

COLECCIÓN



INVESTIGACIÓN

Encapsulación de probióticos: alternativa tecnológica para mejorar el cultivo de tilapia

Marcelo Fernando Valle Vargas
María Ximena Quintanilla Carvajal
Luisa Marcela Villamil Díaz
Ruth Yolanda Ruiz Pardo



Universidad de
La Sabana

**Encapsulación
de probióticos:
alternativa
tecnológica para
mejorar el cultivo
de tilapia**



Encapsulación de probióticos: alternativa tecnológica para mejorar el cultivo de tilapia

MARCELO FERNANDO VALLE VARGAS
MARÍA XIMENA QUINTANILLA CARVAJAL
LUISA MARCELA VILLAMIL DÍAZ
RUTH YOLANDA RUIZ PARDO



Valle Vargas, Marcelo Fernando, autor

Encapsulación de probióticos: alternativa tecnológica para mejorar el cultivo de tilapia / Marcelo Fernando Valle Vargas, María Ximena Quintanilla Carvajal, Luisa Marcela Villamil Díaz, Ruth Yolanda Ruiz Pardo. -- Chía: Universidad de La Sabana, 2022

162 páginas; cm. (Colección Investigación)

Incluye bibliografía

ISBN 978-958-12-0606-3

e-ISBN 978-958-12-0607-0

doi: 10.5294/978-958-12-0606-3

1. Piscicultura 2. Probióticos 3. Estanques para peces I. Valle Vargas, Marcelo Fernando II. Quintanilla Carvajal, María Ximena III. Villamil Díaz, Luisa Marcela IV. Ruiz Pardo, Ruth Yolanda V. Universidad de La Sabana (Colombia). III. Tit.

CDD 639.3

CO-ChULS



RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

© Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Biociencias
© Marcelo Fernando Valle Vargas
© María Ximena Quintanilla Carvajal
© Luisa Marcela Villamil Díaz
© Ruth Yolanda Ruiz Pardo

Primera edición: abril de 2022
ISBN 978-958-12-0606-3
e-ISBN 978-958-12-0607-0
doi: 10.5294/978-958-12-0606-3

1000 ejemplares

EDICIÓN

Dirección de Publicaciones
Campus del Puente del Común
Km 7 Autopista Norte de Bogotá
Chía, Cundinamarca, Colombia
Tels.: 861 5555 / 861 6666, ext. 45101
www.unisabana.edu.co
<https://publicaciones.unisabana.edu.co>
publicaciones@unisabana.edu.co

DIAGRAMACIÓN Y MONTAJE DE CUBIERTA

Mauricio Salamanca

ILUSTRACIÓN DE CUBIERTA

Kilka Diseño Gráfico

CORRECCIÓN DE ESTILO

Francisco Díaz-Granados

IMPRESIÓN

Xpress Estudio Gráfico y Digital S.A.S.

Hecho el depósito que exige la ley.

Queda prohibida la reproducción parcial o total de este libro, sin la autorización de los titulares del *copyright*, por cualquier medio, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático. Esta edición y sus características gráficas son propiedad de la Universidad de La Sabana.

Este libro es producto de la tesis doctoral en curso: *Efecto de la suplementación de un probiótico tipo consorcio encapsulado sobre parámetros productivos en tilapia nilótica (Oreochromis niloticus)*

Estudiante: Marcelo Valle
Doctorado en Biociencias

Nota: esta tesis no está ligada a ningún proyecto de investigación que tenga financiación activa.

Diseño epub:

Hipertexto - Netizen Digital Solutions

Contenido

Introducción

1. Cultivo de tilapia en Colombia

Antecedentes de la llegada de la tilapia a Colombia

Generalidades de la tilapia

Proceso productivo de la tilapia

Enfermedades en el cultivo de tilapia

Uso de antibióticos en cultivo de tilapia

2. Uso de probióticos en tilapia

Definición, características y clasificación

Mecanismos de acción y beneficios de los probióticos

Fuentes para el aislamiento de microorganismos probióticos

Probióticos utilizados en el cultivo de tilapia

Métodos de administración de los probióticos a los peces

Regulación del uso de probióticos en alimentación animal

3. Producción de probióticos

Proceso de producción de probióticos

Medios de cultivo

Formulación de medios de cultivo

4. Encapsulación de probióticos para alimentación de tilapia

Encapsulación

Uso de probióticos encapsulados en alimentación de peces

Parámetros de evaluación de procesamiento *in vitro* e *in vivo* de los encapsulados

5. Metodologías para evaluar el proceso de encapsulación, parámetros *in vitro* e *in vivo*

Parámetros de encapsulación

Parámetros *in vitro*

Parámetros *in vivo* para evaluación de probióticos encapsulados

Conclusiones y perspectivas

Referencias

Nota al pie

Autores

Introducción

Para el año 2050, la producción mundial de alimentos tendrá que incrementarse en un 60% para satisfacer la demanda de una población de 9.700 millones de personas (FAO, 2017a). Con tal perspectiva, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) estableció la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, en la cual se plantearon diferentes políticas orientadas al cumplimiento de los Objetivos del Desarrollo Sostenibles (ODS), donde se destaca la importancia de la agricultura y alimentación (FAO, 2015). En este contexto, la acuicultura es una actividad con un alto potencial en el cumplimiento de varios de los ODS, siempre y cuando se implementen acciones de tecnificación para reducir la huella ecológica de esta actividad y se mejoren los indicadores de sostenibilidad. De esta manera, la acuicultura aportaría a lograr varios objetivos: hambre cero (objetivo 2), agua limpia y saneamiento (objetivo 6), trabajo decente y crecimiento económico (objetivo 8), producción y consumo responsables (objetivo 12) y uso sostenible de los recursos y ecosistemas acuáticos (objetivo 14), y así contribuiría a la mitigación del cambio climático, entre otros beneficios (FAO, 2017b).

La producción mundial de la pesca y la acuicultura en el periodo 2016-2018 tuvo un incremento del 7,26%, pasando de 166 a 179 millones de toneladas. En el 2018, el 45,81% de la producción mundial correspondió al sector

acuícola, siendo la tilapia y la carpa las especies más cultivadas (FAO, 2020). La acuicultura en Colombia sigue las tendencias de producción global con números de producción crecientes. Según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Sostenible, durante el período 2010-2019, la producción piscícola en el país aumentó en un 144,45%, pasando de 67.679 a 165.444 toneladas, con el cultivo de tilapia representando el 58% de la producción total del 2019, seguido del de cachama (19%), trucha (16%) y otras especies nativas (7%). Para ese año, esta industria generó cerca de 50.000 empleos directos y 150.000 indirectos. Por otra parte, los productos acuícolas se consumen en los mercados locales y también se exportan, principalmente a Estados Unidos (MADR, 2020). En el caso de tilapia, para el año 2020 las exportaciones fueron de 11.595 toneladas, lo que representó un aumento del 65% con respecto al año anterior, cuando se exportaron 7.204 toneladas. Las exportaciones de tilapia representaron un valor comercial aproximado de US\$60 millones para el año 2020 (MADR, 2021). Los principales destinos de la producción de tilapia fueron EE.UU. (95,8%) y, en menor proporción, Perú y Reino Unido (MINCIT, 2021).

El aumento de la demanda de pescado a nivel mundial, regional y nacional ha llevado a la intensificación del cultivo de peces, por lo que es frecuente el deterioro de las condiciones ambientales y, por ende, el aumento del estrés en los peces cultivados, la ruptura de las barreras naturales que usualmente hay entre el hospedero y el patógeno y, por lo tanto, una mayor susceptibilidad a agentes infecciosos (Troell *et al.*, 2017; Karvonen *et al.*, 2021; Zarantoniello *et al.*, 2021), dando como resultado una disminución en la producción acuícola (FAO, 2017a). En el caso del cultivo tilapia, los patógenos más comunes que atacan a esta especie son bacterias, parásitos y virus (Dong *et al.*, 2015; Chitmanat *et al.*, 2016), aunque también se presentan coinfecciones por dos o más patógenos, las cuales con

frecuencia son poco atendidas y pueden generar efectos adversos en la productividad de este cultivo (Abdel-Latif *et al.*, 2020; Kotob *et al.*, 2016).

Para incrementar la productividad y supervivencia de los peces, se ha recurrido al uso de antibióticos, los cuales han dado buenos resultados en el tratamiento de infecciones bacterianas del pez (Romero *et al.*, 2012; FAO, 2005); sin embargo, su uso excesivo o en dosis inadecuadas ha sido asociado a la aparición y propagación de genes de resistencia a antimicrobianos en las bacterias comúnmente asociadas a los peces cultivados (Miranda *et al.*, 2018). La resistencia a los antibióticos en la acuicultura se puede transferir a cepas clínicamente importantes del entorno natural mediante la transferencia horizontal de genes, lo que afecta a todo el ecosistema (Preena *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2017). Además, existe la preocupación por la acumulación de los antibióticos en el ambiente y su posible efecto adverso en los ecosistemas adyacentes a las granjas de cultivo (Zheng *et al.*, 2021; Watts *et al.*, 2017).

El uso de probióticos es una alternativa al uso de antibióticos, más respetuosa con el ambiente y sostenible. Los probióticos se han utilizado en acuicultura en las últimas tres décadas y con mayor énfasis desde el año 2000 (Melo-Bolívar *et al.*, 2021). A diferencia de otras estrategias de control de enfermedades en acuicultura, la ventaja del uso de probióticos radica en sus múltiples mecanismos para conferir beneficios a los peces cultivados y al entorno (Zorriehzahra *et al.*, 2016; Jahangiri y Esteban, 2018).

La palabra probiótico tiene un origen griego: *pro* y *bios*, que colectivamente significan “para la vida”, por lo que son ampliamente considerados como microorganismos benéficos (Lauzon *et al.*, 2014). Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades suficientes, tienen un efecto benéfico en la salud de hospedero (FAO, 2016). No obstante, recientemente se ha propuesto una nueva definición más

amplia, en alusión a un microorganismo vivo o muerto e incluso a un componente de los microorganismos que actúan de diferentes modos, al conferir efectos benéficos al hospedero o al ambiente (Lazado y Caipang, 2014). Esta definición genera diferencias conceptuales profundas, como es la supuesta necesidad de colonización y supervivencia en el tracto gastrointestinal de los organismos cultivados, que indica la definición tradicional de los probióticos. Así mismo, abre la posibilidad del uso de metabolitos como enzimas, proteínas secretadas, ácidos grasos de cadena corta, vitaminas, biosurfactantes secretados, aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos, etc., denominados posbióticos, o de microorganismos no viables, denominados parabióticos (Barros *et al.*, 2020; Nataraj *et al.*, 2020).

El uso de probióticos es cada vez más común en el cultivo de peces continentales (Melo *et al.*, 2020), dados sus efectos benéficos, como mayor crecimiento (ganancia de peso y talla), incremento en la absorción de nutrientes, mejora en la tasa de conversión alimentaria, modulación de la microbiota intestinal, mayor actividad intestinal, fortalecimiento del sistema inmune y capacidad de supervivencia frente a desafíos experimentales con bacterias patógenas, entre otros reportados en Colombia y otros países en distintos sistemas de cultivo (Pandiyan *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2012; Kuebutornye, *et al.*, 2020; Villamil *et al.*, 2014; Villamil y Esguerra, 2017; Murillo y Villamil, 2011; Merrifield y Carnevali, 2014).

Los probióticos pueden ser suministrados a los peces de manera individual (más comúnmente) o en consorcio, con dos o más microorganismos que se suministran de manera simultánea al pez, buscando una sinergia que tenga efectos benéficos mayores a los que se obtendrían con el uso de los microorganismos de manera individual (Ouwehand *et al.*, 2018; Timmerman *et al.*, 2004). En el

Grupo de Investigación de Procesos Agroindustriales de la Universidad de La Sabana, se publicó recientemente un artículo de revisión sobre el uso de probióticos en consorcio en peces comerciales de aguas continentales (Melo-Bolívar *et al.*, 2021), en el que, a partir de búsquedas bibliográficas en las bases de datos Scopus, Web of Science y PubMed, fue posible seleccionar 81 artículos que evaluaron la suplementación con probióticos de múltiples cepas durante ensayos *in vivo* en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa común (*Cyprinus carpio*) y rohu (*Labeo rohita*); sin embargo, solo 13 artículos incluían el probiótico individual como control para hacer comparación directa con la mezcla de bacterias probióticas y determinar de esta manera si la mezcla ofrecía mayores beneficios, en comparación con un probiótico seleccionado y un grupo de control sin suplementación con probióticos. Este hallazgo pone de manifiesto la necesidad de contar con estudios que permitan elucidar los efectos reales que pueden generar los probióticos, ya sea cuando se administran en consorcio o de manera individual, en aspectos relevantes, como el equilibrio de la microbiota intestinal, la activación del sistema inmunológico y su relación con el incremento en la productividad y supervivencia de los peces cultivados.

Aunque son muchos los beneficios que ofrecen los probióticos a la salud del pez, la selección de los mismos es una etapa crítica, por lo que es necesario la evaluación de parámetros *in vitro*, tales como actividad antimicrobiana, tolerancia en medio ácido/básico, tolerancia a sales biliares, susceptibilidad a medicamentos, capacidad de adherencia al intestino y formación de biopelículas o “biofilm”, etc., con el fin de determinar el o los probióticos que mejor se adapten a las necesidades de cada pez (Chauhan y Singh, 2019; Sayes *et al.*, 2018; Villamil *et al.*, 2002), así como la vía y dosis de administración, dependiendo de la etapa de cultivo (Villamil *et al.*, 2010).

A pesar de la evidencia científica que existe sobre los beneficios de la colonización y crecimiento de los probióticos en el tracto gastrointestinal de los peces (Moroni *et al.*, 2021; Merrifield y Carnevali, 2014), su viabilidad se puede ver afectada durante su almacenamiento, incorporación en el alimento (Masoomi *et al.*, 2019) y/o paso por el tracto gastrointestinal del hospedero (Pinpimai *et al.*, 2015; Pirarat *et al.*, 2015). Esto último es debido a que los probióticos son susceptibles a la disminución de su concentración por condiciones adversas, como el bajo pH (1-3) de los jugos gástricos y la acción de sales biliares, lo cual causa que a su llegada al intestino no estén en la concentración adecuada y, por ende, no puedan tener el efecto benéfico esperado (Kumaree *et al.*, 2015). Con el propósito de incrementar la viabilidad de los probióticos durante su almacenamiento, inclusión en el alimento de los peces y extrusión, así como en el paso por el tracto gastrointestinal, se hace necesario el uso de técnicas de protección de los probióticos en estos ambientes. Dentro de estas técnicas se encuentra la encapsulación, la cual consiste en el atrapamiento de una sustancia (núcleo, material activo) dentro un material de pared (sólido, líquido) para la producción de partículas con un diámetro de pocos nanómetros a milímetros (Vidal, 2016). Los probióticos han sido encapsulados por diferentes técnicas, como secado por aspersion, liofilización, coacervación y gelificación iónica (Masoomi *et al.*, 2019), siendo esta última una de la más empleadas, ya que no se aplican altas temperaturas durante el proceso (Yao *et al.*, 2020). Por otra parte, técnicas como el *electrospinning* (Ceylan *et al.*, 2018; Zupančič *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020) y la ventana refractiva (Aragón *et al.*, 2019; Yoha *et al.*, 2021; Yoha *et al.*, 2020) han sido poco exploradas para encapsulación de probióticos. Si las condiciones del proceso de encapsulación, como temperatura, flujo de aire, flujo de alimentación,

concentración de los materiales de pared, propiedades fisicoquímicas de los materiales de pared, entre otras, no son las adecuadas (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Šipailienė y Petraitytė, 2018), el probiótico no estará protegido y, por ende, será susceptible a la reducción de su concentración durante la encapsulación, el almacenamiento, el transporte y el tránsito por el tracto gastrointestinal, debido a factores como el estrés mecánico, oxígeno, ácidos gástricos, enzimas digestivas y sales biliares (Yao *et al.*, 2020).

Muchas investigaciones se han enfocado en la utilización de probióticos en alimentación de tilapia, siendo las más comunes las especies de los géneros *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*), *Lactococcus* (*L. lactis*, principalmente), *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *Bacillus* sp.), *Bifidobacterium* (*B. breve*, *Bifidobacterium* sp.), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), entre otros (Adeoye *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020; Gutiérrez *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2014; Standen *et al.*, 2016; Sutthi y Doan, 2020; Van Doan *et al.*, 2019; Villamil *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2018). No obstante, son pocas en las que se han encapsulado probióticos para tilapia (Agung *et al.*, 2015; Pinpimai *et al.*, 2015; Pirarat *et al.*, 2015; Satyari *et al.*, 2015a; Gioacchini *et al.*, 2018; Satyari *et al.*, 2015b), reportándose hasta el momento en Colombia una sola investigación de este tipo, la cual fue realizada por Gutiérrez *et al.* (2016), quienes alimentaron tilapia roja (*Oreochromis* spp.) con una dieta suplementada con un probiótico en consorcio encapsulado compuesto por *B. megaterium*, *Bacillus polymyxa* y *L. delbrueckii*.

Teniendo en cuenta la contextualización que se ha planteado en las anteriores líneas, se espera que este libro contribuya en los ámbitos académico, científico, industrial, económico, social y ambiental. En lo académico y científico, ya que con la información presentada se pueden generar

ideas que conlleven la estructuración de proyectos de investigación que den como resultado la generación de nuevo conocimiento, junto con su apropiación y circulación. De este modo, podrá ser utilizado en la acuicultura, especialmente en el cultivo de tilapia y peces continentales, como también en el desarrollo de futuras investigaciones con peces marinos, todo con el objetivo de mejorar la productividad, lo que podría generar mayores ingresos a los empresarios, oportunidades de empleo y bienestar social. Adicionalmente, buscando asimismo la consecución de los Objetivos del Desarrollo Sostenible, gracias a la reducción en el uso de antibióticos, se tendrá menor impacto ambiental.

Como se vio, la acuicultura -y, en este caso, especialmente la piscicultura- juega un papel fundamental en la seguridad alimentaria del país (Meriño *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2011). Según la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional (ENSIN) de 2015 (MSPS, 2015), la prevalencia nacional de Inseguridad Alimentaria en el Hogar (INSAH) fue del 54,2%, donde 31,9% de los hogares tenían inseguridad alimentaria leve, 13,8% de los hogares tenían inseguridad alimentaria moderada y 8,5% severa. Es importante destacar que el departamento de La Guajira presentó una INSAH total de 69,3%, donde la severidad alcanzó el 25,5%, según el Ministerio de Salud y Protección Social (2020). Cabe resaltar que en este departamento se encuentra la mayor población indígena de Colombia, los wayúu, con cerca de 270.000 personas, de las cuales el 97% vive en el área rural, lo cual dificulta el acceso a alimentos, salud y agua potable. El 77% de las familias wayúu no tienen acceso a alimentos en la cantidad y calidad nutricional suficiente que les permitan llevar una vida activa y saludable. Además, según datos del censo poblacional del 2018, 90% de la población de La Guajira trabaja en el sector informal desarrollando actividades como el turismo, la hotelería y el comercio en la frontera

con Venezuela (Human Right Watch, 2020). Por lo tanto, la acuicultura es una actividad esencial para mejorar la seguridad alimentaria y generar oportunidades de empleo (FAO, 2017b), en lugares como La Guajira, donde la falta de acceso a los alimentos y la desnutrición están bastante extendidas en las poblaciones vulnerables, en especial en aquellas que viven en las zonas rurales (Cotes *et al.*, 2016). Por estas razones, el Departamento de La Guajira, en su Plan Departamental de Desarrollo 2020-2023, indica que las acciones de fomento de la acuicultura y pesca deben estar orientadas a impulsar emprendimientos y generar oportunidades de reconversión laboral, esto mediante la creación de incentivos y acceso a créditos y mecanismos de financiación para proyectos en este sector, fortaleciéndolo a través de la infraestructura adecuada, el encadenamiento productivo y su tecnificación (Gobernación de La Guajira, 2020).

Toda la temática anteriormente expuesta será desarrollada con mayor detalle en este libro, el cual está estructurado de la siguiente manera: generalidades de la tilapia y su cultivo (capítulo 1), uso de probióticos en tilapia (capítulo 2), producción de probióticos (capítulo 3), encapsulación de probióticos destinados a la alimentación de tilapia (capítulo 4) y descripción de algunas metodologías para la evaluación de parámetros de proceso, parámetros *in vitro* e *in vivo* (capítulo 5), en la encapsulación como técnica de protección para probióticos que se destinan a la alimentación de tilapia.

1. Cultivo de tilapia en Colombia

Resumen

La tilapia es una especie originaria de los ríos africanos, introducida en Colombia con fines de repoblamiento y diversificación de especies ícticas cultivables a finales de los años ochenta. La tilapia y sus híbridos son peces con ventajas productivas, como alta resistencia a condiciones de cultivo adversas y reproducción y mantenimiento relativamente fácil. No obstante, se han reportado mortalidades y pérdidas económicas en el país y el mundo causadas por enfermedades de origen bacteriano, viral y parasitario. Con el objetivo de incrementar la productividad y sostenibilidad del sector piscícola, es necesario generar alternativas biotecnológicas como nuevos productos prebióticos, probióticos, inmunoestimulantes, vacunas, etc., que eviten el uso indiscriminado de antibióticos y sus potenciales efectos adversos en los peces, el ambiente y los consumidores.

Palabras clave: Antibióticos, enfermedades, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis* spp., tilapia.

Antecedentes de la llegada de la tilapia a Colombia

La acuicultura en Colombia se inició hacia 1938 con la introducción de la trucha arcoíris (*O. mykiss*), una especie