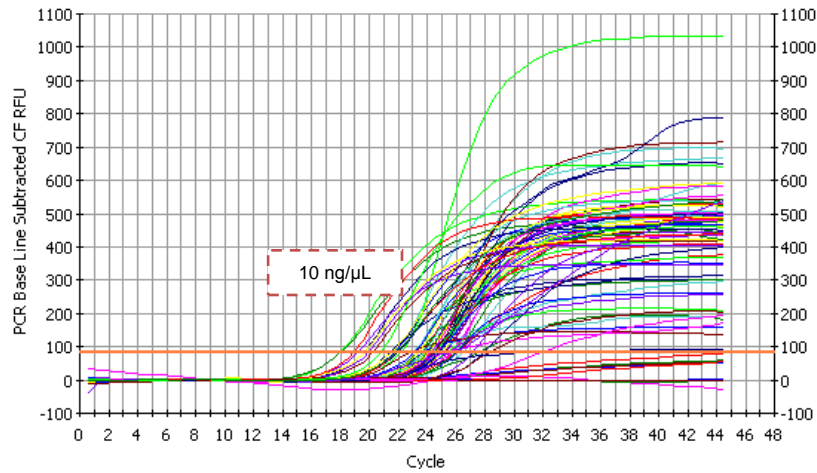
Figura 3-4: Curvas de calibración de Q-PCR obtenidas para la mezcla de bacterias con iniciadores para bacterias totales.



2. Cuantificación del ADN bacteriano total en el TI de tilapia: Se realizó la cuantificación absoluta de bacterias totales presentes en el TI de tilapias. La Figura 3-5 presentan la curva de amplificación obtenidas con la utilización de los iniciadores para bacterias totales. El programa de Q-PCR para cuantificar bacterias totales, requirieron 44 ciclos de amplificación para detectar la menor cantidad de ADN (0,001 ng/iL) y los

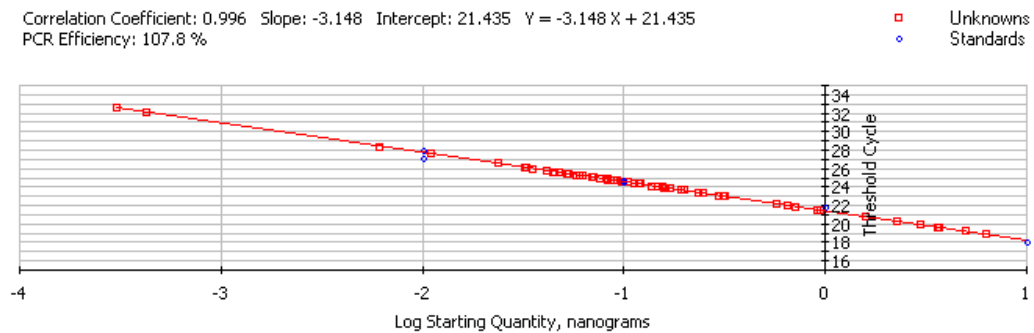
valores de Ct obtenidos con la mayor concentración de ADN (10 ng/μL) correspondieron al ciclo 18.

Figura 3-5: Curva de amplificación de Q-PCR, obtenidas para el ADN bacteriano total del TI de tilapia .



La eficiencia de la reacción para bacterias totales fue de 107,8%. En la Figura 3-6 se presentan las curvas de calibración para los ADN de TI de tilapia con los iniciadores del grupo de bacterias totales, al igual que la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación y el porcentaje de eficiencia.

Figura 3-6: Curvas de calibración de Q-PCR obtenidas para los iniciadores para bacterias totales.



A partir de la cuantificación total del ADN bacteriano en el TI de tilapia por tratamiento (Ver Tabla 3-4) se realizó el análisis de varianza con el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS V. 9.2., con el cual se determinó que no hay diferencias significativas

entre tratamientos ($P=0.4596$), por tanto las concentración de ADN bacteriano en el TI de tilapias no se ven afectadas por la inclusión de AEO en las dietas.

Tabla 3-4: Cuantificación del ADN del TI de tilapia nilótica expuesta a AEO por Q-PCR.

Tratamiento	Log ₁₀ ADN bacteriano (ng g ⁻¹ MS)
1	3,68± 0,34
2	3,89± 0,39
3	4,20± 0,86
4	4,03± 0,53

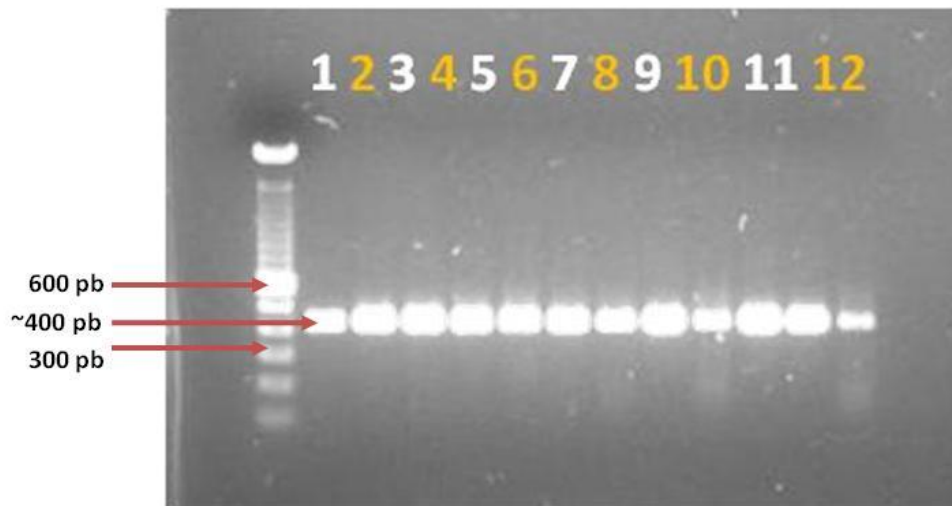
Los valores son el resultado del promedio de 18 replicas por tratamiento, (±): desviación estándar de la muestra. Tratamiento 1: control sin suplementación; 2, 3 y 4 corresponden a las relaciones carvacrol:timol: 0,15; 3,25 y 6,5 respectivamente.

3.3 Diversidad bacteriana del TI por diferentes relaciones de carvacrol:timol por la técnica de pirosecuenciación

3.3.1 Evaluación de los iniciadores para la pirosecuenciación

La presencia de los grupos bacterianos en el TI de tilapia se verificó por la amplificación de las regiones hipervariables V8 y V9 del gen 16S ADN_r, a partir del ADN obtenido del tracto intestinal de una tilapia del tratamiento control. En la Figura 3-7 se muestra el gel de agarosa obtenido con los productos de PCR. Los amplímeros generados tienen un tamaño aproximado de 380 pb. Efectuada la evaluación de los iniciadores para la región V8 y V9, se realizó la amplificación de los ADNs del TI de tilapias. Los amplímeros obtenidos de ésta amplificación fueron concentrados y posteriormente secuenciados por el método de pirosecuenciación en Inqaba Biotechnical Industries (Pty) Ltd (Hatfield, South Africa).

Figura 3-7: Gel de agarosa al 1.4% de la amplificación con iniciadores destinados para pirosecuenciación con ADN total del tracto intestinal de una tilapia del tratamiento Control. Carriles 1-12 corresponden a un iniciador diferente en orden según Tabla 2-3. Marcador 100pb empleado y ADN (2 μ L por reacción a 50 ng/ μ L).



3.3.2 Procesamiento y análisis de las pirosecuencias

El método de pirosecuenciación generó un total de 26949 secuencias, de las cuales se seleccionaron por tamaño aquellas ≥ 70 bp por tener un porcentaje de asignación taxonómica por encima del 80% a nivel de género para este tamaño de secuencia de acuerdo con Wang (2007) usando el clasificador taxonómico seqmatch, obteniendo un total 25492 secuencias mediante el programa Bioedit (Hall, 1999), luego fueron clasificadas taxonómicamente hasta género por medio de la herramienta SeqMatch del Ribosomal Database Project (RDP-10.19). Teniendo en cuenta la identidad de la secuencia obtenida (S_ab score, $\geq 0,7$) se realizó la selección de 21663 secuencias clasificadas taxonómicamente, que posteriormente fueron utilizadas para los análisis de diversidad (Ver Tabla 3-5).

Tabla 3-5: Secuencias obtenidas de la región V8–V9 del gen 16s ADNr por pirosecuenciación.

TAG	Tratamiento	Replica	N° secuencias originales	N° secuencias ≥ 70 bp	N° secuencias con score ≥ 0,7
F2 TGAC	1	1	2380	2299	2080
F2 CTCG	1	2	74	64	28
F2 ACTG	1	3	1093	993	530
F2 TCGA	2	1	3129	3022	2508
F2 CATC	2	2	554	276	127
F2 CATG	2	3	2089	1789	1569
F2 TAGT	3	1	4019	3883	3027
F2 GATC	3	2	1616	1543	1339
F2 CACT	3	3	2645	2479	2361
F2 CTAG	4	1	3582	3460	2907
F2 GTCA	4	2	4458	4400	3969
F2 GCTA	4	3	1310	1284	1218
TOTAL SECUENCIAS			26949	25492	21663

Tratamiento 1: control sin suplementación; 2, 3 y 4 corresponden a las relaciones carvacrol:timol: 0,15; 3,25 y 6,5 respectivamente.

3.3.3 Clasificación taxonómica y diversidad de las pirosecuencias

El análisis taxonómico del perfil microbiano del TI por medio de la ADN-ADN homología (Ribosomal Database Project) permitió conocer la presencia de organismos del grupo bacteriano asociados al tracto intestinal de tilapia los cuales se agruparon en 10 phylum, 62 familias y 154 géneros de bacterias (Ver Anexo A). La diversidad taxonómica a nivel de phylum, Fusobacteria fue el más representativo en el TI de la tilapia con un 54,59% seguido del phylum Proteobacteria con un 38,56% de la comunidad total, el phylum Firmicutes representa un 6,43% y otros completan un 0,42% del total general. A nivel taxonómico de familias, las Fusobacteriaceae representaron un 54,72% seguida de la familia Enterobacteriaceae con un 26,45%. Los géneros más representativos fueron

Cetobacterium y *Plesiomonas* con un 45,97% y 15,08% respectivamente, seguido de *Ilyobacter*, *Aeromonas* y *Citrobacter* con un 5,04%, 4,77% y 4,24% respectivamente.

El análisis estadístico de la diversidad bacteriana del TI de tilapia se presenta en la Tabla 3-6, reflejada en el número promedio de taxas por tratamiento y sus desviaciones estándar respecto a la media de los datos. La biodiversidad fue estimada de acuerdo con los índices de diversidad de Shannon y Simpson, los resultados se presentan en la Tabla 3-7. El tratamiento que generó mayor diversidad según el índice de Shannon fue T3 (2,344), seguido del tratamiento Alto carvacrol. La diversidad más baja se presentó en el Control (1,902). El índice de dominancia de Simpson para T1 (control) presenta el valor más bajo (0,6424) lo cual se traduce en una baja diversidad o alta dominancia, mientras que para los otros tratamientos la diversidad y dominancia es media, por tanto no hay una dominancia marcada de un género bacteriano particular.

Tabla 3-6: Diversidad microbiana del TI de tilapia con diferentes niveles de inclusión de aceite esencial de orégano.

Diversidad taxonómica por tratamiento mayor de 0.7					
Tratamiento	N° Phylum	N° Clases	N° Ordenes	N° Familias	N° Géneros
T1	4±1,00	7±2,31	14±5,57	18±8,89	35±20,53
T2	5±1,15	7±2,08	15±8,19	23±13,43	49±29,70
T3	4±0,00	7±0,58	20±1,15	27±5,77	61±17,79
T4	7±0,58	10±1,15	23±3,06	32±9,85	68±23,30

Tabla 3-7: Índices de diversidad de la comunidad bacteriana del TI de tilapia nilótica expuesta a AEO en la dietas.

ÍTEMS	Tratamientos con AEO			
	1	2	3	4
Taxas	67	91	96	116
N° de secuencias	2635	4186	6712	8037
Índice de Shannon	1,902	2,344	2,232	2,309
Índice de Simpson 1-D	0,6424	0,771	0,7676	0,7626

3.3.4 Efecto de los aceites esenciales orégano sobre las poblaciones bacterianas del TI de tilapia

En la Figura 3-8 se muestran los cambios en la composición de la comunidad bacteriana del TI de tilapia a nivel de phylum por tratamiento, indicando que las diferentes relaciones de carvacrol:timol de los AEO generaron algunos cambios, manteniéndose como taxón predominante en todos los tratamientos el Phylum Fusobacteria, seguido de Proteobacteria y Firmicutes, los phylum restantes comprenden Planctomycetes, Actinobacteria, Nitrospira, Acidobacteria, Verrumicrobia, Chloroflexi y bacterias no clasificadas con una proporción menor al 12%. El phylum Proteobacteria tuvo una variación notoria por tratamiento, aumentando su proporción en un 16% en el tratamiento alto timol respecto al control, lo cual se mantuvo en el tercer tratamiento mezcla, mientras que en el tratamiento alto carvacrol la proporción disminuyó en un 10%. Fusobacteria sin embargo se mantuvo muy homogéneo en todos los tratamientos por encima del 50%, a excepción del tratamiento control en el cual estuvo en una proporción mayor (cercana al 70%), lo cual sugiere un efecto de los tratamientos sobre las proporciones de Fusobacterias del TI de tilapia. Firmicutes aun estando en menor proporción que las dos anteriores, tuvo cambios proporcionales, incrementando en todos los tratamientos desde el control.

El efecto de los AEO sobre las poblaciones bacterianas a nivel de género se presenta en la Figura 3-9. Aquí el género *Cetobacterium* fue el predominante en todos los tratamientos, con la mayor proporción en el tratamiento control (58,5%), sin embargo *Cetobacterium* disminuyó en aproximadamente un 10% en los tres tratamientos restantes. *Plesiomonas* fue el segundo género bacteriano más abundante en todos los tratamientos. Esta bacteria presentó un incremento proporcional en el tratamiento alto timol y mezcla, en relación al control, sin embargo disminuyó hacia el tratamiento alto carvacrol. Otros géneros menos predominantes fueron *Aeromona*, *Ilyobacter*, *Fusobacterium* y *Citrobacter*.

Figura 3-8: Efecto de las relaciones carvacrol:timol de los AEO sobre las poblaciones bacterianas a nivel taxonómico de phyllum del TI de tilapia. a) T1, tratamiento sin AEO, b, c y d) corresponden a las relaciones carvacrol:timol: T2, 0,15:1; T3, 3,25:1 y T4, 6,5:1 respectivamente.

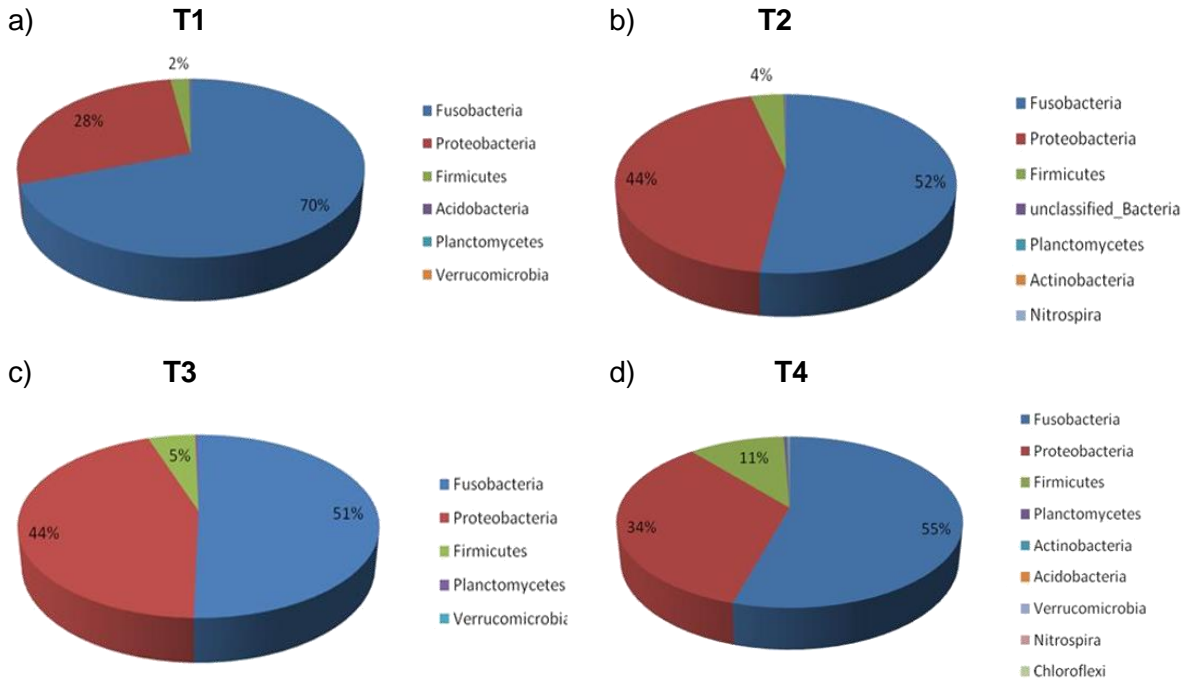
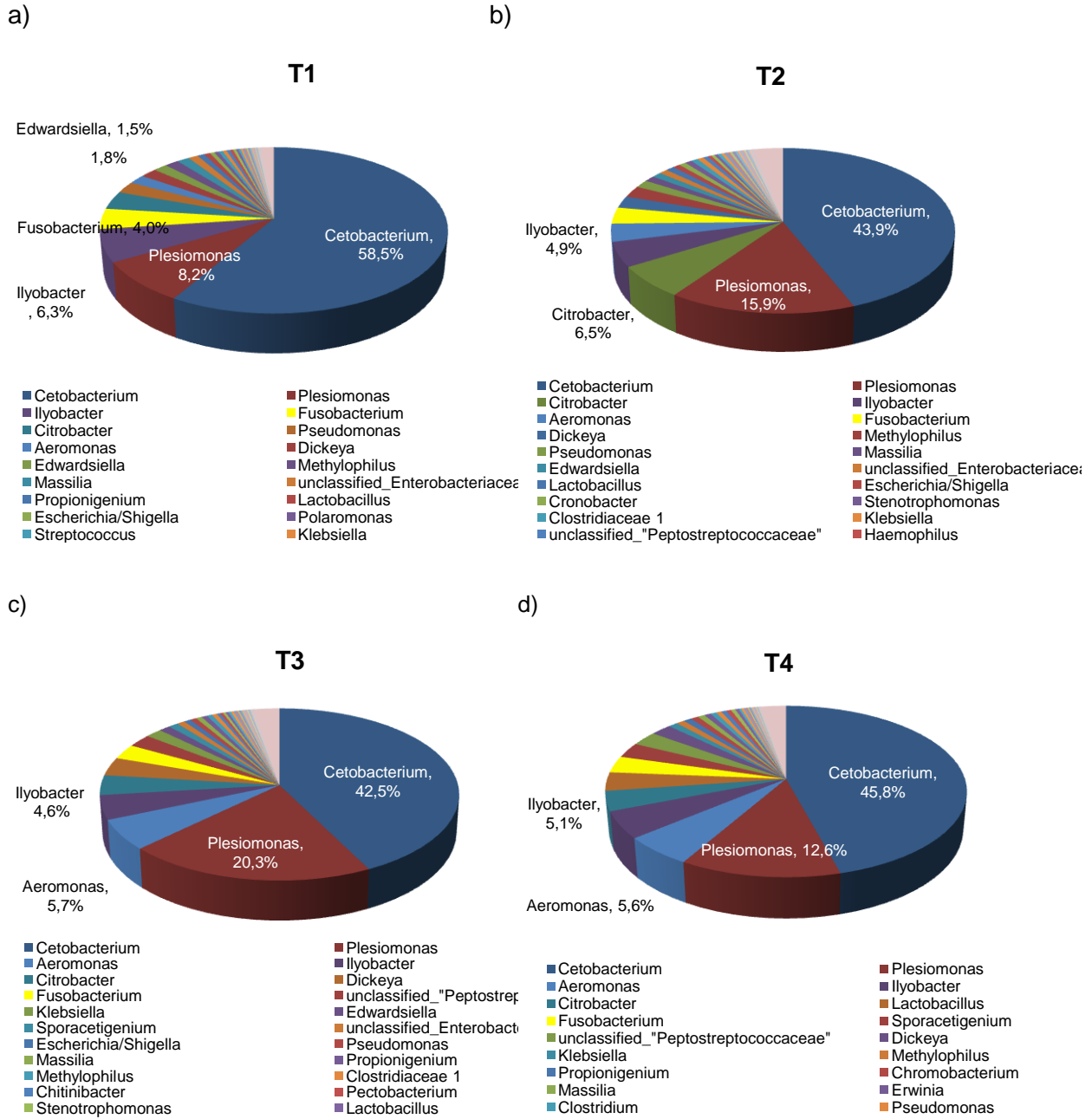


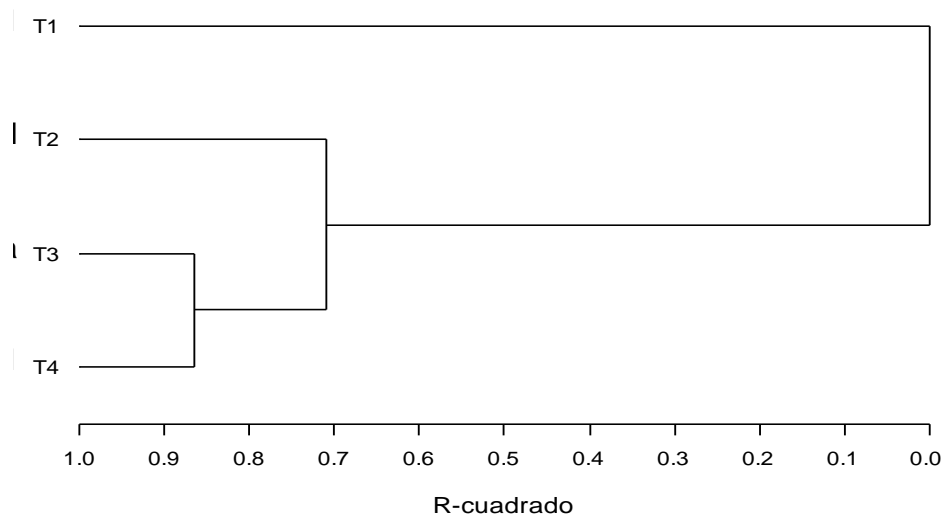
Figura 3-9: Efecto de las relaciones carvacrol:timol de los AEO sobre las poblaciones bacterianas del TI de tilapia. a) T1, tratamiento sin AEO, b, c y d) corresponden a las relaciones carvacrol:timol: T2, 0,15:1; T3, 3,25:1 y T4, 6,5:1 respectivamente.



3.3.5 Análisis de la comunidad bacteriana del TI de tilapia por componentes principales

El análisis de los componentes principales permitió seleccionar de 154 géneros bacterianos estudiados, 43 géneros que mostraron la mayor variabilidad en los tres primeros componentes. De acuerdo con esta selección, se verificó la existencia de agrupamientos de estos grupos bacterianos por efecto de los tratamientos experimentales empleando el procedimiento Cluster del paquete estadístico SAS versión 9.2. El agrupamiento generado se presenta en la Figura 3-10. Este muestra como el grupo de bacterias del T1 se separó del resto de tratamientos, ya que es la observación más distinta al resto y es la última que se incorpora al grupo. Al ser más distante y al no estar influenciado por las relaciones carvacrol:timol las proporciones bacterianas fueron diferentes y se tomó como punto de comparación para visualizar cambios proporcionales en las bacterias seleccionadas. Las bacterias del T2 formaron un grupo separado por efecto del tratamiento. En relación a las bacterias de los T3 y T4, el agrupamiento muestra que son más cercanos.

Figura 3-10: Agrupación de géneros bacterianos del TI de tilapia nilótica por tratamientos.



3.3.6 Comparación de las bacterias benéficas y potencialmente patogénicas presentes en el TI por efecto de los AEO

A continuación se presentan los resultados de los cambios en las poblaciones bacterianas benéficas (Ver Figura 3-11) y patógenas (Ver Figura 3-12) encontradas en el TI de la tilapia. Los géneros benéficos seleccionados representan el 2,03% de la comunidad general del TI de la tilapia, mientras que los patógenos seleccionados representan el 32,73% de la comunidad total para todos los tratamientos.

Dentro de los grupos benéficos *Lactobacillus* representó el 1,73% del total de la comunidad de bacterias del TI. En la Figura 3-10 se muestra que los tratamientos T2 y T3 disminuyeron la proporción de esta bacteria en relación al T1, sin embargo hubo un incremento por efecto del tratamiento T4. En contraste el género *Bacillus* representó un 0,12% del total de la comunidad bacteriana del TI, esta bacteria incrementó su proporción por efecto del tratamiento T2 y disminuyó la proporción por efecto del T3 y T4. El género *Lactococcus* representó el 0,07% del total de la comunidad bacteriana, pese a no encontrarse en el TI de los peces en el control, su mayor proporción se dio hacia el tratamiento alto timol, presentando una reducción notoria en el tratamiento mezcla.

Aunque el grupo patógeno predominante en el TI de tilapia fue el género *Cetobacterium* como se puede observar en la Figura 3-9, no se consideró en esta parte del análisis comparativo de grupos bacterianos asociados con mortalidad en peces de la Figura 3-12 por ser un grupo constante en todos tratamientos y no presentar cambios por efecto de los tratamientos.

Del grupo de bacterias Gram negativas (Ver Figura 3-12) *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* quienes se encontraban en mayor proporción en el control, se vieron disminuidas sus proporciones notablemente por los tratamiento T4 para las tres primeras bacterias, mientras que para *Klebsiella* el tratamiento T2 disminuyó la proporción de esta bacteria. *Plesiomonas* incrementó sus proporciones en todos los tratamientos en relación al tratamiento T1, donde se encontraba en una baja proporción.

Figura 3-11: Efecto de los AEO sobre grupos bacterianos benéficos asociados al TI de tilapia.

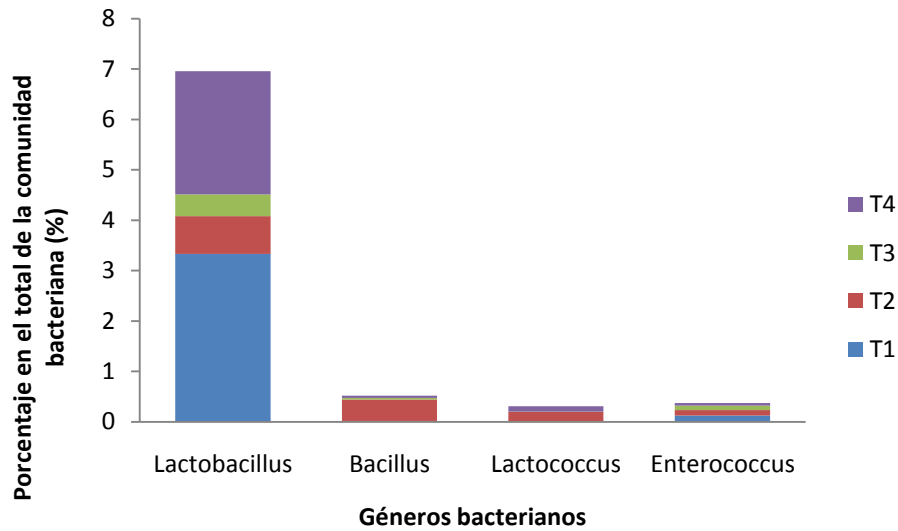
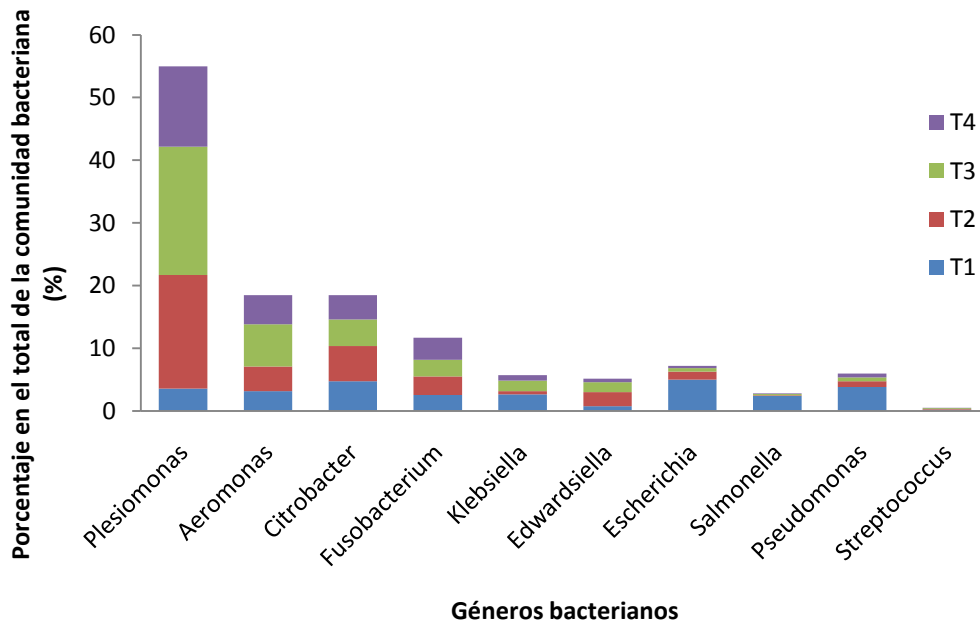


Figura 3-12: Efecto de los AEO sobre grupos bacterianos asociados con mortalidad en peces.



4. Discusión y análisis

1. Protocolo para la extracción de ADN total del tracto intestinal de tilapia

Se compararon tres protocolos los cuales están descritos en la sección 3.1. El protocolo seleccionado el protocolo modificado de Yu y Forster (2005), ya que produjo aproximadamente 4 veces más cantidad de ADN en comparación con los dos protocolos comerciales MO BIO PowerSoil® y QIAamp®. Esto se presentó debido a la baja eficiencia en los procesos de lisis celular empleados por estos dos protocolos QIAamp® y MO BIO (Ariefdjohan *et al.*, 2010). Además, en este estudio, el proceso de liofilización del material biológico, se constituyó como un aspecto clave en el tratamiento de las muestras, permitiendo así obtener una mayor cantidad de ADN total de buena calidad del TI de tilapias por el protocolo modificado, ya que este procesamiento permite conservar por más tiempo las muestras biológicas del tracto intestinal de tilapia disminuyendo la generación de cristales de hielo grandes que pueden causar lesiones sobre el ADN presente en una muestra cruda, y al retirar el agua por sublimación se disminuye las posibilidades de hidrólisis, oxidación por la ausencia de aire durante el proceso, permitiendo la conservación duradera del material, además se evita que se generen crecimientos microbianos (Zamora, 2003) que pueden en su momento sobreestimar las poblaciones bacterianas reales, durante la caracterización molecular. Otro aspecto que contribuyó a la mayor obtención de ADN en el protocolo establecido, fue la cantidad de muestra empleada, que para este trabajo, un óptimo de 20 mg favoreció el proceso de extracción, tal y como lo demostró Ariefdjohan y colaboradores (2010) en sus investigaciones, donde la cantidad de ADN obtenido está influenciada por el peso de la muestra empleada y puede afectar la eficiencia del proceso (McOrist *et al.*, 2002), así cantidades entre 10 y 50 mg son las requeridas para un eficiente proceso de extracción de ADN. El choque térmico y la agitación mecánica fuerte explicarían los resultados anteriores para el protocolo modificado de Yu y Foster (2005), por lo que pudo haberse extraído eficientemente ADN de aquellas bacterias difíciles de romper con

protocolos comerciales como los evaluados en este estudio (MO BIO PowerSoil® y QIAamp®), donde la agitación mecánica no fue suficientemente fuerte como para ocasionar la extracción de los ácidos nucleicos en mayor cantidad de las bacterias presentes en el TI. Tal y como lo confirman estudios de comparación de métodos como el de De Liphay y colaboradores (2004) , quienes mencionan que el choque térmico y agitación mecánica prolongada incrementan la eficiencia de la extracción.

Por otro lado, en el protocolo QIAamp®, la mayor cantidad de ADN fue de 53,1 ng/μL, lo que podría sugerir un efecto del T3 sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en el TI, de igual se presentó un favorecimiento del T4 sobre las poblaciones microbianas del TI empleando el protocolo modificado de Yu y Foster, obteniendo una concentración de ADN de 333,7 ng/μL. Sin embargo, para el protocolo de MO BIO, no hubo efecto de tratamiento, ya que la mayor cantidad se presentó en el T1 (Control). Se ha comprobado en otros estudios (Martin-Laurent *et al.*, 2001) que métodos de extracción para suelo, suelen ser ineficaces para el estudio de comunidades ya que puede subestimar o sobreestimar la diversidad microbiana.

Este estudio demostró la efectividad del protocolo modificado de Yu y Foster (2005) empleado para la extracción de ADN total de TI de tilapia, ya que hasta este momento no se contaba con un protocolo único para la extracción de ADN total para muestras intestinales de peces, y solo se conocía de protocolos de extracción de ADN en aletas (Nam *et al.*, 2003; Wasko *et al.*, 2003, Lopera-Barrero *et al.*, 2006, 2008), sangre (Cummings y Thorgaard, 1994), escamas (Adcock *et al.*, 2000; Sire *et al.*, 2000; Yue y Orban, 2001; Wasko *et al.*, 2003), óvulos (Aranishi, 2006) y músculo (Weber *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 2006) en los cuales el fenol-cloroformo y sal común han sido para la extracción. Sin contar con los protocolos comercialmente empleados y adaptados a diversos tipos de muestras como son: Mobio Ultra Clean® Fecal DNA Isolation Kit; QIAamp® DNA Stool Mini Kit; FastDNA® SPIN Kit; FastDNA® SPIN Kit for Soil empleados en la extracción de ADN genómico bacteriano a partir de muestras fecales humanas en su mayoría.

McOrist y colaboradores (2002) han empleado otros diferentes métodos extractivos de ADN bacteriano a partir de muestras fecales humanas como son: Nucleospin® C+T kit, Macherey-Nagal; Quantum Prep® Aquapure Genomic DNA isolation kit, Bio-Rad; y un método de extracción de ADN no comercial basado en una matriz de silica guanidium

isothiocianato. Estos protocolos son seleccionados casi siempre por su disponibilidad en el mercado, costos, facilidades de uso, popularidad, y las diferencias en los métodos de lisis celular (Ariefdjohan *et al.*, 2010). Así, mediante la amplificación utilizando el marcador molecular 16S ADN_r visualizado en la Figura 3-7 de la sección 3.3.1, se confirmó su utilidad y reproducibilidad en estudios genéticos basados en PCR.

El protocolo establecido en éste trabajo se constituyó como un método simple, reproducible y eficaz para obtener ADN total de muestras de TI liofilizado de peces como la tilapia. Aunque es un protocolo de procesamiento lento, es importante destacar que la calidad y la cantidad del ADN obtenido fueron significativas, y sobre todo el protocolo fue óptimo para recuperar información sobre la diversidad de comunidades microbianas.

2. Cuantificación bacteriana del tracto intestinal por PCR en tiempo real

Por otro lado se determinó la cantidad de ADN bacteriano presente en TI de tilapia por PCR en tiempo real (Q-PCR), mediante la cuantificación absoluta a través de la determinación de la cantidad de ADN en Log_{10} ADN bacteriano (ng/g de materia seca) de las bacterias totales presentes en el TI usando el marcador molecular 16S ADN_r. Las observaciones en este estudio permitieron determinar que no existió un efecto de los tratamientos con AEO sobre la cantidad de ADN bacteriano obtenida por la técnica de Q-PCR (Tabla 3-3), ya que no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.4596$), con un promedio general de $3,95 \pm 0,57$ [Log_{10} ADN bacteriano (ng/g de materia seca)], por tanto la concentración de ADN bacteriano en el TI de tilapias no se ven afectadas por la inclusión de AEO en las dieta. Esto pudo deberse a las condiciones en que se hizo el muestreo, ya que la colecta de los TI de tilapias fue realizada bajo condiciones de ayuno de los peces, esto se realizó con el fin de evitar el ingreso al TI de aquellas bacterias que se adhieren al alimento, el cual está sujeto a la carga microbiana presente en el ambiente acuoso. Al estar los peces en ayuno, el crecimiento bacteriano del TI pudo lentificarse al no encontrar disponible un sustrato que permitiera un crecimiento rápido de las poblaciones bacterianas, generando un bajo reemplazo de microorganismos, por no existir un balance entre el crecimiento bacteriano y la dilución del contenido intestinal con el alimento y el agua (Blanch, 2009).

3. Secuenciación y análisis taxonómico de los amplímeros de la región 16S ADN de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de la tilapia

Los cambios en diversidad taxonómica por efecto de los AEO sobre las poblaciones bacterianas presentes fueron evaluados mediante la clasificación taxonómica de las pirosecuencias obtenidas por la pirosecuenciación, consiguiendo a partir del de la ADN-ADN homología (Ribosomal Database Project) el perfil microbiano del TI, el cual está conformado por 10 phylum, 62 familias y 154 géneros de bacterias asociados al órgano complejo del tracto de tilapia (Ver Anexo A). Lo que se traduce una alta representatividad de las poblaciones bacterianas en el TI de tilapia en relación a otros estudios realizados mencionados en secciones anteriores. Para esto la amplificación por PCR convencional de regiones hipervariables V8 y V9 del 16S ADNr, generó pirosecuencias de varios tamaños y en número diferente como se pudo observar en la Tabla 3-4 de la sección 3.3.2, esto debido posiblemente a que es difícil amplificar todos los 16S ADNr con la misma eficiencia, en una muestra que contiene una gran variedad de bacterias. Además, la amplificación por PCR es uno de los pasos más críticos, si se quiere obtener datos con alta precisión de la composición de la comunidad bacteriana, por tanto es fundamental para evitar cualquier sesgo en la amplificación por PCR (Nakayama, 2010).

La secuenciación del ADN de TI de las tilapias se realizó sobre las regiones hipervariables V8 y V9 del gen 16S ADNr por ser regiones continuas en el genoma y aportan información relevante en la identificación de especies bacterianas, que se adaptan a las tecnologías moleculares como la pirosecuenciación de la plataforma 454 GS-FLX Titanium, de Roche. Sin embargo no hay un consenso en la utilización de una determinada región hipervariable del 16S, ya que de acuerdo a la región empleada y el ambiente estudiado, la estimación de la riqueza de secuencias bacterianas difiere entre las diferentes regiones analizadas (Kim *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios reportados hasta ahora solo han pirosecuenciado las regiones V, donde la comparación de dos diferentes regiones V suelen producir resultados diferentes mediante la secuenciación (Claesson *et al.*, 2009; Sogin *et al.*, 2006; Youssef *et al.*, 2009).

En la actualidad existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (*Ribosomal* Differentiation of Medical Microorganisms), y otras privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network

System). Sin embargo, la clasificación taxonómica de las pirosecuencias se hizo a partir de la herramienta bioinformática Seqmatch de la base de datos publica ribosomal RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) no solo por ser la principal base de datos de secuencias de ADNr (no sólo 16S, sino también 23S de procariotas, y 18S y 28S de eucariotas), sino porque también permite la comparación de secuencias *on line* (Rodicio y Mendoza, 2004) lo que hace que el trabajo más eficiente y asequible. Además de ser un clasificador rápido, no requiere la alineación de secuencias y funciona bien con secuencias parciales, siendo capaz de clasificar a nivel de género segmentos casi de cuerpo entero y de 400 pb con una precisión general por encima de 88,7%. La precisión global de secuencias para el clasificador Seqmatch del RDP se ha reportado que es de: 99,5%, 98,8%, 97,8%, 95,1% y 91,9% para los niveles taxonómicos de phylum, clase, orden, familia, y género, respectivamente (Wang *et al.*, 2007). En este trabajo la identificación taxonómica se hizo hasta el nivel de género dado que en taxonomía la especie bacteriana es definida como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN, y para que sea definida una secuencia a nivel de especie debe presentar una identidad del 97% o más entre sus genes 16S ADNr. Así, cepas con valores de identidad en las secuencias menores de 97%, es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie (Rodicio y Mendoza, 2004).

4. Diversidad bacteriana del tracto intestinal de la tilapia

La composición bacteriana del TI de tilapia en este estudio fue dominada en su mayoría a nivel de phylum por bacterias Gram negativas pertenecientes a las Fusobacteria con un 54,59% seguido del phylum Proteobacteria con un 38,56% de la comunidad total, mientras que una pequeña proporción Gram positiva dentro de las cuales el phylum Firmicutes representó un 6,43% del total general de la comunidad, de acuerdo con los resultados de la Figura 3-8. Estos resultados concuerdan con otros trabajos en los cuales se muestra que la mayor proporción de bacterias asociadas al TI de tilapias está compuesta por Gram negativos (Al-Harbi y Uddin, 2005).

En cuanto a la composición de géneros bacterianos en el TI de tilapia, los más representativos fueron *Cetobacterium* con un 45,97% y *Plesiomonas* con un 15,08%, seguido de *Ilyobacter*, *Aeromonas* y *Citrobacter* con un 5,04%, 4,77% y 4,24% respectivamente. Estos resultados difieren de los trabajos de Sakata y colaboradores (1984) y Lu y colaboradores (2008), donde *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* fueron

las bacterias dominantes en el intestino de tilapia, y son comunes en el tracto de la especie íctica. Lo cual sugiere que la diversidad bacteriana del tracto puede variar de un organismo a otro dependiendo de las condiciones ambientales a la que está expuesto el pez, y la presencia de un grupo bacteriano en particular como el género *Cetobacterium* en el TI de la tilapia puede deberse a que los recursos alimenticios y hábitat que ofrece el tracto es el adecuado para este microorganismo, en tanto los grupos bacterianos que representaron la menor proporción en el TI no fueron lo suficientemente competitivos y se vieron reprimidas las poblaciones bacterianas por la dominancia de *Cetobacterium* sobre los recursos alimenticios y el espacio del TI de tilapia. El género *Cetobacterium* es una bacteria patógena Gram-negativa poco conocida, en forma de vara, de la cual solo se conocen dos especies *C. somerae* registrado en heces en humanos (Finegold *et al.* , 2003) y *C. cetii* en mamíferos marinos (Foster *et al.*, 1995), obligatoriamente anaerobias para el caso de la especie *C. cetii* y micro-aerotolerante en la especie *C. somerae*. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que la variación en la microbiota intestinal de peces puede verse afectada por el estrés, por fluctuaciones en la concentración de oxígeno, la calidad y la cantidad de alimento, así como la densidad del cultivo, y la higiene para el manejo del mismo. Entonces como consecuencia de estas variaciones el sistema inmunológico del pez se ve afectado y debilitado, lo cual es aprovechado por patógenos para crecer aceleradamente en el huésped (Veschuere, *et al.*, 2000), posiblemente fluctuaciones en las condiciones ambientales y el estrés generado por la manipulación en los peces de manera periódica (captura en redes, seguido del adormecimiento de los peces en eugenol, manipulación para toma del peso corporal) favoreció la proliferación del patógeno en todos los tratamientos y fuera el género bacteriano dominante en el TI de tilapia. Por otro lado Sugita y colaboradores (1982) habían demostrado que el intestino de la tilapia contiene una amplia variedad de especies bacterianas dentro de las cuales *Pseudomonas* y *Aeromonas* miembros de la familia Enterobacteriaceae son los géneros predominantes.

Un aspecto de importancia en el estudio de la comunidad bacteriana del TI de tilapia, se contempló en el análisis de componentes principales, con el cual se examinó la mayor variabilidad del conjunto de datos estudiados, que en este caso correspondió a la variabilidad proporcional de los géneros bacterianos del TI de tilapia por efecto de las relaciones de carvacrol:timol suministrada en la dieta de los peces. En relación a las bacterias de los T3 y T4, el agrupamiento muestra que son más cercanos, posiblemente

los dos tratamientos tuvieron un efecto similar sobre las proporciones bacterianas, por tanto las observaciones más similares entre sí presentaron una menor distancia, generando una misma agrupación.

Los resultados de la biodiversidad estimada de acuerdo con los índices de diversidad de Shannon y Simpson, que se presentan en la Tabla 3-7. El tratamiento que generó mayor diversidad según el índice de Shannon fue el T3 (2,344), seguido del tratamiento T4. La diversidad más baja se presentó en el T1 (control) (1,902). Por otro lado, el índice de dominancia de Simpson para el T1 presentó el valor más bajo (0,6424) lo cual se traduce en una baja diversidad o alta dominancia, esto está relacionado con la alta proporción bacteriana en términos de número de secuencias del género *Cetobacterium*, afectando por tanto la homogeneidad de comunidad por tratamiento y su diversidad, mientras que para los otros tratamientos la diversidad y dominancia es media, por tanto hubo una tendencia de homogeneidad en la comunidad, dado que las proporciones del género bacteriano *Cetobacterium* disminuyó en un 10% aproximadamente hacia los tratamientos T2, T3 y T4.

5. Efecto de los AEO sobre la diversidad taxonómica

El TI de tilapia se constituye como un ecosistema propicio para el asentamiento y desarrollo de muchos grupos bacterianos, de los cuales no se tenía conocimiento hasta el momento. Es así como el ambiente complejo del TI de tilapia alberga una comunidad bacteriana (154 géneros reportados en este estudio) que puede verse influenciada por las condiciones ambientales y por la presencia de compuestos lipofílicos como el carvacrol y el timol presentes en los AEO suministrados en las dietas de los peces. Es así como las poblaciones bacterianas del TI de tilapia a nivel de género por tratamiento cambiaron notablemente (Ver Figura 3-9), reflejando como las relaciones carvacro:timol ejercieron cambios en las poblaciones bacterianas del TI. Dicha acción puede deberse a daños en la integridad de la membrana, en especial de los grupos Gram negativos del TI (*Plesiomonas*, *Citrobacter*, *Ilyobacter* y *Aeromonas*) reportados en tilapia (Al-Harbi y Naim Uddin, 2004; Al-Harbi y Uddin, 2005; Lu y Levin, 2008), donde la estructura de su membrana permite la acumulación rápida de los compuestos como carvacrol y timol. Los daños que pueden generar en estos microorganismos está relacionado con la desestabilización de la membrana lipídica, afectando la homeostasis del pH y el

equilibrio de los iones inorgánicos (Lambert *et al.*, 2001). Se sabe también que el carvacrol se acumula en la membrana citoplasmática, lo que provoca una expansión de la membrana. El grupo hidroxilo del carvacrol ha demostrado ser importante por su efecto sobre las propiedades de la membrana, probablemente por su actividad antimicrobiana. Para probar la importancia del grupo hidroxilo en relación con su actividad antimicrobiana, compuestos diferentes, pero con estructuras similares a la de carvacrol, han sido evaluadas en *Bacillus cereus*, encontrando que la actividad de timol (con su grupo hidroxilo situado en la posición meta) es comparable a la de carvacrol, y se ha encontrado que tiene efectos sobre crecimiento bacteriano en concentraciones de 0,75 mM o más. A partir de estos resultados, se puede concluir que la presencia del grupo hidroxilo y un sistema de electrones deslocalizados desempeñan un papel importante en la actividad antimicrobiana de carvacrol y el timol. Así, la posición del grupo hidroxilo en el anillo de benceno no afecta a la actividad de los compuesto, presentando comportamiento similar (Ultee *et al.*, 2002).

En el TI la dominancia del género *Cetobacterium* en todos los tratamientos (Figura 3-9) pudo deberse a la capacidad de resistencia de este microorganismo a la acumulación de compuestos citotóxicos como el carvacrol y el timol, empleando posiblemente mecanismos tales como : 1) el mantenimiento de una proporción adecuada de los lípidos en fase líquido-cristalino en la membrana permitiendo el restablecimiento de la fluidez de la membrana; 2) por sistemas de extrusión de drogas o también por la 3) adaptación a compuestos fenólicos, generando cambios en los ácidos grasos celulares, como se ha corroborado en otros estudios, donde microorganismos como *Pseudomonas putida* (Heipieper *et al.*, 1994) y *Lactobacillus plantarum* (Rozès y Peres, 1998) presentaron cambios estructurales a nivel de membranas. A pesar de su marcada dominancia en todos los tratamientos el género *Cetobacterium* disminuyó en aproximadamente en un 10% en los tratamientos T2, T3 y T4.

La microbiota asociada al TI de tilapia ha sido objeto de muchos estudios como se ha señalado en secciones anteriores, y en este órgano complejo del TI se encuentran en equilibrio grupos de bacterias benéficas y patógenas, cuyos géneros y especies se ven afectadas directamente por las condiciones ambientales a la que se exponen los peces, el manejo del cultivo y el alimento suministrado, entre otros aspectos. Por tanto en este estudio se seleccionaron algunos géneros bacterianos a partir del análisis de

componentes principales por presentar la mayor variación proporcional al interior de los tratamientos, así géneros como: *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptococcus* y *Pseudomonas* fueron los tenidos en cuenta el análisis de variación proporcional dada su importancia en la acuicultura. Además algunos grupos benéficos analizados en este estudio, que si bien no fueron los predominantes en el TI de la tilapia y no generaron la mayor variación por el análisis de componentes principales, son considerados de gran importancia en la acuicultura por intervenir directamente en el estado de salud y desarrollo de los peces.

Ahora, dada la mayor dominancia del género *Cetobacterium* en el TI, éste no fue tenido en cuenta en los gráficos de bacterias potencialmente causantes de enfermedades del TI presentada en la Figura 3-12, por presentar la mayor proporción dentro del tracto y posiblemente enmascararía los pequeños grupos de géneros patógenos mencionados anteriormente, que si bien están en bajas proporciones, es importante analizarlos detalladamente por ser los más variables en el TI de tilapia por tratamiento. Por esta razón los cambios relevantes por efecto de los AEO se enfocaron hacia los grupos bacterianos presentados en las Figura 3-11 y 3-12.

Dentro del grupo de géneros reportados en este estudio se encuentra *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus* (Figura 3-11), considerados como benéficos y utilizados como probióticos en peces (Burr *et al.*, 2005; Ringø y Gatesoupe, 1998). Dentro de este grupo el género más afectado por los tratamientos de AEO fue *Lactobacillus*, donde se encontró que, la mayor proporción se presentó en el control (T1), sin embargo los tratamientos T2 y T3, disminuyeron su proporción posiblemente por competencia con las bacterias *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Citrobacter* que se encontraron mayor proporción en los tratamientos T2 Y T3, posiblemente las relaciones de carvacrol:timol baja e intermedia (0,15 y 3,25) no afectaron las proporciones de estas bacterias patógenas, generando a su vez un decrecimiento de *Lactobacillus*, mientras que el tratamiento T4 tuvo un efecto negativo sobre las patógenas (disminución de proporción) en relación a *Lactobacillus* quien se vio favorecida incrementando su proporción. El tratamiento con mayor concentración de carvacrol corresponde al T4, estos cambios en *Lactobacillus*, nos indica que el carvacrol podría estar favoreciendo el desarrollo de esta bacteria, no obstante se observó un efecto inverso en las bacterias patogénicas como *Escherichia*, *Salmonella* las cuales disminuyeron las proporciones

bacterianas por efecto del T4. *Lactococcus* por otro lado no se encontró en el T1, sin embargo en el T2 se encontró en mayor proporción, respecto a T3 y T4. Estos géneros benéficos son capaces de colonizar el intestino, y actuar antagónicamente frente a patógenos Gram-negativos de peces, favoreciendo la salud de los animales y protegiendo la mucosa del intestino debido al daño que pueden generar patógenos tal y como lo comprobó Ringø y Gatesoupe (1998) sobre *Aeromonas*. El papel ecológico de las bacterias benéficas del TI, comprende el control de patógenos por competencia por el espacio epitelial del TI mediante la producción de bacteriocinas, además ellas contribuyen a la regulación de la respuesta inmune y la homeostasis del epitelio celular mediante el fomento de la supervivencia de las células epiteliales intestinales, actuando como barrera protectoras (Vanderpool *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de patógenas *Plesiomonas*, predominó dentro del grupo y fue reducida su proporción por efecto del T4, sin embargo T2 y T3 incrementó su proporción. *Aeromonas*, *Citrobacter* y *Fusobacterium* se mantuvieron constantes en todos los tratamientos, viéndose ligeramente incrementadas sus proporciones por el T3, T2 y T4 respectivamente, en relación a T1 (control). *Klebsiella* y *Edwardsiella* de igual forma incrementadas sus proporciones por efecto del T3 y T2 respectivamente en relación a T1.

En animales acuáticos como la tilapia nilótica, la microbiota intestinal no existe como una entidad absoluta sino que hay una interacción constante entre el ambiente y el pez, de tal forma que los hospederos y los microorganismos comparten un mismo ecosistema, especialmente en sistemas de cultivo donde viven bajo condiciones controladas tratando de promover el crecimiento y desarrollo de los peces, sin embargo se encuentran rodeados por microorganismos patógenos que comparten su mismo ambiente (Al-Harbi y Uddin, 2005; Verschuere *et al.*, 2000). Los géneros potencialmente patógenos (de acuerdo con la literatura) reportados en este estudio, son los representantes más comunes en peces incluida la tilapia, ya que las enfermedades bacterianas son a menudo causantes de grandes pérdidas en la piscicultura por tanto reciben mucha atención por ser bacterias ictiopatógenas. La mayoría son Gram negativas como *Aeromonas hydrophyla*, *A. salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri*, además de bacterias Gram positivas como *Renibacterium salmoninarum* (Schafer y Alvarado, 1989). Sin embargo, en este estudio se comprobó el efecto antibacteriano de compuestos lipofílicos presentes en los AEO como carvacrol y timol sobre las poblaciones bacterianas

asociadas al TI de tilapia, permitiendo establecer el comportamiento diferencial de los aceites, sin embargo hay que destacar la mayor tendencia del T4 a controlar poblaciones bacterianas potencialmente patogénicas del TI, sugiriendo el potencial antibacteriano de éste tratamiento sobre estas poblaciones, además del favorecimiento de grupos benéficos del TI de la tilapia, demostrando que los AEO como aditivos nutracéuticos en las dietas de los peces, pueden ser una alternativa al uso de antibióticos en el cultivo de esta especie íctica.

Con el fin de dar a conocer los avances y resultados relevantes de esta investigación, este trabajo fue presentado en algunos eventos tanto nacionales como internacionales, donde se resaltó la importancia de la utilización de los AEO como aditivos nutracéuticos en las dietas de la tilapia nilótica y el efecto de las diferentes relaciones carvacrol:timol sobre la comunidad bacteriana de mayor importancia en el TI de la especie íctica (Ver Anexo B).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se seleccionó y adaptó un protocolo para la extracción de ADN del tracto intestinal de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con un rendimiento de 1435 µg/g MS, un grado de pureza de 1,88 ($\pm 0,17$) y una concentración promedio de 287,1 ng/µL ($\pm 67,84$), que superó los protocolos comerciales para matrices de suelos (PowerSoil® ADN Isolation (MO BIO, EUA)) y heces (QIAamp® Isolation of DNA from Stool Samples, QIAGEN) en rendimiento de 99,17% y 39,59%, respectivamente.

Se exploró por primera vez el efecto de los AEO sobre la comunidad bacteriana del TI de tilapia (*Oreochromis niloticus*) comparando la huella molecular para el gen 16S ADNr, la cual indicó cambios en la diversidad bacteriana pero no en la concentración de bacterias totales con un promedio general ($3,95 \pm 0,53$) y la presencia de 10 phylum, 62 familias y 154 géneros de bacterias.

Se presentó dominancia (42,5-58,5%) del género *Cetobacterium* en todos los tratamientos, sin efecto significativo por los AEO.

El análisis de componentes principales mostró que algunos géneros bacterianos fueron mayormente afectados por las relaciones de carvacrol:timol, entre ellos *Escherichia*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Klebsiella*.

Existió un efecto diferencial por las proporciones de carvacrol:timol, así:

- Hubo una tendencia del tratamiento T4 (Alto carvacrol) a controlar poblaciones bacterianas del TI (*Escherichia*, *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Pseudomonas*),

sugiriendo el potencial antibacteriano de éste tratamiento sobre poblaciones relacionadas con enfermedades en peces, demostrando que los AEO como aditivos nutraceuticos en las dietas de los peces, pueden ser una alternativa al uso de antibióticos en el cultivo de esta especie íctica.

- El tratamiento T2 (Alto timol) disminuyó la proporción de *Klebsiella* y *Salmonella*, mientras que para *Bacillus* y *Lactococcus* el efecto fue inverso encontrando la mayor proporción de estas bacterias hacia el tratamiento T2 y mezcla carvacrol:timol (T3) tuvo un efecto similar al T4 (Alto carvacrol) para controlar las bacterias *Escherichia* y *Pseudomonas*.

La diversidad de bacterias asociadas al TI de tilapias se ven afectadas por la suplementación con AEO en la dieta, generando cambios en las proporciones bacterianas tanto Gram negativas como Gram positivas de manera diferencial, sin embargo hubo una tendencia del T4 a controlar poblaciones bacterianas relacionadas con enfermedades en peces, sugiriendo el potencial antibacteriano de éste tratamiento.

Este trabajo contribuyó al aprovechamiento de recursos naturales (*Lippia organoides*) propios de la región del Alto Patía mediante el aprovechamiento de los aceites esenciales de orégano con fines investigativos en el área de la nutrición animal como aditivos nutraceuticos.

5.2 Recomendaciones

El protocolo de extracción de ADN establecido en este estudio, bien podría ser empleado en ensayos dirigido a otros órganos de interés de la especie íctica, que deseen ser estudiados a nivel de la microbiota asociada, importantes también en el desarrollo del pez.

Explorar la dinámica poblacional bacteriana del TI tracto intestinal de la tilapia en diferentes estados de desarrollo de los peces, de esta forma se entenderían mucho más los cambios en la composición bacteriana en el tiempo y el espacio, los factores que los modifican y en qué medida el uso de los AEO beneficia ciertos grupos de interés.

Sería apropiado realizar un estudio periódico de la microbiota presente en el agua de cultivo, de forma que se podría entender el origen de las bacterias asociadas al tracto de

los peces, de igual forma tener un registro de las condiciones fisicoquímicas del agua de forma que puedan correlacionarse estas variables con las fluctuaciones o cambios de los grupos bacterianos de interés.

En cuanto al uso de herramientas bioinformáticas se puede contemplar la utilización de otros clasificadores taxonómicos como *Clasifier* del RDP, además se puede recurrir a bases de datos alternativas como RIDOM (<http://www.ridom.de>) que pueden emplearse para estudios dirigidos a grupos específicos de interés en la industria acuícola como son los patógenos, ya que esta base se limita a explorar secuencias de ADN_r, centrándose exclusivamente en microorganismos patógenos de interés.

A. Anexo: Riqueza de géneros bacterianos del tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Géneros bacterianos	Géneros bacterianos
<i>Cetobacterium</i>	<i>Chitinibacter</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>Cupriavidus</i>
<i>Ilyobacter</i>	<i>Gemmata</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Nevskia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Brevundimonas</i>
<i>Dickeya</i>	<i>Bacillus</i>
<i>unclassified_ "Peptostreptococcaceae"</i>	<i>unclassified_ Planctomycetaceae</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Sporacetigenium</i>	<i>Legionella</i>
<i>Methylophilus</i>	<i>Tolomonas</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>unclassified_ Oxalobacteraceae</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Massilia</i>	<i>Variovorax</i>
<i>unclassified_ Enterobacteriaceae</i>	<i>unclassified_ Methylophilaceae</i>
<i>Propionigenium</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Raoultella</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Methylbium</i>
<i>Clostridiaceae 1</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Proteus</i>
<i>Pectobacterium</i>	<i>Polynucleobacter</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Rheinheimera</i>
<i>unclassified_ Comamonadaceae</i>	<i>Zavarzinella</i>
<i>Acidovorax</i>	<i>Gemella</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Simplicispira</i>
<i>Polaromonas</i>	<i>Serratia</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Herbaspirillum</i>	<i>unclassified_ "Clostridiaceae 1"</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>Naxibacter</i>
<i>Sphingobium</i>	<i>Bosea</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Arsenophonus</i>
<i>Pelomonas</i>	<i>unclassified_ "Lachnospiraceae"</i>
<i>unclassified_ Xanthomonadaceae</i>	<i>Exiguobacterium</i>
<i>Veillonella</i>	<i>Micrococcineae</i>
<i>Anaerobacter</i>	<i>Peptoniphilus</i>
<i>Peredibacter</i>	<i>Nitratireductor</i>

Géneros bacterianos	Géneros bacterianos
<p><i>Burkholderia</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Pantoea</i> <i>unclassified_Neisseriaceae</i> <i>Globicatella</i> <i>Azospira</i> <i>Oribacterium</i> <i>Rhizobium</i> <i>unclassified_Hyphomicrobiaceae</i> <i>Caulobacter</i> <i>Hydrogenophaga</i> <i>Nocardioides</i> <i>Phenylobacterium</i> <i>Gp3</i> <i>unclassified_Burkholderiales_incertae_sedis</i> <i>unclassified_"Fusobacteriaceae"</i> <i>Novosphingobium</i> <i>Blastomonas</i> <i>Methyloversatilis</i> <i>unclassified_Pasteurellaceae</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Schlegelella</i> <i>Leptothrix</i> <i>unclassified_Verrucomicrobiaceae</i> <i>Dechloromonas</i> <i>Methylobacterium</i> <i>unclassified_Rhodocyclaceae</i> <i>Prostheco bacter</i> <i>unclassified_Succinivibrionaceae</i> <i>Propionivibrio</i> <i>unclassified_Bradyrhizobiaceae</i> <i>Atopococcus</i> <i>Afipia</i> <i>Rhodoferax</i> <i>Methylosinus</i> <i>Rhodoplanes</i> <i>unclassified_Rhodospirillaceae</i></p>	<p><i>Rhodopseudomonas</i> <i>Subdoligranulum</i> <i>Roseococcus</i> <i>unclassified_Xanthobacteraceae</i> <i>Curvibacter</i> <i>Herminiimonas</i> <i>Nitrospira</i> <i>Anoxybacillus</i> <i>Kurthia</i> <i>Devosia</i> <i>Bordetella</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Pseudobutyrvibrio</i> <i>Hyphomicrobium</i> <i>Thiofaba</i> <i>Luteimonas</i> <i>Caldilinea</i> <i>Gulbenkiania</i> <i>Filomicrobium</i> <i>Achromobacter</i> <i>Hahella</i> <i>Aquabacterium</i> <i>Ideonella</i> <i>Porphyrobacter</i> <i>Moryella</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Janthinobacterium</i> <i>unclassified_Phylobacteriaceae</i> <i>unclassified_"Ruminococcaceae"</i> <i>unclassified_Planococcaceae</i> <i>Halomonas</i> <i>Bdellovibrio</i> <i>Pirellula</i> <i>Rubrobacter</i> <i>Acetivibrio</i> <i>Blautia</i> <i>Tumebacillus</i></p>

B. Anexo: Presentaciones en eventos nacionales e internacionales

1. 2011 Congress on Gastrointestinal Function- 18 al 20 Abril de 2011- Chicago

Título: Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity Associated With The Intestinal Tract Of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Supplemented With Oreganum Essential Oil in a Colombian tropical ecosystem.

Autores: M.G. Nuñez, C. Ariza, G. Afanador, D. Rodríguez, O.L. Mayorga.

2. 2° Seminario Nacional y 1° Internacional de Investigadores en Salud y Producción Animal (SENISPA)- Septiembre 9 y 10 de 2010 Tunja - Colombia

Título: Diversidad bacteriana del tracto gastrointestinal de *Oreochromis niloticus* suplementada con aceites esenciales de orégano.

Autores: Melisa Núñez, Claudia Ariza, Germán Afanador, Diego Rodríguez, Vienvilay Phandanouvong, Olga Mayorga.

3. IV Congreso Internacional de plantas medicinales y aromáticas-18 y 19 Septiembre de 2010-Palmira-Colombia

Título: Evaluación de las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal de tilapia (*Oreochromis niloticus*) suplementadas con aceites esenciales de orégano usando la técnica de pirosecuenciación.

Autores: Melisa Núñez, Claudia Ariza, Germán Afanador, Diego Rodríguez, Vienvilay Phandanouvong, Olga Mayorga.

4. 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios– 18 al 21 de Julio de 2011- Belém-Brasil

Título: Avaliação da comunidade bacteriana associada ao tratamento gastrointestinal de tilápias (*Oreochromis niloticus*), complementado com óleos essenciais de orégano, na dieta por meio da técnica pirosecuenciación.

Autores: Melisa Núñez De la Rosa, Claudia Ariza Nieto, Germán Afanador Téllez, Olga Lucia Mayorga.

Bibliografía

- Adcock, G.L., Ramírez, B., Hauser, L., Smith, P., Carvalho, G.R. 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. *Journal of Fish Biology*, 56:1283-1287.
- Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S. 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363: 83–94.
- Albado, E., Saez Flores, G., Grabiell, S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*, 12 (1): 16-19.
- Al-Harbi, A.H. 1994. First isolation of *Streptococcus* sp. From hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 128, 195– 201.
- Al-Harbi, A.H., Uddin, N. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*x*Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229(1-4):37-44.
- Al-Harbi. A.H., Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3-4):566-572.
- Aliogiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9):4168-4170.
- Aranishi, F. 2006. Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics*, 7:153-156.
- Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., González, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos*

- Latinoamericanos de Nutrición (Alan) [Revista electrónica], 54 (1). Disponible en http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-oregano_propiedades_composicion_actividad_biologica.asp
- Ariefdjohan, M., Savaiano, D., Nakatsu, C. 2010. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutrition Journal*, 9(1):23.
- Balcázar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4):173-186.
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T., McMurdo, M.E. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3575–3581.
- Baydar, H., Sagdiç, O., Özkan, G., Karadogan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *thymbra* and *satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15(3):169-172.
- Blanch, M. 2009. Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención. Tesis de Doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Briskin, D. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124:507-514.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R., Uroz, S., Martin, F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(2):449-456.
- Burr, G., Gatlin, D., Ricke, S. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4):425-436.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223-253.
- Cahill, M. 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*, 19:21-41.
- Chew, V. 1976. Comparing treatment means: A compendium. *Hort Science*, 11:348-357.

- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P., Castillejos, L., Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90:2580–2595.
- Carmona, O., Silva, H. 1994. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 13(1):6-18
- Carson, C.F., Mee, B.J. and Riley, T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1914–1920.
- Celis, C., Escobar, P., Isaza, J., Stashenko, E., Martinez, J. 2007. Estudio comparative de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia Et Technica*, 13(033):103-105.
- Chakraborty, A., Sakai, M., Iwatsuki, Y. 2006. Museum fish specimens and molecular taxonomy: A comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:160-166.
- Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkila, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., O'Toole, P.W. 2009. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE*, 4:6669.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2005. The ribosomal database project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(1):294-296.
- Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22:299-305.
- Cummings, A.S., Thorgaard, G.H. 1994. Extraction of DNA from fish blood and sperm. *Biotechniques*, 17:426.
- De Liphay, J.R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., Sørensen, S. J. 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(10):1607-1614.
- De Souza, F.A., Kowalchuk, G.A., Leeflang, P., Van Veen, J.A., Smit, E. 2004. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18s

- rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3):1413-1424.
- Dempster, P., Baird, D.J., Beveridge, M.C. 1995. Can fish survive by filter-feeding on microparticles? Energy balance in tilapia grazing on algal suspensions. *Journal of Fish Biology*, 47(1):7-17.
- Denman, S. E., McSweeney, C. S. 2005. Quantitative (realtime) PCR. En: *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* (Ed. H. P. S. Makkar, C. S. McSweeney). Springer, Netherlands, 105-115.
- Dorman, H., Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2):308-316.
- Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeethan, T., Hagevoort, R., Edrington, T. 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*, 8:125.
- Droege, M., Hill, B. 2008. The Genome Sequencer FLX System-longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology*, 136:3-10.
- Dorak, M. T., 2006 – *Real-Time PCR (BIOS Advanced Methods)*. Taylor & Francis, Oxford, 333.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308:1635–1638.
- Edwards, J.E., Huws, S.A., Kim, E.J., Kingston-Smith, A.H. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3):323-335.
- Elgayyar, M., Draughon, F., Golden, D.A., Mount, J.R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of food protection*, 64 (7):1019-1024.
- FAO. 2006. Visión general del sector acuícola nacional. Colombia. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Salazar Ariza, G. In: Departamento de

- Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Disponible en:
http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es.
- FAO. 2008. Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Rakocy, J. E. en: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Disponible en:
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es.
- Finegold, S.M., Vaisanen, M.L., Molitoris, D.R., Tomzynski, T.J., Song, Y., Liu, C., Collins, M.D. and Lawson, P.A. 2003. *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 177–181.
- Foster, G., Ross, H.M., Naylor, R.D., Collins, M.D., Ramos, O.C., Garayzabal, F.F. and Reid, R.J. 1995. *Cetobacterium ceti* gen. nov., sp. nov., a new Gram-negative obligate anaerobe from sea mammals. *Letters in Applied Microbiology*, 21: 202–206.
- González, J., Saiz, C. 2005. Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International Microbiology*, 8:189-194.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95–98.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6):985-990.
- He, S., Zhou, Z., Liu, Y., Shi, P., Yao, B., Ringø, E., Yoon, I. 2009. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) cultured in cages. *Aquaculture*, 294:99–107.
- Heipieper, H.J., De Bont, J.A. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4440-4444
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. & von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected

- essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:3590-3595.
- Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R., Rosnes, J.T. 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272(1-4):581-588.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. 2001. Probiotics: Effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 444-450.
- Izvekova, G., Izvekov, E., Plotnikov, A. 2007. Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *Biology Bulletin*, 34(6):610-618.
- Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N.A. 2009. comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, 442-453.
- Jordan, J.A., Butchko, A.R., Beth, M. 2005. Use of Pyrosequencing of 16S rRNA Fragments to Differentiate between Bacteria Responsible for Neonatal Sepsis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 7(1):105-110.
- Juven, B., Kanner, J., Shcved, F., Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Applied Bacteriology*, 76(6):626-631.
- Kim, D., Brunt, J., Austin, B. 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 102:1654-1664.
- Kim, J., Maurice, R., Marshall, We, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43:2839-2845.
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z. 2010. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1):81-87.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 453–462.

- Lee S, Najjah M, Wendy W, Nadirah M. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China*, 3(3):332-336.
- Lim, C.; Webster, C. 2006. *Tilapia: biology, culture and nutrition*. ed. C.E. Lim; C.D. Webster. Food Products Press, Haworth Press, New York, USA. 53.
- Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas y D.P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piraicanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. *Journal Animal Science*, 84:170.
- Lopera-Barrero, N., Povh, J.A., Ribeiro, R.P., Gomes, P.C., Jacometo, C.B., Da Silva Lopes, T. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1):77-86.
- Lu, S., Levin, R.E. 2008. Dominant bacterial genera of a tilapia fish farm and rapid typing of vibrio isolates. *Journal of Fisheries Sciences*, 2 (2):183-195.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos* (10ª ed.).1012.
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179.
- Marsh S. 2007. Pyrosequencing applications. *Methods in Molecular Biology*, 373:15-24.
- Martin-Laurent, F., Phillipot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2354–2359.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., Tanaka, R. 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 7220–7228
- Mayorga, O. 2009. Microbial colonization and subsequent biofilm formation by rumen bacteria on ingested fresh perennial ryegrass. Tesis de Doctorado, Aberystwyth University, Wales.
- McOrist, A.L., Jackson, M., Bird, A.R. 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 50(2):131-139.

- Merrifield, D., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S., Baker, R. 2009. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture. Research*, 40:1064-1072.
- Moreno, C. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, Zaragoza, 1:84.
- Moreno, M., Medina, L., Álvarez, J., Obregón, J., Medina, G. 2006. Detección de *Plesiomonas shigelloides* mediante la PCR en tilapias silvestres (*Oreochromis mossambicus*) y cultivadas (tetrahíbrido *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) en Venezuela. *Revista Científica*, 16(5):459-465.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1):127-141.
- Nakayama, J. 2010. Pyrosequence-Based 16S rRNA Profiling of Gastro-Intestinal Microbiota. *Bioscience and Microflora*, 29(2):83-96.
- Nam, Y.K., Park, J.E., Kim, K.K., Kim, D.S. 2003. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fish tissue. *Transgenic Research*, 12:523-525.
- Njiru, M., Okeyo-Owuor, J.B., Muchiri, M., Cowx, I.G. 2004. Shifts in the food of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Lake Victoria, Kenya. *African Journal of Ecology*, 42(3):163-170.
- Özcan, M., Erkmen, O. 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*, 212(6):658-660.
- Özer, H., Sökmen, M., Güllüce, M., Adigüzel, A., Kiliç, H., Sahin, F., Sökmen, A., Bari, Ö. 2006. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *Angustifolius*. *Italian Journal of Food Science*, 18(1):73-83.
- Paperna, I. 1996. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. An update. Rome, Italy. FAO, CIFA Technical, Paper, 31:220.
- Peterson, M., Slack, W., Brown-Peterson, N., and McDonald, J. 2004. Reproduction in Nonnative Environments: Establishment of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Coastal Mississippi Watersheds. *Copeia*, 4:842-849.

- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., Versalovic, J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55: 856-866.
- Pond, M.J., Stone, D.M., Alderman, D.J. 2006. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261:194–203.
- Ringø, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3-4):177-203.
- Ringo, E., Strom E. 1994. Microbiota of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microbiota of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microbiota. *Aquaculture Research*, 25:623-629.
- Rodicio, M., Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(04):238-245.
- Rodríguez, D., Afanador, G., Ariza, C., Mayorga, O., Vásquez, D., Núñez, M., Jiménez, H. 2011. Uso de aceites esenciales de orégano como aditivo funcional en sistemas de producción de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA. Boletín de información*, 15:31.
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F. A., Farmerie, W. G., Triplett, E. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal*. 1(4):283-90
- Rozès, N., Peres, C. 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the-fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49:108-111.
- Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J., Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica Año XIII*, 33:325-328.
- Sakata, T., Uno, K. and Kakimoto, D. 1984. Dominant bacteria of the aerobic microflora in tilapia intestine, *Bulletin of the Japan Society of Scientific Fisheries*, 50: 489-493.
- Schafer, J.W., Alvarado L. 1989. Mecanismos de defensa específicos y no específicos en peces. en: Santiago Ernst y Pedro Saelzer. *Archivos de Medicina Veterinaria*, Publicado por Universidad Austral de Chile, 21 (2):116.

- Sharapin, N. 2000 Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED, 247.
- Sire, J.Y., Girondot, M., Babiar, O. 2000. Marking zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae), using scale regeneration. *Journal of Experimental Zoology*, 286:297-304.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou C, Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5):1202-1205.
- Smith, B.J., Smith, S.A., Tengjaroenkul, B., Lawrence, T.A. 2000. Gross Morphology and Topography of the Adult Intestinal Tract of the Tilapia Fish, *Oreochromis niloticus* L. *Cells Tissues Organs*, 166:10.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:12115-12120.
- Stashenko, E., Ruíz, C.A., Arias, G., Durán, D.C., Salgar, W., Cala, M., Martínez, M.R. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *Journal of Separation Science*, 33:93-103.
- Sugita, H., Ishida, Y., Deguchi, Y., Kadota, H., 1982. Aerobic microflora attached to the wall surface in the gastrointestinal of *Tilapia nilotica*. *College of Agriculture of Nihon University*, 39:302-306.
- Tipu, M.A., Akhtar, M.S., Anjum, M.I., Raja, M.L. 2006. New dimension of medicinal plants as animal feed. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(3):144-148.
- Toledo-Pérez, S.J., García-Capote, M. C. 2000. Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe. 83-137 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 1998. Noviembre 15-18, La Paz, B.C.S., México.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana, 959.
- Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1561-1568.

- Vanderpool, C., Yan, F., Polk, D.B. 2008 Mechanisms of probiotics action: implication for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14:1585-1596.
- Vásquez, D. 2011. El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Colombia.
- Vaughan, E., Schut, F., Heilig, H., Zoetendal, E., De Vos, W., Akkermans, A. 2000. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1:1-12.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:655-671.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16):5261-5267.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Foresti, F. 2003. Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, 138:161-165.
- Weber, L.P., Higgins, P.S., Carlson, L.I., Janz, D.M. 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. *Journal of Fish Biology*, 63:637-658.
- Wu, S., Gao, T., Zheng, Y., Wang, W., Cheng, Y., Wang, G. 2010. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303(1-4):1-7.
- Yang, G., Bao, B., Peatman, E., Li, H., Huang, L., Ren, D. 2007. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus* *Aquaculture*, 262:183–191.
- Youssef, N., Sheik, C.S., Krumholz, L.R., Najjar, F.Z., Roe, B.A., Elshahed, M.S. 2009. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:5227–5236.

- Yu, Z., Forster, R.J. 2005. Nucleic acid extraction, oligonucleotide probes and PCR methods in: HPS Makkar and CS McSweeney 2005 Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants IAEA Printed in the Netherlands, 81–104.
- Yue, G.H., Orban, L. 2001. Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Marine Biotechnology*, 3:199-204.
- Zamora, L. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis de Doctorado, Universitat de Girona. Girona.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, LL. 2010. Characterization of Variation in Rumen Methanogenic Communities under Different Dietary and Host Feed Efficiency Conditions, as Determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12):3776 - 3786.
- Zuckerkindl, E., Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8(2):357-366.