



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS
EN EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE ALEVINES
DE “CARACHI AMARILLO” *Orestias luteus* Y “CARACHI
NEGRO” *Orestias agassii*, EN CONDICIONES DE
LABORATORIO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. LIDIA BEATRIZ RAMOS MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN EL
CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE ALEVINES DE “CARACHI
AMARILLO” *Orestias luteus* Y “CARACHI NEGRO” *Orestias agassii*, EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. LIDIA BEATRIZ RAMOS MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADA POR:

PRESIDENTE

:

D. Sc. Buenaventura Optaciano Carpio Vásquez

PRIMER MIEMBRO

:

Mg. Sc. José David Velezvia Díaz

SEGUNDO MIEMBRO

:

D. Sc. Juan José Pauro Roque

DIRECTOR / ASESOR

:

M. Sc. Edwin Federico Orna Rivas

Fecha de Sustentación: 23 de diciembre de 2019

ÁREA : Ciencias Biomédicas

TEMA : Biotecnología Acuícola





DEDICATORIA

A mi hermana Tania Erika Ramos Mamani que siempre me alentó a ser mejor en la vida, por demostrar esa fortaleza de salir adelante y tener ese carácter que la hace única para afrontar a la vida.

A mis sobrinos Rosa Judith Pari Ramos y Luis Edwarth Pari Ramos por haberme dado tantas alegrías y cariño a mi hermano Juan Pari Parillo por apoyarme.

A mis padres Pedro Eloy Ramos Ccolla y Nilda Marcelina Mamani Choque que, aunque no estuvieron a mi lado en este camino siempre los tuve presente y les hice mi motivación por haberme dado la vida.

A Dios Todopoderoso, por darme la sabiduría y la fuerza necesaria para enfrentar los obstáculos de la vida y seguir adelante aun en los momentos más difíciles, por ser la fuerza que impulsa nuestra existencia en el camino que recorreremos en la vida.



AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y toda la plana de docentes que me instruyo y guio en toda mi formación académica.

Al laboratorio de Recursos Hidrobiológicos de Agua Dulce (PHAD), ubicado en Callejón Ichu km 12, donde el señor Julián Barra Mindani, me dio la oportunidad de trabajar y desarrollar mi proyecto de investigación.

Al señor Cristóbal Arazola, por el apoyo en el proceso de ejecución de mi proyecto de investigación, por brindarme su confianza, y brindarme su amistad.

A mi director de tesis, M. Sc. Edwin Federico Orna Rivas, por el apoyo brindado, sus recomendaciones, su amabilidad y tiempo otorgado a mi persona.

A los miembros de jurado D. Sc. Buenaventura Optaciano Carpio Vásquez, Mg. Sc. José David Velezvia Díaz y D. Sc. Juan José Pauro Roque por las correcciones, observaciones y sugerencias hechas para enriquecer el presente trabajo y tiempo dedicado en la revisión.

A mis amigas Maritza Huanca Perca, por el apoyo incondicional en la elaboración de mi proyecto de tesis y a mi amiga Ruth G. León por su apoyo, amistad, comprensión, confianza, alegrías y tristezas compartidas.

A todas mis compañeras y compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas que compartieron el camino conmigo en el proceso de mi formación.

A la señora Máxima Serrano Jara y al señor Rodolfo Arocutipa por alentarme a seguir con mi formación, brindarme su confianza y por hacerme parte de su familia, los tengo en mi corazón.

Y a todas las personas que no menciono aquí, se los agradezco de corazón.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
I. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Objetivo General	18
1.2.Objetivos Específicos	18
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
2.1. Antecedentes	19
2.2. Marco Teórico.....	21
2.2.1. Biodiversidad del género <i>Orestias</i>	21
2.2.2. Ecología y distribución natural del género <i>Orestias</i>	21
2.2.3. Posición taxonomía de <i>Orestias</i>	22
2.2.4. Características de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i>	23
2.2.5. Manejo y reproducción artificial de <i>Orestias</i>	25
2.2.6. Requerimientos medioambientales para el desarrollo.	25
2.2.7. Incubadoras en la reproducción artificial.	26
2.2.8. Fases de incubación y alevinaje de <i>Orestias</i>	27
2.2.9. Problemas sanitarios durante la incubación.	27
2.3. Características de <i>Artemia</i>	28
2.3.1. Clasificación taxonómica de <i>Artemia</i>	28
2.3.2. Morfología y ciclo vital de <i>Artemia</i>	28
2.3.3. Valor nutricional de la <i>Artemia</i>	29
2.3.4. Uso se <i>Artemia</i> en la acuicultura.	29
2.4. Bioencapsulación	30
2.5. Probióticos.....	32
2.5.1. Uso de bacterias probióticas en la acuicultura.....	33
2.5.2. Mecanismos de acción de bacterias probióticas.	34
2.5.3. Importancia de las bacterias probióticas.....	36
2.6. Marco Conceptual	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1. Lugar de Estudio	39



3.2. Periodo del Trabajo de Investigación	39
3.3. Material Biológico	40
3.4. Unidades Experimentales	40
3.5. Tratamientos a Comparar	41
3.6. Metodología	42
3.6.1. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento de longitud y peso de alevines de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i>	43
3.6.2. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento del porcentaje de sobrevivencia de alevines de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i>	62
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento de longitud y peso de alevines de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i>	66
4.1.1. Incremento de longitud (cm) de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , post adición de bacterias probióticas.	66
4.1.2. Incremento de peso (g) de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , post adición de bacterias probióticas.	70
4.2. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento del porcentaje de sobrevivencia de alevines de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i>	75
4.2.1. Incremento del porcentaje de sobrevivencia de <i>Orestias luteus</i> , post adición de bacterias probióticas.	75
4.2.2. Incremento del porcentaje de sobrevivencia de <i>Orestias agassii</i> , post adición de bacterias probióticas.	76
V. CONCLUSIONES	81
VI. RECOMENDACIONES	82
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	92
Anexo A. Panel fotográfico	93
Anexo B. Tablas	96



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hembra de <i>Orestias luteus</i> . Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018.	21
Figura 2. Hembra de <i>Orestias agassii</i> . Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018.	21
Figura 3. Ciclo biológico de la <i>Artemia</i> . Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 30 de marzo del 2018. Fuente http://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/	29
Figura 4. Mapa geográfico del lugar de la investigación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018. Fuente Google Maps.	39
Figura 5. Distribución de las 12 unidades experimentales para alevinos de <i>Orestias luteus</i>	40
Figura 6. Distribución de las 12 unidades experimentales para alevinos de <i>Orestias agassii</i> . Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 12 de febrero del 2018. Fuente Elaboración Propia.	41
Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de investigación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, del 05 de marzo a 01 de junio del 2018.	42
Figura 8. Cantidad de reproductores obtenidos de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> . Sector Vallecito del departamento de Puno, 05 de marzo del 2018.	43
Figura 9. Selección de peces reproductivamente aptos: A) <i>Orestias luteus</i> , B) <i>Orestias agassii</i>	44
Figura 10. Fecundación artificial: A) Desove, B) Fecundación, C) Ovas embrionadas y aglutinadas. Sector Vallecito del departamento de Puno, 05 de marzo del 2018.	45
Figura 11. Endurecimiento de ovas fecundadas: A) Lavado de ovas fecundadas antes de la incubación, B) Flujo de agua constante durante 24 horas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018.	45
Figura 12. A) Desaglutinación (separación manual de ovas fecundadas), B) Ovas desaglutinadas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 de marzo del 2018.	46



- Figura 13.** Conteo de ovas: A) Preparación de ovas para conteo, B) Adición de ovas al vaso pyrex que contiene agua de 200 ml. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 de marzo del 2018..... 46
- Figura 14.** A) Incubación de ovas en vasos tipo Mac Donald con flujo de agua constante, B) Ovas incubadas a los 7 días de incubación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 de marzo del 2018..... 47
- Figura 15.** Picaje: A) Distinción de ovas muertas, B) Ovas seleccionadas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 08 de marzo del 2018..... 47
- Figura 16.** A) Inicio de eclosión de ovas incubadas, B) Primer día de eclosión de ovas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 25 y 26 de marzo del 2018. 48
- Figura 17.** Cantidad de larvas de *Orestias* obtenidas en el laboratorio. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 27 de marzo del 2018..... 49
- Figura 18.** Bacterias Probióticas activado. Laboratorio de Productos..... 51
- Figura 19.** Dilución seriada de bacterias probióticas para la obtención UFC. 51
- Figura 20.** Metodología de cultivo de bacterias: A) Acción de la dilución seriada, B) Procedimiento de esterilizado en autoclave, C) Distribución de agar para el cultivo de bacterias en las placas Petri, D) Placas con medio de cultivo, E) Sembrado de bacterias para la identificación). Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018..... 52
- Figura 21.** Obtención de bacterias probióticas: A) Obtención general de bacterias probióticas, 53
- Figura 22.** Obtención de géneros de bacterias probióticas aún no identificadas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018. 54
- Figura 23.** Metodología de tinción Gram para la observación morfológica de bacterias obtenidas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018. 54
- Figura 24.** Identificación de las bacterias probióticas: A) *Lactococcus* sp., B) *Bacillus* sp., 54
- Figura 25.** A) Placas distribuidas con agar para la siembra de bacterias probióticas obtenidas,..... 55
- Figura 26.** Obtención de *Artemia*: A) Activación de nauplios, B) Desarrollo de cistos de *Artemia*, C) Nauplio de *Artemia* en estadio II, con presencia de abertura anal.



Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 30 de marzo del 2018.....	56
Figura 27. Metodología de la biometría de alevinos para la obtención de talla, con el uso de una pluma para facilitar el manejo de los alevinos. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 01 de julio del 2018.	60
Figura 28. Biometría a los 90 días de tratamientos: A) Alevinos alimentados sin probiótico,.....	61
Figura 29. Manejo de <i>Orestias luteus</i> , en las unidades experimentales. Laboratorio de	63
Figura 30. Manejo de <i>Orestias agassii</i> , en las unidades experimentales. Laboratorio de	63
Figura 31. Alevinos de <i>Orestias agassii</i> a los 90 días de tratamiento con la adición de bacterias probióticas mediante la bioencapsulación en nauplios de <i>Artemia</i> . Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 01 de julio del 2018.....	65
Figura 32. Análisis de contraste para determinar diferencias de incremento de longitud en alevinos de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , como consecuencia de diferentes tratamientos con adición de bacterias probióticas.	69
Figura 33. Análisis de contraste para determinar diferencias de incremento de pesos de alevinos de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , como consecuencia de diferentes tratamientos con adición de bacterias probióticas.	73
Figura 34. Análisis de contraste para determinar diferencias del incremento del % de sobrevivencia en alevinos de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , como consecuencia de diferentes tratamientos con adición de bacterias probióticas.	77
Figura 35. Observación del desarrollo de ovas de <i>Orestias</i> . Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 al 28 de marzo del 2018.....	93
Figura 36. A) Ovas en eclosión, B) Cantidad de alevinos obtenidos, C) Alevinos de un mes. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 27 de marzo del 2018.	94
Figura 37. A) Autoclave, B) Esterilizado de aza de siembra. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018.....	94
Figura 38. Obtención de bacterias probióticas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018.....	95



- Figura 39.** A) Medios de cultivo, B) Pesado de medios de cultivo, C) Probiótico. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018. 95
- Figura 40.** A) Cistos de *Artemia*, B) Cultivo *Artemia*, C) Bioencapsulación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 30 de marzo del 2018. 95



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de las principales especies ícticas nativas del lago Titicaca.....	21
Tabla 2. Comparación de características de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i>	23
Tabla 3. Comparación de dos tipos de incubadoras para la producción de alevinos.....	27
Tabla 4. Microorganismos utilizados como probióticos en la acuicultura.	32
Tabla 5: Temperatura en el proceso de incubación de ovas de <i>Orestias</i>	49
Tabla 6. Adición de bacterias probióticas, durante 90 días a alevinos de <i>Orestias</i>	59
Tabla 7. Promedios de los parámetros fisicoquímicos del agua.	62
Tabla 8. Incremento en longitud (cm) de alevinos de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , post adición de bacterias probióticas.	66
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento de longitud (cm) de los alevinos de <i>Orestias luteus</i> , sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.	67
Tabla 10. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento de la longitud (cm) de los alevinos de <i>Orestias luteus</i> en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.	67
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento de longitud (cm) de los alevinos de <i>Orestias agassii</i> , sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.	68
Tabla 12. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento de la longitud (cm) de los alevinos de <i>Orestias agassii</i> en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.	68
Tabla 13. Incremento en peso (g) de alevinos de <i>Orestias luteus</i> y <i>Orestias agassii</i> , post adición de bacterias probióticas.	70
Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento del peso (g) de los alevinos de <i>Orestias luteus</i> , sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.	71
Tabla 15. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento del peso (g) de los alevinos de <i>Orestias luteus</i> en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.....	72
Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento de peso (g) de los alevinos de <i>Orestias agassii</i> , sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.	72



Tabla 17. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento del peso (g) de los alevinos de <i>Orestias agassii</i> , en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.....	72
Tabla 18. Incremento del porcentaje de sobrevivencia en <i>Orestias luteus</i> , post adición de bacterias probióticas.....	75
Tabla 19. Incremento del porcentaje de sobrevivencia en <i>Orestias agassii</i> , post adición de bacterias probióticas.....	76
Tabla 20. Registro de obtención de ovas de <i>Orestias</i>	96
Tabla 21. Desarrollo biológico de <i>Orestias</i>	96
Tabla 22. Biometría de la réplica 1 de <i>Orestias luteus</i>	97
Tabla 23. Biometría de la réplica 2 de <i>Orestias luteus</i>	97
Tabla 24. Biometría de la réplica 3 de <i>Orestias luteus</i>	97
Tabla 25. Biometría de la réplica 1 de <i>Orestias agassii</i>	98
Tabla 26. Biometría de la réplica 2 de <i>Orestias agassii</i>	98
Tabla 27. Biometría de la réplica 3 de <i>Orestias agassii</i>	98
Tabla 28. Distribución de tratamientos para alevinos de <i>Orestias luteus</i>	99
Tabla 29. Distribución de tratamientos para alevinos de <i>Orestias agassii</i>	99
Tabla 30. Obtención de datos de sobrevivencia de alevinos de <i>Orestias luteus</i>	99
Tabla 31. Obtención de datos de sobrevivencia de alevinos de <i>Orestias agassii</i>	99



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

UFC	: Unidades Formadoras de Colonias
MRS	: Man Rogosa y Sharp
TSA	: Tripticasa de Soya Agar
TCBS	: Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
pH	: Potencial de iones hidrogeno
PHAD	: Productos Hidrobiológicas de Agua Dulce
UE	: Unidades Experimentales
ml	: mililitro
km	: kilómetro
°C	: grados Celsius
UV	: Luz ultravioleta
UFC/g	: Unidades Formadoras de Colonia por gramo
UFC/ml	: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
cm	: centímetro
mm	: milímetro
g	: gramos
OD	: Oxígeno Disuelto
T1	: tratamiento uno (tratamiento control)
T2	: tratamiento dos
T3	: tratamiento tres
T4	: tratamiento cuatro
ANOVA	: Análisis de Varianza
DCA	: Diseño Completamente al Azar
Ppm	: partes por millón



RESUMEN

La investigación se realizó durante 90 días en las instalaciones de la empresa de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce, de la ciudad de Puno, con los objetivos de: determinar el efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento de longitud y peso de alevines de *Orestias luteus* y *Orestias agassii* y determinar el efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento del porcentaje de sobrevivencia de alevines de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*. Para la cual, se emplearon 24 acuarios con capacidad de 60 litros de agua cada uno, 3 mil alevines de *Orestias luteus* y 3 mil alevinos de *Orestias agassii*, distribuidos con un Diseño Completamente al Azar, que corresponde a 4 tratamientos con 3 repeticiones cada uno y cada repetición consistió en 250 alevinos, con una longitud de 6.5 cm y peso de 0.0074 g, los tratamientos se distribuyeron así: T1: 0 días, T2: 5 días, T3: 10 días y T4: 15 días de adición de bacterias probióticas mediante bioencapsulado en nauplios de *Artemia*, con alimentación a los 7h, 12h y 16h, las variables a evaluar fueron: incremento de longitud (cm), peso (g) y % sobrevivencia, para la cual los datos se obtuvieron mediante la biometría a los 90 días y el registro de la mortalidad se realizó mediante el conteo directo de forma diaria, los datos se analizaron con el test de ANOVA y posteriormente los promedios se compararon con el test de Tukey ($p < 0.05$) cuando mostraban diferencia significativa, los resultados, mostraron que la aplicación de bacterias probióticas influyó positivamente sobre el incremento de longitud, peso y sobrevivencia, quien mostró diferencias estadísticas significativas para los días de evaluación que duró la investigación, donde T2, T3 y T4 obtuvieron similares resultados respecto T1, se concluye que el T2 es recomendado para la alimentación de alevinos *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

Palabras clave: Alevino, *Artemia*, bioencapsulación, bacteria probiótica, cultivo artificial, especie nativo.



ABSTRACT

The investigation was carried out during 90 days in the facilities of the company of Hydrobiological Products of Fresh Water, of the city of Puno, with the objectives of: determining the effect of the addition of probiotic bacteria in the increase of length and weight of fry of *Orestias luteus* and *Orestias agassii* and determine the effect of the addition of probiotic bacteria on the increase in the survival rate of juveniles of *Orestias luteus* and *Orestias agassii*. In the methodology, 24 aquariums with a capacity of 60 liters of water each, 3 thousand fry from *Orestias luteus* and 3 thousand fry from *Orestias agassii* were used, distributed with a Completely Random Design, which corresponds to 4 treatments with 3 repetitions each and each repetition consisted of 250 fry, with a length of 6.5 cm and weight of 0.0074 g, the treatments were distributed as follows: T1: 0 days, T2: 5 days, T3: 10 days and T4: 15 days of addition of probiotic bacteria through bioencapsulation in *Artemia nauplii*, with feeding at 7h, 12h and 16h, the variables to be evaluated were: increase in length (cm), weight (g) and % survival, for which the data were obtained through biometrics at 90 days and the mortality was recorded by direct counting on a daily basis, the data were analyzed with the ANOVA test and subsequently the averages were compared with the Tukey test ($p < 0.05$) when they showed significant difference. *va*, the results, showed that the application of probiotic bacteria positively influenced the increase in length, weight and survival, who showed significant statistical differences for the days of evaluation that lasted the investigation, where T2, T3 and T4 obtained similar results with respect to T1, it is concluded that T2 is recommended for feeding *Orestias luteus* and *Orestias agassii* fry.

Key words: Alevino, Artemia, Bioencapsulation, probiotic bacteria, artificial culture



I. INTRODUCCIÓN

En el lago Titicaca existe una diversidad de especies acuáticas las cuales se encuentran asociadas manteniendo un equilibrio del ecosistema acuático (Loayza, 2009). La cual, está constituida por especies ícticas nativas, desde organismos unicelulares como invertebrados hasta aves; dentro de ellos se tiene a la ictiofauna que está constituido por especies nativas del género *Orestias* (Pari, 2012), que esta atravesando problemas que se agrava día a día por dos causas fundamentales: primero la sobrepesca y segundo por especies introducidas, con fines económicos y productivos ocasionando un impacto negativo llevando a las poblaciones ícticas nativas a niveles elevados de amenaza de extinción (Orlove *et al.*, 1991).

Debido a la problemática que atraviesa el género *Orestias*, en la actualidad existen instituciones que reúnen las condiciones de infraestructura física y equipamiento tecnológico para realizar la reproducción artificial mediante la incubación de ovas señala Buitron (2005). En este contexto, el zooplancton es el principal alimento de alevinos, entre los más empleados están las artemias, rotíferos, cladóceros y copépodos, los cuales son considerados magníficos alimentos para larvas de peces marinos y algunos de agua dulce, gracias a su envergadura y corto ciclo de vida para su cultivo de alto valor nutritivo, digestibilidad y disposición de traspaso de nutrientes, además que, cuando son enriquecidos su beneficio nutritivo es mayor en cuanto a lípidos que son necesarios para los alevinos (Salgado, 2001).

La *Artemia* es el zooplancton más utilizado en la acuicultura esto debido a su contenido de ácidos grasos (n-3 y n-6) y más de 47% en contenido de proteínas sostiene Sorgeloos (2001). Además, Huet (1998) indica que, su importancia se basa en el fácil almacenamiento y el manejo de sus cistos, debido a su medida en el estadio de nauplio es un alimento apropiado para muchas larvas y alevinos de peces y crustáceos, ya que la alimentación será crucial para la sobrevivencia de alevinos. Sin embargo, otros factores se presentan durante la incubación como problemas causados por *Saprolegnia* sp. el cual es un micófito acuático que ataca a las ovas fecundadas y muertas, el mismo presenta una coloración blanquecina (materia parecida a la fibra de algodón), apareciendo inclusive en la superficie de las ovas sanas situadas a su alrededor matándolas por asfixia (Loayza, 2009).



Por ello, se busca modificar la microbiota presente en sistemas de acuicultura con el fin de prevenir enfermedades y aumentar la producción sostiene Quiroz (2013). Para lo cual los probióticos ofrecen una alternativa ecoamigable con el ambiente, con bajo costo de producción, que permite mejorar el estado de salud de los organismos en cultivo, evitando o mitigando infecciones por patógenos, evitando el uso de antibióticos y reduciendo la mortalidad (Sánchez, 2015). Ya que su acción mejora de la resistencia a la colonización, y el efecto inhibitorio directo contra los patógenos disminuyendo la incidencia y duración de las enfermedades resalta Jimbo (2018). En este sentido, Sorroza *et al.*, (2005) da a conocer que, entre los mecanismos de acción de los probióticos tenemos: la producción de compuestos inhibitorios, competencia por compuestos químicos o energía disponible, competencia por sitios de adhesión, aumento de la respuesta inmune, mejora de la calidad del agua, contribución enzimática para la digestión, fuente de macro y micronutrientes.

Teniéndose estos antecedentes y el conocimiento de la problemática en la producción de alevinos de *Orestias*, es necesario buscar alternativa que permitan aumentar los niveles de incremento en crecimiento y sobrevivencia de los alevinos siendo esto necesarios en los primeros meses donde existe mayor mortalidad por diversos factores siendo los mismos mortales en su proceso de desarrollo, por ello Ardila (2010) indica que, se debe recurrir a nuevas estrategias que permitan mitigar al máximo las enfermedades en los cultivos acuícolas, que favorezcan el crecimiento de los organismos y un incremento en la producción, con la finalidad de recuperar la biomasa icticas mediante la conservación y repoblamiento de las mismas. Ya que estas especies son consideradas endémicas, porque son únicas en el mundo (Loayza, 2009).

Además, con esta investigación se proyecta sentar las bases para la estandarización de un protocolo para la implementación de probióticos en la fase de alevinaje de especies nativas y exóticas, que se manejan en la actividad acuícola sirviendo de base para la replicación de esta investigación por parte de los acuicultores.

En este sentido, el presente proyecto de investigación desglosa los siguientes objetivos:



1.1. Objetivo General

- Determinar el efecto de la adición de bacterias probióticas en crecimiento y sobrevivencia de alevines de “carachi amarillo” *Orestias luteus* y “carachi negro” *Orestias agassii* en condiciones de laboratorio

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento de longitud y peso de alevines de “carachi amarillo” *Orestias luteus* y “carachi negro” *Orestias agassii*.
- Determinar el efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento del porcentaje de sobrevivencia de alevines de “carachi amarillo” *Orestias luteus* y “carachi negro” *Orestias agassii*.



II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

En la actualidad a nivel regional según, Valenzuela (2018) el mayor logro obtenido, es la obtención de larvas de *Orestias* por medio de la reproducción artificial inducida, viéndose así, la falta de manejo en el proceso de crecimiento en medios controlados ya que uno de los puntos críticos en el ciclo biológico de peces es durante la fase larval y alevinaje, el cual es traducido por la elevada mortalidad que se presenta durante el cultivo, en este sentido, la disponibilidad en la obtención de alevinos en cantidad y calidad, es contemplada como un factor crucial en la cual la alimentación y la nutrición para las diferentes etapas son designadas como los principales factores responsables (Prieto, 2006), es así que, controlar o manejar su alimentación será de mucha importancia ya que son especies que, se alimentan de plancton vivo tal como microalgas, rotíferos y *Artemia salina*.

Un factor que limita el crecimiento y desarrollo en la etapa de alevinaje son los microorganismos patógenos que se presentan durante los primeros meses. Por ello, Hernández (2015) indica que, la implementación de nuevas estrategias y/o herramientas en acuicultura es de vital importancia para aumentar los rendimientos, especialmente en esas etapas críticas en el proceso de producción de peces, viéndose esta problemática diversas investigaciones definen que, los probióticos hoy en día se postulan como la alternativa con mayor éxito para competir con los patógenos bacterianos argumenta Villamil (2009). Ya que, mediante el suministro en el alimento contribuyen a mejorar la digestión enzimática asimilando directamente los nutrientes (Hernández, 2015).

Múltiples han sido las investigaciones realizadas sobre el uso de probióticos en animales acuáticos, confirmando el uso benéfico de microorganismos aplicados a la acuicultura incorporada al alimento vivo directamente para alimentar al pez tal como nos indica Castro *et al.*, (2005) mediante la bioencapsulación. En este sentido es necesario implementar probióticos en el cultivo de esta especie de tal manera que en la larvicultura se fijen esos microorganismos en el sistema digestivo de las larvas permitiéndoles un mejor desarrollo en las diversas etapas de cría ya que, en todo proceso de producción de peces el cuello de botella lo constituye la alimentación en las fases larvarias, porque por no ser la idónea se expresa en un número elevado de



mortalidad, específicamente en el cambio entre la reabsorción del saco vitelino y la primera alimentación exógena puntualiza Hernández (2015). Para esto, la calidad nutritiva de la *Artemia* tiene la mayoría de los macro y micronutrientes que necesitan los alevinos, y nutricionalmente es altamente digerible y aparentemente cubre la mayoría de los requerimientos de macro y micro nutrientes de larvas de peces y crustáceos, además se puede incrementar el nivel nutricional por medio del bioenriquecimiento (pudiéndose incorporar por este método también profilácticos, pigmentos, terapéuticos y vitaminas) (Ortega y Fuertes, 2016).

Es así que se opta por el uso de una alternativa, que está recibiendo un interés cada vez mayor es el empleo de probióticos enfatiza Tapia (2015). Ya que el empleo de este, disminuye la vulnerabilidad a enfermedades fortaleciendo el sistema inmunológico de las larvas que más adelante garantizará el buen estado de salud de los animales agrega Hernández (2015), en este sentido, Ortega y Fuertes (2016) indican que, la colonización y adhesión son los principales procesos que los organismos probióticos ejercen para el efecto benéfico en el tracto gastrointestinal de las especies hidrobiológicas en cultivo.

Para, Jimbo (2018) los probióticos utilizados en el alimento y agua tienen efectos positivos en los organismos de cultivo suministrado en el alimento, los probióticos modifican la comunidad microbiana ocupando nichos ecológicos compitiendo con bacterias patógenas, contribuyendo a la digestión aumentando la digestibilidad por medio de la producción de enzimas como las amilasas, proteasas y lipasas, aprovechando para su crecimiento materia orgánica, también mediante la producción de compuestos químicos como bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, acidofilin, lactolin, cidolin, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos.

Mejora la calidad del agua eliminando directamente la materia orgánica disuelta, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias, mejorando la salud, el sistema inmune del hospedero y aumentando la digestión, lo cual se ve reflejado en un aumento de producción en el cultivo describe Ardila (2010). Es así que, la aplicación de medidas preventivas y estudios epidemiológicos precisos, constituyen la clave para minimizar impactos de enfermedades. Por ello, hoy en día las investigaciones se centran en la búsqueda de métodos profilácticos alternativos que sean amigables con el medio ambiente (Sorroza *et al.*, 2005). Ya que las especies ícticas nativas del lago Titicaca son consideradas endémicas, porque son únicas en el mundo (Loayza, 2009).

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Biodiversidad del género *Orestias*.

Con respecto al número de especies nativas existentes, algunos autores indican que existen más de 24 de estas especies, pero las más importantes se mencionan en el siguiente cuadro.

Tabla 1. Identificación de las principales especies ícticas nativas del lago Titicaca.

Nombre científico	Nombre común
<i>Orestias luteus</i>	“carachi amarillo”
<i>Orestias agassii</i>	“carachi negro”
<i>Orestias pentlandii</i>	“boga” (no existe en el lago)
<i>Orestias cuvieri</i>	“umanto” (no existe en el lago)
<i>Orestias olivaceus</i>	“carachi enano (gringuito)”
<i>Orestias ispi</i>	“ispi”

Fuente. Zuñiga (1998).

2.2.2. Ecología y distribución natural del género *Orestias*.

Se extiende desde la provincia Ancash en el norte de Perú y Antofagasta en el norte de Chile entre 10° a 20° de latitud sur aproximadamente indica Dejoux y Iltis (1991). En la etapa de alevinaje habita en las regiones someras del litoral, en sitios de vegetación acuática es abundante, en la etapa de crecimiento emigran hacia las zonas profundas. En cuanto a la temperatura ideal para el crecimiento de estas especies, está dentro de un rango de 15 a 20 °C (Buitron, 2005).



Figura 1. Hembra de *Orestias luteus*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018.



Figura 2. Hembra de *Orestias agassii*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018.



2.2.3. Posición taxonomía de *Orestias*.

Sobre la base de la revisión bibliográfica especializada y a las investigaciones propias, Zuñiga (1998) menciona el siguiente orden taxonómico para las especies ícticas nativas del lago Titicaca.

Dominio	: Eukarya
Reino	: Animal
Phylum	: Chodata
Sub Phylum	: Vertebrata
Grupo	: Gnathostomata
Súper Clase	: Pisces
Clase	: Osteichthyes
Sub Clase	: Actinopterygii
División	: Teleostei
Súper Orden	: Cyprinodontimorpha
Orden	: Cyprinodontiformes
Sub Orden	: Cyprinodontoidei
Súper Familia	: Cyprinodontoidae
Familia	: Cyprinodontidae
Sub Familia	: Cyprinodontinae
Género	: <i>Orestias</i>
Especie	: <i>Orestias luteus</i> , <i>Orestias agassii</i>
Nombre vulgar:	“carachi amarillo” “carachi negro”

2.2.4. Características de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

Tabla 2. Comparación de características de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

<i>Orestias luteus</i>	<i>Orestias agassii</i>
Épocas de reproducción	
Para, Lauzanne <i>et al.</i> , (1991) se encuentran maduros sexualmente durante todo el año, la época de mayor reproducción es en los meses de julio a octubre, las ovas que producen son demersales más pesados que el agua, adhesivos y de color amarillo. En marzo a mayo tienen una mediana reproducción.	Para, Ohashi (1992) tienen ovas todo el año, pero maduran sexualmente en mayor porcentaje en los meses de julio a octubre, Producen huevos demersales más pesados que el agua, adhesivos, translúcidos, viscosos y amarillentos. En marzo a mayo tienen una mediana reproducción.
Hábitos alimenticios	
Según, Ohashi (1992) el contenido estomacal en mayor proporción es zooplancton y crustáceos, también de insectos del orden Díptera y Odonata, Moluscos y algas llegando a la conclusión de que esta especie es omnívora, según Vilca <i>et al.</i> , (2002) son zooplanctófaga, (<i>Hyaella</i> sp.) y según Atencio, (2013), son bentónicos carnívoros y con una dieta no muy diversificada (estenófaga).	Según, Guzmán y Sielfeld (2009) el contenido estomacal presentó; ostrácodos, anfípodos, copépodos, moluscos, coleópteros, ácaros y algas micrófitas, los resultados permiten afirmar que es un predador carnívoro, que consume una amplia variedad de micro crustáceos que busca activamente entre la vegetación, según Vilca <i>et al.</i> , (2002) las tallas menores tienen mayor preferencia por los organismos bentónicos y en las tallas mayores es zooplanctófaga.
Coloración	
Ohashi (1992) define que, la longitud del adulto varía en el rango de 10 a 15 cm, tiene una coloración café negruzca en la parte dorsal del tronco y varía a un color amarillento vivo en la parte ventral y la parte superior de la cabeza es más ancha, siendo los machos más pequeños que las hembras.	Ohashi (1992) define que, la longitud del adulto varía en el rango de 10 a 18 cm, la coloración, se puede diferenciar por su desmesurado polimorfismo, luce una coloración variada, especialmente en los estadios juveniles, los ejemplares adultos, son más negros en el dorso y más claras en los flancos y blancos en el vientre.
Forma y caracterización del cuerpo	
Tchernavin (1994) posee un cuerpo alargado protegido por escamas, de radios circulares, pedúnculo caudal que termina en lóbulos iguales (homocerca), boca protráctil con mandíbula, dos aletas pectorales, una dorsal posterior, una anal y una caudal, la aleta anal y dorsal se encuentran a la misma altura.	Ruiz (2004) posee un cuerpo alargado y fusiforme, con una sola aleta dorsal, carece de aletas pélvicas, las escamas del cuerpo varían dependiendo de la edad. Arratia (1981), también menciona que la cabeza comprende un patrón de escamación irregular, comúnmente en la región anterior a la órbita y la zona cefálica.
Tamaño y peso	
Tchernavin (1994) indica que, en machos llegan a alcanzar una longitud total de 122.9 mm, una longitud estándar de 102.0 mm y un peso de 44.6 g; en hembras la longitud total alcanzada es de 129.5 mm, una longitud estándar de 108.4 mm y un peso de 56.4 g. El “punku”, también denominado carachi amarillo <i>Orestias luteus</i> , es una de las especies ícticas más comunes del lago Titicaca.	Ruiz (2004) indica que, en machos llegan a obtener una longitud total de 14.31 mm, una longitud estándar de 11.73 mm y un peso de 45.7 g; en hembras la longitud total alcanzada es de 15.78 mm, una longitud estándar de 13.14 mm y un peso de 66.2 gramos. Es una de las especies ícticas más representativas del lago Titicaca, aunque aparentemente se presenta en menor biomasa al número que <i>Orestias luteus</i> .

Fuente. Elaboración propia, según estudios realizados por los autores mencionados en el cuadro.



Cabe mencionar también que las especies del genero *Orestias*, son especies oportunistas en su forma de nutrición ya que su alimentación va variar según el tipo de alimento que predomine en el medio que habitan. Se indica también que, la alimentación de las *Orestias* varía de acuerdo a la edad y biotopos; así los alevinos en sus primeras edades se alimentan de fitoplancton y zooplancton; los especímenes juveniles y adultos, tienen una alimentación eurífaga, dieta que está compuesta por varios componentes (Vilca *et al.*, 2002).

Identificación del sexo de *Orestias*

a. Tamaño

Una de las características que diferencia entre los peces del género *Orestias* es que, las hembras son más grande que el macho, pero éste método funciona cuando los peces son adultos, en los peces jóvenes o pequeños es muy difícil de aplicar este método, ya que se puede confundir una hembra joven que está en pleno crecimiento con un macho, por tanto, la eficiencia de este método es limitada (Sarmiento *et al.*, 1987).

b. Presión manual

En este método, Loayza (2009) da a conocer que la identificación del sexo es mediante la observación directa de los testículos de los peces machos (gónada masculina) y los ovarios en las hembras (gónada femenina), mediante, una presión suave con los dedos en el estómago del pez cerca al poro genital, con esta presión se provoca la salida de los productos sexuales: líquido seminal de color blanco lechoso en los machos y ovas maduras de color amarillo en hembras, característicos estos en el género *Orestias* (Sarmiento *et al.* 1987).

c. Disección

Sarmiento *et al.*, (1987) describen, a esta última metodología, la identificación del sexo es mediante la observación directa de los testículos de los peces machos (gónada masculina) y los ovarios en las hembras (gónada femenina), tiene que ser de manera directa, para la cual los peces deben tener la madures sexual adecuada, de no ser así, no será posible observar sus aparatos reproductores si los peces son pequeños y todavía no han alcanzado su madurez sexual (Castañón *et al.*, 2002).

Proporción sexual o *sex ratio*.

Es la proporción de machos y hembras presentes en una muestra poblacional, cuya dinámica está definida por factores intrínsecos (genéticos y fisiológicos), por factores extrínsecos (ecológicos), el *sex ratio* natural perfecto en los peces es de 1:1, un macho para una hembra, pero esta puede variar en función a la dinámica poblacional de la especie. Sin embargo, para fines de reproducción artificial la proporción sexual varía a favor de los machos, hasta de 3 hembras por 1 macho (Vilca *et al.*, 2002).

2.2.5. Manejo y reproducción artificial de *Orestias*.

Castañón *et al.*, (2002) manifiestan que, en este tipo de reproducción, al mezclar las ovas con el semen, se realiza un proceso que se conoce como fecundación artificial, este proceso se puede conseguir gracias a la intervención directa de la mano del hombre, en este sentido, Avila *et al.*, (1994) dan a conocer que, este periodo contempla el total desarrollo de las ovas, hasta la posterior eclosión y absorción del saco vitelino, es así que, este periodo es clave para el buen desarrollo de los peces, para esto, se requieren aguas cristalinas y bien oxigenadas, con temperaturas apropiadas y en condiciones de penumbra o semipenumbra adecuada (Huet, 1998).

2.2.6. Requerimientos medioambientales para el desarrollo.

Entre las propiedades más importantes tenemos la temperatura, oxígeno disuelto, pH y transparencia las cuales influyen directamente en los aspectos productivos y reproductivos de los peces. Por lo que, Lopez y Cruz (2011) revelan, que es importante que se mantengan dentro de los parámetros óptimos para garantizar el desarrollo de los peces. Y es imprescindible tener el control de los parámetros físicoquímicos, ya que de esto depende el éxito o fracaso del manejo durante el crecimiento de los alevinos. Lo cual, Loayza (2009) nos indica que, los parámetros a tomar en cuenta son:

a. Temperatura.

Vilca *et al.*, (2002) argumentan que, uno de los parámetros más importantes es la temperatura en etapa de incubación, ya que tiene una incidencia directa sobre el tiempo de incubación de las ovas hasta su eclosión. Es así que, los cambios de temperatura afectan directamente la tasa metabólica, mientras mayor sea la temperatura, mayor será la tasa metabólica, por ende, subirá el consumo de oxígeno (Lopez y Cruz, 2011).



b. Oxígeno disuelto.

Para Imaki (1987) el oxígeno en la incubación, es necesario para una buena oxigenación durante el proceso de la incubación, de no ser así se produce la muerte de las ovas por asfixia; el oxígeno en alevinos; rango óptimo está por encima de los 4 mg/l. Dado que:

- 0.0 – 0.3; Los peces pequeños sobreviven en cortos períodos.
- 0.3 – 2.0; Letal en exposiciones prolongadas.
- 3.0 – 4.0; Los peces sobreviven, pero crecen lentamente.
- 4.5; Rango deseable para el crecimiento del pez.

c. Luz.

Según Imaki (1987) las ovas no son resistentes a la luz, sobre todo en el primer periodo embrionario, ya que pueden ocasionar la muerte de las mismas.

d. pH.

El pH, viene a ser la expresión química usada para indicar la concentración de iones hidrógeno (H^+), en una solución, siendo muy útil para indicar cuantitativamente la acidez o basicidad (OH^-) en un sistema acuático. El rango normal del agua para el cultivo de peces se encuentra entre 6.5 y 9.0 (Loayza, 2009).

e. Transparencia.

Se recomienda hacer recambios de agua en proporción al nivel de turbidez que se presenta, hasta dejarla en los valores ideales, este recambio puede ser continuo o bajando el nivel del agua entre 30 y 40 cm para reponerla con agua nueva, el color ideal a obtener es un verde claro.

2.2.7. Incubadoras en la reproducción artificial.

Loayza (2009) manifiesta que, las incubadoras mantienen a los huevos fecundados y embrionados en un ambiente lo más ideal posible, permitiendo al mismo tiempo la vigilancia del desarrollo embrionario, por ello que deben emplearse sistemas de fácil manipuleo, es así que la incubadora vertical o de flujo vertical, tiene las características de mantener un flujo de agua constante y de forma adecuada para el movimiento de

las ovas con la acción de la corriente pues favorezca el buen desarrollo de huevos. Además, este ya fue utilizados para la incubación de ovas de *Orestias luteus* “carachi amarillo” *Orestias agassii* “carachi negro”, con resultados satisfactorios, ya que tiene una capacidad de incubar de hasta 4,000 a 6,000 ovas en cada vaso (Vilca *et al.*, 2002).

Tabla 3. Comparación de dos tipos de incubadoras para la producción de alevinos.

Caracterización	Horizontal	Vertical
Tiempo	Hasta la alimentación inicial	Hasta el término de la absorción del saco vitelino
Capacidad	Pequeña	Grande
Control	Fácil	Difícil
Selección de ovas	Fácil	Difícil
Movimiento de agua	Un poco defectuoso	Bueno
Frecuencia de asfixia	Frecuente	Rara

Fuente. Imaki (1987).

2.2.8. Fases de incubación y alevinaje de *Orestias*.

Huet (1998) indica que, se distinguen tres fases en el periodo que se extiende desde el principio de la incubación hasta que finaliza la reabsorción de la vesícula vitelina.

- Primera fase: Desde la fecundación hasta la aparición de los ojos del embrión, de 6 a 7 días.
- Segunda fase: Esta fase va desde la aparición de los ojos (oculación) a la eclosión o nacimiento de los peces, de 14 a 16 días.
- Tercera fase: Esta última fase comprende desde la eclosión hasta la reabsorción del saco vitelino (bolsa en el estómago que tienen los alevinos después de nacer), de 4 a 6 días.

2.2.9. Problemas sanitarios durante la incubación.

Durante la incubación se presenta problemas causados por *Saprolegnia* sp. el cual es un micófito acuático que ataca a las ovas fecundadas y muertas, el mismo presenta una coloración blanquecina (materia parecida a la fibra de algodón) (Loayza, 2009).



2.3. Características de *Artemia*

2.3.1. Clasificación taxonómica de *Artemia*.

Reino	: Metazoa
Sub reino	: Eumetazoa
Phylum	: Arthropoda
Sub phylum	: Mandibulata
Clase	: Crustacea
Subclase	: Branchiopoda
Infraclase	: Sarsostraca
Orden	: Anostraca
Familia	: Artemiidae
Género	: <i>Artemia</i> Leach 1819

2.3.2. Morfología y ciclo vital de *Artemia*.

El primer estado larvario (también llamado estado I) mide entre 400 y 500 μ de longitud, la cara ventral del animal se encuentra cubierta por un amplio labro que interviene en la toma de alimento (transfiriendo las partículas desde las setas filtradoras hasta la boca). El estado larvario I no se alimenta ya que su aparato digestivo no es todavía funcional (permaneciendo aún cerrados la boca y el ano). Tras aproximadamente 24 horas, el animal muda al segundo estado larvario (también llamado estado II). Donde ya se puede incorporar pequeñas partículas alimenticias (tales como células de microalgas, bacterias, detritus) con un tamaño que varía entre 1 y 40 micras son filtradas por el segundo par de antenas, siendo entonces ingeridas por un aparato digestivo ya funcional (Salgado, 2001).

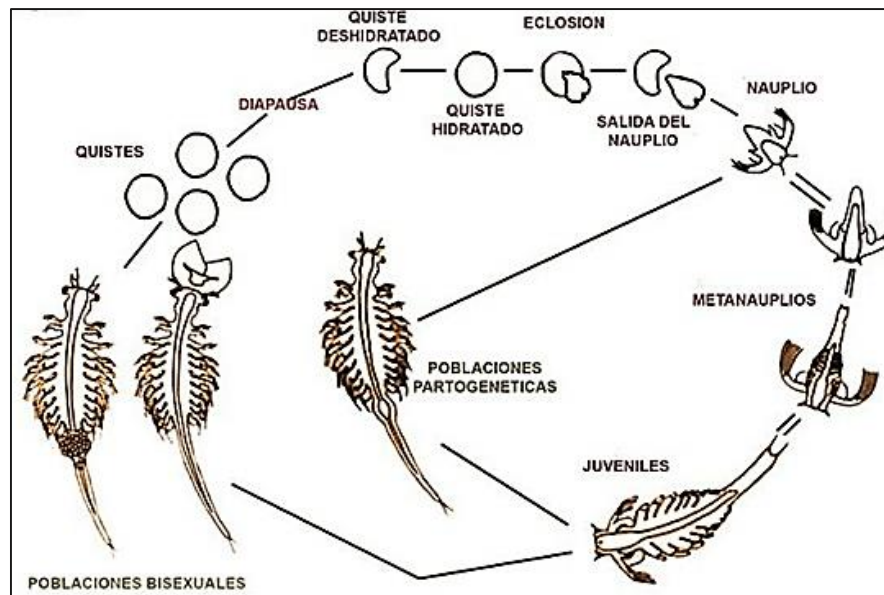


Figura 3. Ciclo biológico de la *Artemia*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 30 de marzo del 2018. Fuente <http://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/>.

En condiciones adecuadas esta especie puede vivir varios meses, creciendo de nauplio a adulto en solo 8 días y reproduciéndose a una tasa de hasta 300 nauplios o quistes cada 4 días. Los adultos de *Artemia* miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogénicas (Salgado, 2001).

2.3.3. Valor nutricional de la *Artemia*.

La *Artemia* es el mejor alimento vivo en la acuicultura por sus características de desarrollo, su pequeño tamaño de nauplio y meta nauplio (adecuado para las larvas y juveniles de crustáceos y peces) y fácil manejo, etc. El valor nutritivo de los nauplios recién eclosionados es muy alto. Si los (metanauplio y nauplio) es alimentada adecuadamente, podemos obtener un enriquecimiento de nutrientes esenciales en un sustrato de micro algas (vivas o secas), o en una mezcla artificial de nutrientes (lípidos, aminoácidos, ácidos grasos, etc.) (Loayza, 2017). Es así que, la *Artemia* es nutricionalmente altamente digerible y aparentemente cubre la mayoría de los requerimientos de macro y micro nutrientes de larvas de peces y crustáceos (Ortega y Fuertes, 2016).

2.3.4. Uso de *Artemia* en la acuicultura.

La *Artemia* decapsulada se utiliza para alimentar las larvas más pequeñas (ya que las larvas son de menor tamaño y más lentas en el nado que los nauplios de *Artemia*) o para posterior incubación disminuyendo el riesgo de contaminación con bacterias presentes en el corion y el riesgo de que la larva ingiera un quiste con corion (Ortega



y Fuertes, 2016). Para tener una eficiencia de eclosión, registra el número de nauplios que nacen de un gramo de quistes comercializado, la cantidad de gramos del producto necesarios para producir un millón de nauplios. Todo esto bajo condiciones estándares de (48 horas de incubación con una salinidad de 35 ppm, una saturación de oxígeno de 25 °C, con una intensidad luminosa mínima 1000 lux y pH 8.0 a 8.5). En este sentido Salgado (2001) indica que, el promedio más bajo es de 281,920 nauplios por gramo de producto y una máxima de 298,000, en los cultivos realizados respecto a la eficiencia de eclosión.

Los nauplios de *Artemia* se utilizan en todo el mundo como alimento vivo para las etapas larvarias de especies de agua dulce y marinas comercialmente importantes, debido a su disponibilidad en el mercado, relativo bajo costo, facilidad de cultivo y composición bioquímica que los convierte en una dieta viva de excelente calidad nutricional (Salgado, 2001), además de su utilización como un agente bioencapsulante que al suministro de nutrientes, puede variar dependiendo de los deseos del cultivador y generalmente el proceso está dirigido a la incorporación de algún elemento esencial para la dieta del depredador (Castro *et al.*, 2005).

2.4. Bioencapsulación

La bioencapsulación o bioenriquecimiento es un proceso mediante el cual un organismo vivo incorpora un determinado producto o agente bioencapsulante via oral, de esta forma, dicho organismo se convierte a los efectos prácticos en una capsula viva, para mejorar la nutrición de los organismos, alimentándolos con organismos vivos o incorporándolo junto con varios tipos de nutrientes (Verschuere *et al.*, 2000). Diferentes tipos de alimento vivo han sido usados para alimentar larvas de diversos organismos acuáticos, estos incluyen copépodos, nematodos, rotíferos y nauplios de *Artemia*, este último organismo, es considerado como la mejor dieta para organismos zoófagos y se suministra como alimento vivo a más del 85 % de las especies en la acuicultura (Castro *et al.*, 2005).

Castro *et al.*, (2005) dan a conocer que, la técnica de bioencapsulación empieza a desarrollarse en la década de los 70 existen numerosos trabajos al respecto, en los 80 y 90 la mayoría de las investigaciones utilizan dicha técnica para mejorar la calidad nutricional de *Artemia* al enriquecerla con diversos ácidos grasos. Es así que, el valor



nutritivo de los nauplios de *Artemia* puede ser incrementado con la aplicación de esta técnica, mediante la inoculación de probióticos a través de la bioencapsulación para suministrar las cepas adecuadas (Ossorio, 2018).

Salgado (2001), define que, la *Artemia* es un crustáceo filtrador obligado no selectivo y se alimenta tanto de materia orgánica particulada (Ej. detritos biológicos procedentes de aguas de manglares) como de organismos vivos de tamaño apropiado (microalgas y bacterias), asimismo, Loayza (2017), da a conocer que esa especie vive en aguas salinas debido a su elevado tenor de proteínas de 50 a 60 % y una amplia gama de aminoácidos y ácidos grasos poliinsaturados, se desarrolla en temperaturas de 6 hasta 35°C. Además, que posee un alto fuente de nutrientes, por ello, son considerados alimento para peces, aves y muchos invertebrados, y una característica peculiar que las hembras tienen es la capacidad de producir quistes en estado de latencia o diapausa (parada reversible del metabolismo embrionario) cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie, y en condiciones adecuadas. En este sentido, Valenzuela (2018) destaca las siguientes ventajas que ofrece la *Artemia* en proceso de su manejo:

- No hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente
- Las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario
- Se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica

Sorgeloos (2014) da a conocer que, la bioencapsulación de nauplios de *Artemia*, no solamente consiste en enriquecerlos con nutrientes, también se pueden incorporar otros componentes como algas, levaduras, emulsiones, vitaminas, pigmentos, aminoácidos, e incluso tratamientos profilácticos o terapéuticos, permitiendo una mayor ingestión por parte de las larvas, al mejorar la composición nutritiva de los nauplios, se obtendrá éxito en los cultivos larvarios, como resultado de un mejor estado fisiológico, reflejado en mayor cantidad de larvas activas, además de incrementar la supervivencia y crecimiento en las fases posteriores. Para la cual se hace necesario establecer un tiempo máximo de enriquecimiento para garantizar que los nutrientes no se sintetizan en el tracto digestivo del nauplio, e incrementen su tamaño, ya que, a mayor tamaño de la *Artemia*, más tardío el estadio larval al que se le podrá ofrecer.

2.5. Probióticos

Los denominados probióticos según Ortega y Fuertes (2016) son sustancias inmunoestimulantes ya que, tienen la capacidad de alterar el sistema inmune no específico y son por regla general extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias gram positivas (peptidoglicanos) y de hongos, levaduras y algas (β-glucanos) y se incluyen las bacterias beneficiosas. De los géneros de bacterias más investigados están: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, que son los que presentan resultados más consistentes. Además, los *Lactobacillus* fueron los primeros microorganismos en ser suministrados en su forma viva, por vía oral, con el objetivo de producir efectos benéficos a la microbiota digestiva (Castro *et al.*, 2005).

Tabla 4. Microorganismos utilizados como probióticos en la acuicultura.

Género	Especie
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i> .
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. lactis</i> .
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cellobiosus</i> ,
<i>Lactococcus</i>	<i>L. fermentarium</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuterii</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. carnobacterium spp.</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilacticii</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. damnosus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardi</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. diacetylatis</i>

Fuente. Azevedor y Tavares, citado por Ortega y Fuertes (2016) Use of probiotics in aquaculture, disponible en internet.

La mayoría de las bacterias probióticas propuestas para el uso en acuicultura pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, y *Saccharomyces* (Nayak, 2010).

a. Primer probiótico utilizado

En el caso de la acuicultura, el primer probiótico usado comercialmente se registró en 1992 y fue una cepa no patógena de *Vibrio alginolyticus* que permitió mejorar sustancialmente el rendimiento en viveros de camarones en Ecuador y México (Verschuere *et al.*, 2000).



b. Los probióticos más comerciales

Entre los principales productos comerciales elaborados se destacan bacilos, aeromonas, estreptococos, levaduras, pseudomonas, microalgas, bacterias ácido lácticas (lactobacilos y bifidobacterias) y vibrios benéficos (Jimbo, 2018). Y algunos probióticos ya se comercializan bajo la forma de preparados, que contienen uno o varios microorganismos vivos, los cuales han permitido mejoras en el crecimiento, sobrevivencia y resistencia a enfermedades de diferentes organismos acuáticos (Monroy *et al.*, 2012). En la actualidad existen en el mercado varias marcas de probióticos, en presentación líquida y sólida, con una gama de *Bacilos*, *Lactobacilos* y enzimas con diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC). Algunos son activados en agua, fuente de carbono, fuente de nitrógeno mientras que otros solo necesitan ser hidratados y aplicados directamente (Cuadro, 2014).

Un factor limitante en el uso de probióticos, es la selección de cepas de bacterias como probióticos para la acuicultura, la cantidad de dosificación en la fase de cultivo (larvario, alevinaje y engorde) en la que se encuentre y las condiciones ambientales de cultivo. De manera que, la aplicación de los probióticos en acuicultura está condicionada por las diferencias específicas de las especies en cultivo (ej. microbiota del tracto gastrointestinal) y las condiciones de cultivo de la misma (temperatura de cultivo, salinidad, pH, etc.) (Cruz, 2013).

2.5.1. Uso de bacterias probióticas en la acuicultura.

La mejor definición para probióticos en acuicultura lo dan, Verschuere *et al.*, (2000) como, complemento de microorganismos benéficos vivos que al ser suministrados modifican la comunidad microbiana del huésped o del medio sea este suelo o agua, asegurando una mayor sobrevivencia, un mejor uso del alimento (realzando la nutrición), la respuesta a las enfermedades del huésped y mejora la calidad del medio ambiente. Asimismo, Merrifield *et al.*, (2010) dieron la definición al “probiótico” en la acuicultura, como célula microbiana viva, muerta o componente celular que, al ser administrado vía alimentación o en el agua de cultivo, beneficia al huésped, mejorando la resistencia frente a las enfermedades mejorando el balance microbiano del huésped o del medio que le rodea.



En uso de probióticos en la acuicultura según, Díaz *et al.*, (2009) se han incrementado en los últimos años debido a sus efectos beneficiosos, como son el incremento de las tasas de crecimiento y conversión del alimento, la disminución del crecimiento de patógenos, la mejora del sistema inmune o el aumento de la tolerancia al estrés, dando atributo principalmente al establecimiento en el tracto gastrointestinal (TGI) del hospedero, contribuyendo al balance de la microflora y mejorando la absorción de nutrientes, debido a la producción de enzimas digestivas (proteasas y amilasas) y exoenzimas cuya función es romper la celulosa y el almidón del alimento, facilitando de esta manera su asimilación (Gatesoupe, 2008).

Para, Verschuere *et al.*, (2008) los beneficios observados en la administración de suplementos de probióticos en la acuicultura incluyen: Aumento del valor nutricional de los alimentos, contribución a la digestión enzimática, la inhibición de patógenos, factores promotores del crecimiento y mejora de la respuesta inmune.

2.5.2. Mecanismos de acción de bacterias probióticas.

La acción de los prebióticos es que, pueden producir metabolitos que generan una especie de antagonismo que actúa en contra de patógenos disminuyendo su población, compitiendo por nutrientes y sitios de adhesión, produciendo compuestos antimicrobianos, alterando el metabolismo microbiano activando así la actividad enzimática digestiva y disminuyendo las enzimas digestivas no deseadas, además que, activan la estimulación inmunológica aumentando el nivel de anticuerpos y la actividad de macrófagos (Ramirez, 2006).

a) Mecanismo de exclusión competitiva:

Varios mecanismos han sido reportados por los cuales las bacterias probióticas ejercen su acción, pero la de mayor importancia es el “Mecanismo de Exclusión Competitiva”, que se basa en la sustitución de la población patógena por la población benéfica, debido a tres causas como: Producción de compuestos inhibidores; capacidad de liberar sustancias químicas con efecto bactericida o bacteriostático, constituyendo una barrera contra patógenos oportunistas indican Guillian *et al.*, (2003).



Asimismo, Lopez y Cruz (2011) afirman que, estas cepas pueden alterar la relación entre el grupo de bacterias presentes, ya que influyen en la competencia por la disponibilidad de energía y sustancias químicas, ya que son microorganismos que producen sustancias inhibitorias de microorganismos en el intestino que constituyen una barrera en contra de la proliferación de patógenos oportunistas, mediante la inhibición de la multiplicación de patógenos gracias a la producción de compuestos como ácidos orgánicos, bacteriocinas.

Competencia por compuestos químicos o por energía disponible; Sullivan (2001) define que, entre los microorganismos existe competencia por los nutrientes que hay en el medio y por ende por la energía que pudiera obtenerse de estos. Es así que un compuesto químico importante para la mayoría de los microorganismos es el hierro, ya que las principales funciones son reguladas por este elemento. Los organismos secretan sideróforos, agentes hierro-específicos de bajo peso molecular que permiten la disolución del hierro precipitado y lo hacen disponible para el crecimiento de los microorganismos. En un ecosistema, los colonizadores dominantes presentan sistemas más avanzados de sideróforos, hierro que les permite inhibir el crecimiento de otros microorganismos privándolos de este elemento.

Competencias por sitios de adhesión con respecto a los microorganismos patógenos; El probiótico compite con los patógenos por los sitios de adhesión, no solo compite por el espacio para la fijación, sino que puede producir sustancias inhibitorias una vez fijada en el tejido. Es así que, este fenómeno se conoce como exclusión competitiva, y si esto no se lleva a cabo, las bacterias benéficas se consideran como microorganismos en tránsito y se eliminan junto con las heces, sin haber ejercido su función probiótica de manera adecuada (Gatesoupe, 2008).

b) Mecanismo de acción benéfica:

Bardales (2015) refiere, los aportes benéficos que ejercen los probióticos sobre el huésped son: estimulación de la inmunidad y producción de enzimas digestivas para la degradación de nutrientes.



Estimulación del Sistema inmune en los peces; es mediante la introducción oral de microorganismos probióticos que incrementa y mejoran la resistencia del huésped contra los microorganismos patógenos y facilitan la exclusión de los mismos del epitelio intestinal, para tal efecto Sullivan (2001) determina, que la ingestión de ciertas bacterias ácido lácticas aumenta la secreción de los niveles de 21 inmunoglobulina A (IgA) en los organismos, un inmunoestimulante es un compuesto que se presenta naturalmente y modula el sistema inmune incrementando la resistencia del hospedero en contra de enfermedades, que en la mayoría de los casos son causadas por patógenos.

Producción y liberación de enzimas digestivas; Se ha determinado que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce efectos positivos en *Oreochromis niloticus* sobre la actividad enzimática en el intestino de los peces: aumento del contenido de la fosfatasa alcalina, la maltasa, peptidasa, disacaridasa, etc. (Lara *et al.*, 2002).

2.5.3. Importancia de las bacterias probióticas.

Los probióticos deben presentar y mantener unas características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el alimento que las contiene o al que se adiciona; entre esas características están: la viabilidad durante el proceso y almacenamiento del alimento (capacidad que tienen estos microorganismos de permanecer vivos tanto en el alimento como en el intestino del consumidor durante un tiempo determinado), estabilidad frente a ácidos gástricos y biliares (resistir a las concentraciones de ácidos y sales biliares del estómago o intestino delgado del consumidor), adherencia a la mucosa intestinal (los probióticos deben colonizar el ecosistema del tracto intestinal fijándose al epitelio del mismo, esto se logra gracias a un flujo lento del probiótico a través del tracto, y producción de sustancias antimicrobianas (cuando estos microorganismos metabolizan carbohidratos y sintetizan compuestos como: ácido láctico, fórmico, acético, entre otros). Una de las características más imprescindibles es la estabilidad en el organismo, mediante la resistencia a los ácidos gástrico biliares, adherencia a la mucosa intestinal (Apun, 2007).



2.6. Marco Conceptual

Ambientes controlados: lugar en el que se ha cuidado hasta el mínimo detalle ambiental mediante métodos no naturales (Bardales, 2015).

Alevino: es utilizada comúnmente para designar a las crías de peces, son crías de peces inmaduros que aún no han alcanzado la fase adulta (Cortes, 2003).

Alimento vivo: en acuicultura se describe al grupo de organismos planctónicos que constituyen la base en la alimentación de los estadios larvarios de los crustáceos, las postlarvas de peces y las diferentes fases en el desarrollo de los moluscos (Guevara, 2005).

Adherencia: proceso de unión de bacterias a células u otras superficies, previo a la proliferación (Ortega y Fuertes, 2016).

Biotopo: es un área de condiciones ambientales uniformes que provee espacio vital a un conjunto de flora y fauna. El biotopo es casi sinónimo del término hábitat con la diferencia de que hábitat se refiere a las especies o poblaciones mientras que biotopo se refiere a las comunidades biológicas (Atencio, 2013).

Colonización: capacidad de las bacterias para establecerse y multiplicarse en la piel y/o mucosas del huésped en cantidades suficientes que permitan mantener un cierto número poblacional, sin que su presencia determine respuestas clínicas ni inmunológicas. (Ortega y Fuertes, 2016).

Dieta: una dieta es el conjunto de nutrientes que se ingieren durante el consumo habitual de alimentos. La dieta se considera equilibrada si aporta los nutrientes y energía en cantidades tales que permiten mantener las funciones del organismo en un contexto de salud física y mental (Franssen y Gido, 2006).

Estrés fisiológico: es definido como una situación en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (estado homeostático) es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo intrínseco o extrínseco al animal, denominado agente estresante (Papoutsoglou *et al.*, 2000).



Extinción: es la desaparición de todos los miembros de una especie o un grupo de taxones, se considera extinta a una especie a partir del instante en que muere el último individuo de esta (FAO, 2010).

Larva: las larvas son las fases juveniles de los animales con desarrollo indirecto (con metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y ecología diferente del adulto (FAO, 2010).

Microbiota: ecosistema microbiano complejo y dinámico que coloniza el tracto digestivo y que beneficia la salud del organismo mediante la promoción de suministro de nutrientes previniendo la colonización de agentes infecciosos (Magdalena *et al.*, 2011).

Probiótico: se considera probiótico aquel que contiene microorganismos vivos presentes en un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos, se define como un suplemento microbiano formado por un cultivo simple o mixto de microorganismos seleccionados que son adicionados con el propósito de manipular las poblaciones bacterianas presentes en los sistemas de producción (Ortega y Fuertes, 2016).

Reproducción ovovivípara: es la especie de animales que incuban los huevos intracorporales, pero sin establecerse relación alimentaria madre e hijo durante el desarrollo embrionario dentro del huevo (Da Costa, 1972).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce PHAD, ubicado en el km 12 de la Panamericana sur, Sector Callejón del Centro Poblado de Ichu, del Departamento de Puno, Perú.

Altitud	: 3810
Latitud sur	: 15° 87´
Longitud oeste	: 69° 94´
Distrito	: Puno
Provincia	: Puno
Región	: Puno
Zona agroecológica	: Circunlacustre

3.2. Periodo del Trabajo de Investigación

El tiempo de ejecución de este trabajo de investigación fue de 5 meses entre los meses de febrero a junio del 2018, en condiciones de laboratorio, comprendió las actividades de acondicionamiento de las instalaciones, obtención de alevinos, aclimatación de alevinos, preparación y evaluación de los tratamientos hasta la obtención de los datos.



Figura 4. Mapa geográfico del lugar de la investigación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018. Fuente Google Maps.

3.3. Material Biológico

El material biológico estuvo constituido por 3,000 alevinos de “carachi amarillo” *Orestias luteus* y 3,000 alevinos de “carachi negro” *Orestias agassii*, siendo un total de 6,000 alevinos utilizados para la investigación, con una longitud de 6.5 cm y un peso de 0.0074 g, obtenido en el laboratorio.

3.4. Unidades Experimentales

Se utilizaron 24 acuarios con medidas de 60 cm de largo, 35 cm de altura y 40 cm de ancho, con una capacidad de 60 l, distribuidos para tres tratamientos con tres repeticiones y tres como grupo control, con respectivos termostatos calibrados a 14°C, oxigenación, biofiltros y una iluminación homogénea de 12 horas oscuridad y 12 horas de luz.

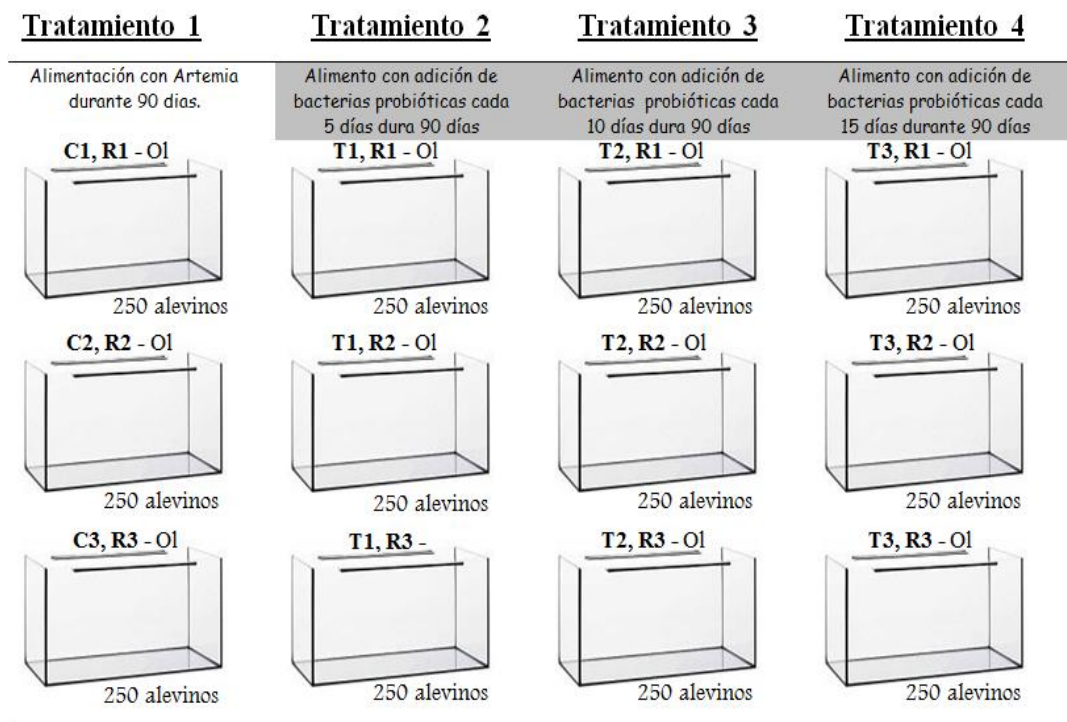


Figura 5. Distribución de las 12 unidades experimentales para alevinos de *Orestias luteus*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 12 de febrero del 2018. Fuente Elaboración Propia.

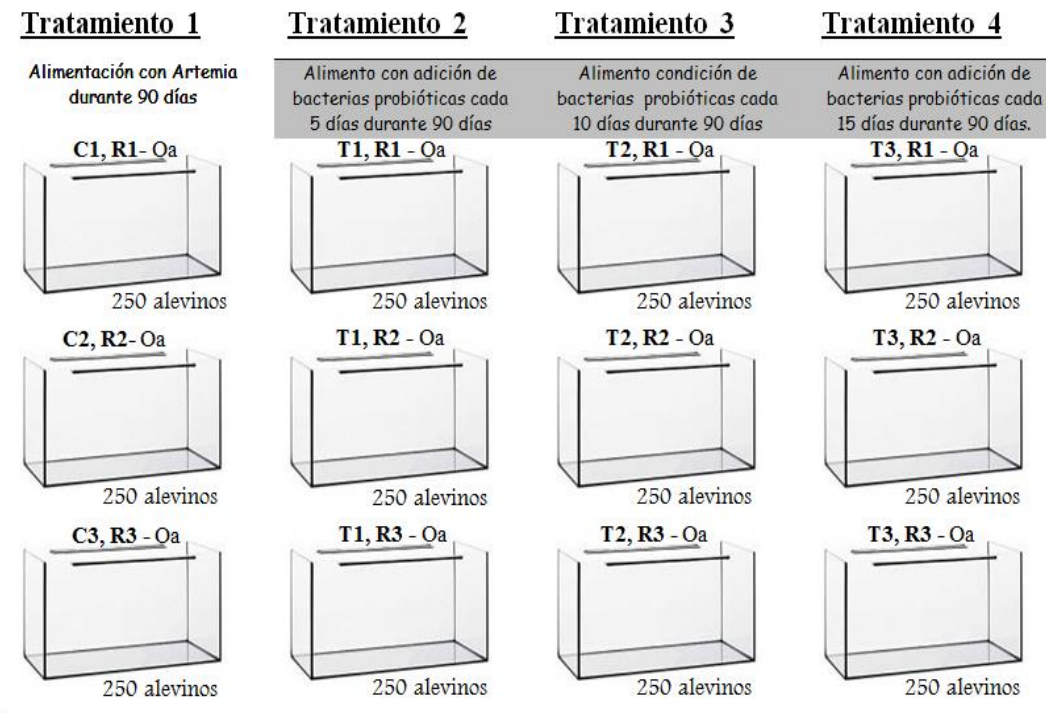


Figura 6. Distribución de las 12 unidades experimentales para alevinos de *Orestias agassii*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 12 de febrero del 2018. Fuente Elaboración Propia.

3.5. Tratamientos a Comparar

Los tratamientos que se tomaran en cuenta para los alevinos de *Orestias luteus* son los siguientes:

- **Tratamiento 1:** Alimentación con nauplios de *Artemia* sin la adición de bacterias probióticas a los alevinos de *Orestias luteus*.
- **Tratamiento 2:** Adición de bacterias probióticas cada 5 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* a alevinos de *Orestias luteus*.
- **Tratamiento 3:** Adición de bacterias probióticas cada 10 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* a alevinos de *Orestias luteus*.
- **Tratamiento 4:** Adición de bacterias probióticas cada 15 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* a alevinos de *Orestias luteus*.

Los tratamientos que se tomaran en cuenta para los alevinos de *Orestias agassii* son los siguientes:

- **Tratamiento 1:** Alimentación con nauplios de *Artemia* sin la adición de bacterias probióticas a los alevinos de *Orestias agassii*.
- **Tratamiento 2:** Adición de bacterias probióticas cada 5 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* a alevinos de *Orestias agassii*.
- **Tratamiento 3:** Adición de bacterias probióticas cada 10 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* a alevinos de *Orestias agassii*.
- **Tratamiento 4:** Adición de bacterias probióticas cada 15 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* a alevinos de *Orestias agassii*.

3.6. Metodología

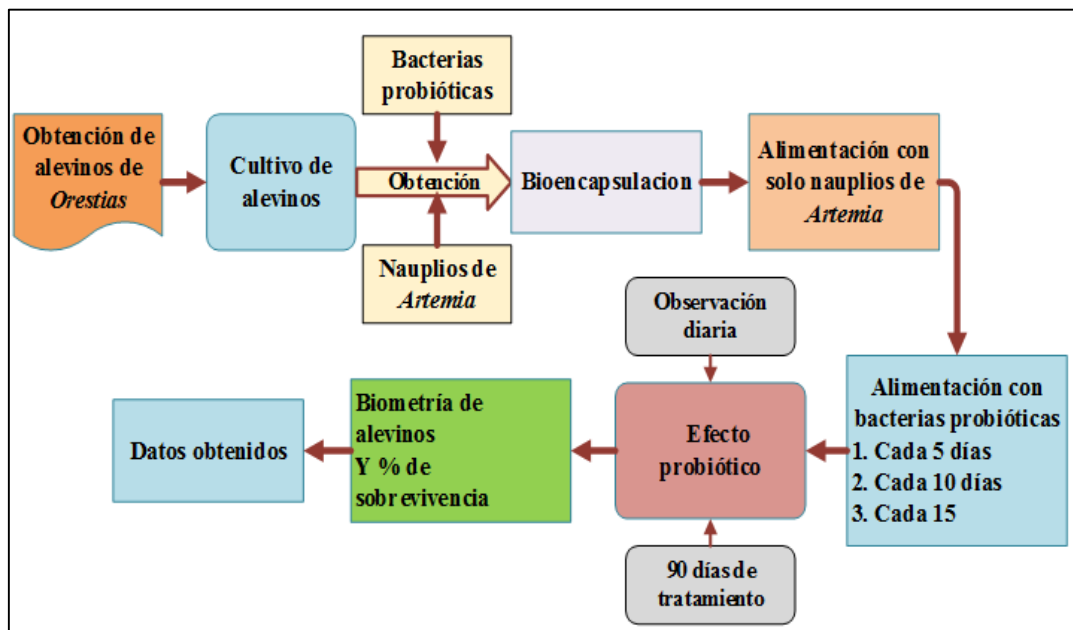


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de investigación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, del 05 de marzo a 01 de junio del 2018.

3.6.1. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento de longitud y peso de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

3.6.1.1. Frecuencia y muestreo.

Las evaluaciones o muestreos de los experimentos para la determinación biométrica (longitud y peso), fue de 10 alevinos elegidos al azar, de cada unidad experimental (250 alevinos).

3.6.1.2. Descripción detallada de metodologías.

Metodología de la obtención de alevinos.

Para el desarrollo de los objetivos, de manera anticipada se procedió a obtener los alevinos de *Orestias*. El trabajo experimental se inició con la incubación de ovas de ambas especies, para la cual anticipadamente se prepara el área de incubación instalando 6 vasos de incubación tipo vertical (vasos Mac Donald), (3 vasos para la incubación de ovas de *Orestias luteus* y 3 vasos para la incubación de ovas de *Orestias Agassi*, con flujo de agua constante de 2 l/min (suficiente para mantener en movimiento las ovas en incubación), con temperatura mínima de 15.2 °C y una máxima de 16 °C. La metodología aplicada para la obtención de alevinos de *Orestias* según Vilca, *et al.*, (2002) es:

a) Obtención de reproductores:

los reproductores se obtuvieron mediante la compra directa de los pescadores artesanales de determinadas zonas, previamente instruidos, para la cual el acopio de ovas se programó a las 5:30 a 6:30 am, que es la hora que los pescadores arriban a la orilla con los especímenes requeridos.



Figura 8. Cantidad de reproductores obtenidos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*. Sector Vallecito del departamento de Puno, 05 de marzo del 2018.

b) Selección y sexado de reproductores (longitud, peso y sexo):

Proceso en donde se realizó el sexado (separación de machos y hembras) el reconocimiento de sexo y la selección de peces sexualmente maduros, se realizó mediante una pequeña presión a nivel ventral hacia la parte poro genital con los dedos del pulgar e índice para así determinar la presencia de óvulos y esperma viables. Ya que no todos los especímenes serán reproductivamente aptos.

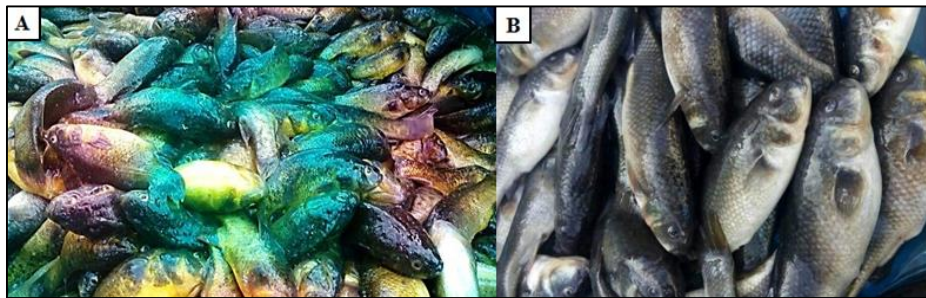


Figura 9. Selección de peces reproductivamente aptos: A) *Orestias luteus*, B) *Orestias agassii*. Sector Vallecito del departamento de Puno, 05 de marzo del 2018.

En la selección de especies reproductivamente aptas entre machos y hembras se consideró peso, talla, características fenotípicas y ejemplares de estadios V y VI (entre dos a tres años de edad). Las características de los productos sexuales fueron; ovas aptas (en grado V de madurez sexual) que tenían la coloración amarillo-transparente, con un diámetro de 1.5 a 2 mm, una de las características más importantes fue que las ovas aptas al presionar el vientre fluyen libremente sin formar grumos, y el semen de los machos aptos (en grado V de madurez sexual) es de color blanco-lechoso (Vilca, *et al.*, 2002).

c) Desove fecundación artificial:

Se extrajo las ovas del pez hembra previamente secados con una toalla de forma mecánica, mediante el método de la translocación que consistió en presionar suavemente con los dedos del pulgar e índice empezando en la parte pectoral, avanzando hacia la parte media y concluyendo en la parte poro genital. Según Polo (2005) las ovas que están maduras saldrán muy fácilmente ante una leve presión, las cuales luego deben ser depositadas en un recipiente limpio. Fecundación artificial se realizó mediante el método seco o de Brasky, que consistió en recepcionar las ovas aptas en un recipiente seco, luego se añadió el semen del pez macho y con una pluma se distribuyó el semen añadido de forma uniforme para que todas las ovas queden fecundadas, luego de esto las ovas quedaron embrionadas y aglutinadas.

Esta operación se efectuó de manera rápida y en un lugar sombreado para evitar la mortalidad de las ovas por efecto de los rayos UV sin contacto con el agua, para impedir el cierre del micrópilo (abertura por donde penetra el espermatozoide para fecundar el óvulo); por otra parte, al realizar el desove se evitó la salida de restos fecales, sangre u orina ya que al mezclarse con las ovas extraídas puede dificultar la fecundación indica Poma (2005). Es así que el sex ratio empleada fue de 2 hembras por un macho (2:1) y la adición de esperma fue de forma directa, y en una proporción mayor del *sex ratio* fue de 4 hembras para un macho (4:1) para la cual se sacrificó al macho y se extrajo las gónadas (testículo) para aprovechar todo el esperma posible.

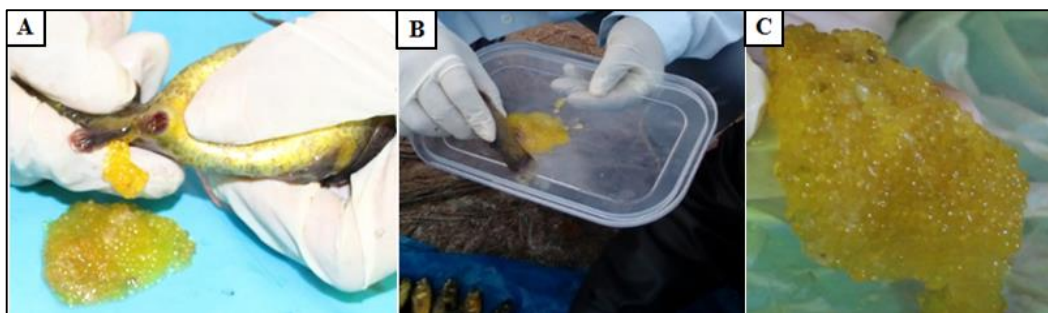


Figura 10. Fecundación artificial: A) Desove, B) Fecundación, C) Ovas embrionadas y aglutinadas. Sector Vallecito del departamento de Puno, 05 de marzo del 2018.

d) Traslado de ovas al laboratorio:

La masa de productos sexuales se pasó a hidratación (sumergidos en agua) en un recipiente para su traslado al laboratorio de incubación.

e) Lavado e hidratación de ovas:

Llegado al laboratorio, las ovas fecundadas se dispusieron en los vasos de incubación con agua y un movimiento constante durante 24 horas para su máxima hidratación y endurecimiento para poder manipularlos sin peligro de maltrato.

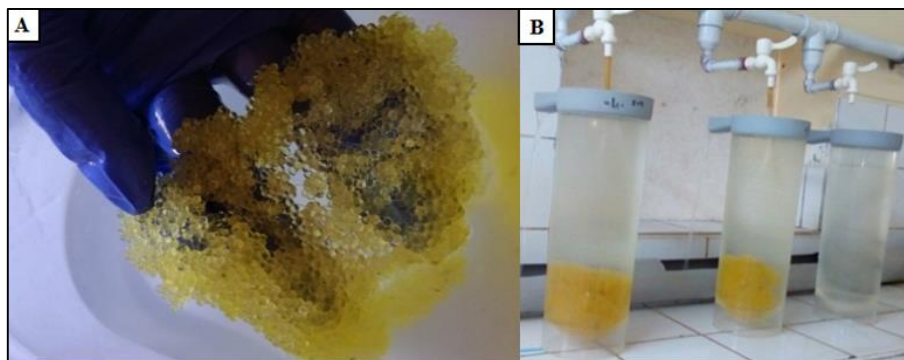


Figura 11. Endurecimiento de ovas fecundadas: A) Lavado de ovas fecundadas antes de la incubación, B) Flujo de agua constante durante 24 horas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 05 de marzo del 2018.

f) Desaglutinacion (separación de ovas):

La desaglutinacion fue de forma mecánica con la yema de los dedos, separándolos en unidades manualmente, pero de manera delicada, haciendo movimientos como desgranar un racimo de uvas.

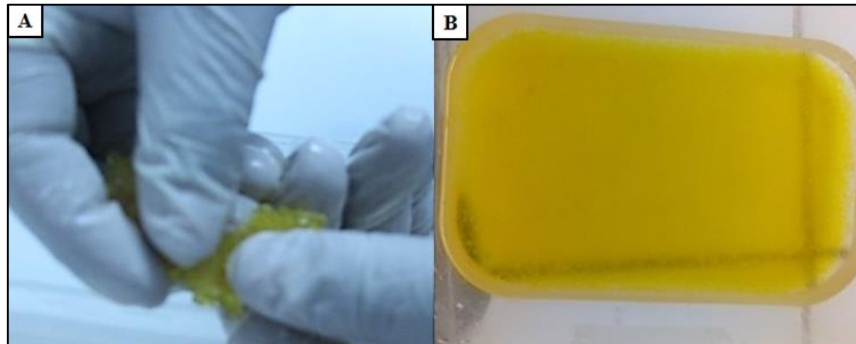


Figura 12. A) Desaglutinacion (separación manual de ovas fecundadas), B) Ovas desaglutinadas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 de marzo del 2018.

g) Lavado II y conteo de ovas:

Con este segundo lavado se eliminó todo tipo de impurezas que pudieran dificultar la incubación, luego se realizó el conteo de huevos mediante el método volumétrico de Burrows que consiste en agregar 200 ml de agua al vaso para luego agregar las ovas, en este proceso se requirió de mucho cuidado y paciencia ya que las ovas no pueden ser dañados ni estar mucho tiempo fuera del agua.

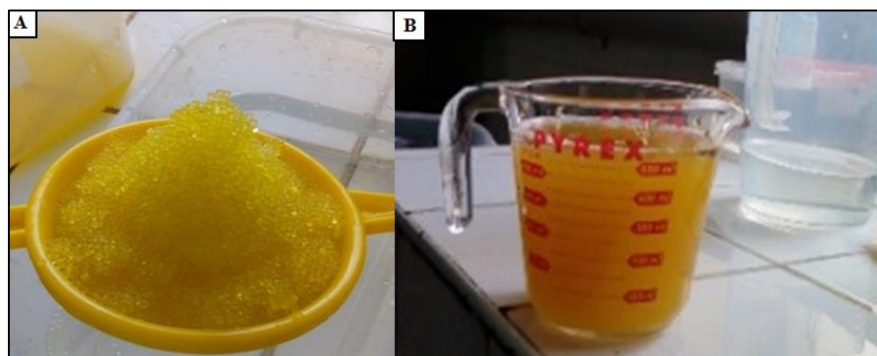


Figura 13. Conteo de ovas: A) Preparación de ovas para conteo, B) Adición de ovas al vaso pyrex que contiene agua de 200 ml. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 de marzo del 2018.

h) Incubación:

En esta etapa, las ovas previamente lavadas y contabilizadas se colocaron en los vasos de incubación tipo Mac Donald de flujo vertical, donde las ovas pasaron todo un proceso biológico de desarrollo que comprendió la fecundación (mórula, blástula) el desarrollo embrionario, y terminó con la eclosión (nacimiento). Durante la incubación se monitoreó el sistema en todo su proceso.



Figura 14. A) Incubación de ovas en vasos tipo Mac Donald con flujo de agua constante, B) Ovas incubadas a los 7 días de incubación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 de marzo del 2018.

i) Limpieza y desinfección de ovas en incubación:

Durante el proceso de incubación se distinguió ovas (no fecundadas y ovas débiles), la eliminación de estas ovas muertas se denomina picaje en el proceso de incubación, a las ovas que no fecundaron bien y a las ovas que van muriendo en el proceso de incubación fueron fáciles de identificarlos pues tomaron una coloración blanquecina en su interior, debido a la reacción de la globulina con el agua, provocando una precipitación blanquecina; estas ovas fueron retiradas inmediatamente mediante el método del sifoneo (succión con una bombilla de goma con un tubo de vidrio en su extremo), para de esta manera evitar que se constituyan en un medio ideal para el establecimiento y proliferación de hongos.

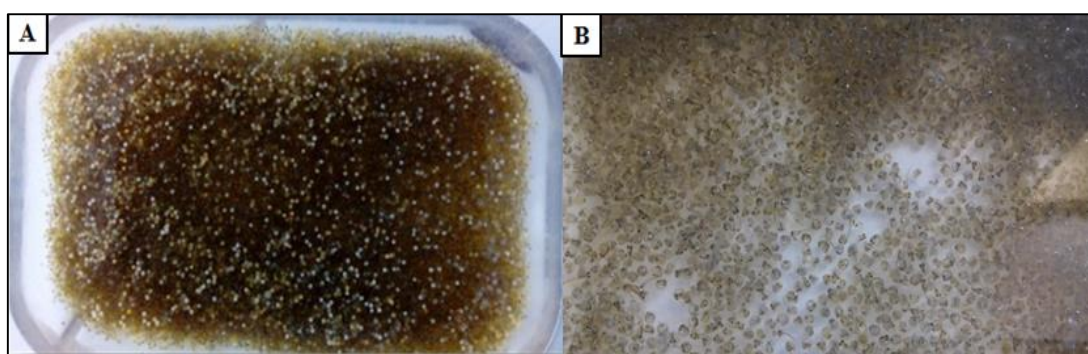


Figura 15. Picaje: A) Distinción de ovas muertas, B) Ovas seleccionadas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 08 de marzo del 2018.

Las ovas fecundadas se diferencian desde el sexto día, en la figura (15 A) se observa que las ovas en desarrollo están en un color oscuro y las ovas débiles y no fecundadas se tornan blancas o amarillo pálido.

j) Eclosión:

Empiezo cuando se completó el desarrollo embrionario entre los 20 a 25 días de incubación, cuando el embrión se volvió activo rompiendo el tejido de la ova (corion o cascarón), no todos los embriones han eclosionado en un día este proceso vario entre 2 - 4 días, siendo la temperatura de 16 °C, el factor determinante de este proceso, las larvas en el momento de la eclosión miden un aproximado de 6 cm promedio, y quedaron con el saco vitelino ya que este les sirvió como fuente de alimentación (alimentación endógena), hasta que completen su desarrollo biológico durante 4 a 6 días, a la vez les impidió la flotación por lo que permanecieron en el fondo de la incubadora, y con el movimiento (nado) que las larvas realizaron fueron expulsados con la ayuda del corriente de agua recorriendo hasta llegar a una artesa de recepción previa preparación.

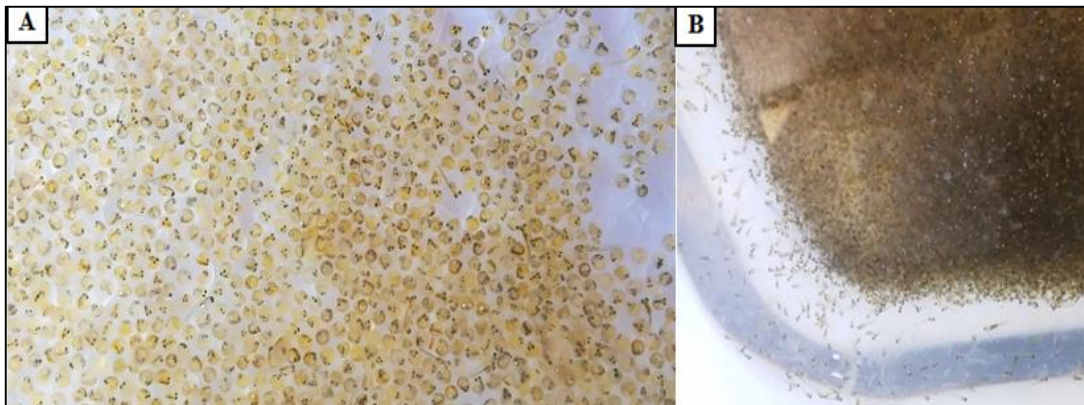


Figura 16. A) Inicio de eclosión de ovas incubadas, B) Primer día de eclosión de ovas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 25 y 26 de marzo del 2018.

k) Larvaje y alevinaje:

Luego de la recepción en la artesa se trasladaron a los acuarios del experimento donde terminaron la reabsorción del saco vitelino, que también varió en función a la temperatura de 14 a 15 °C, durante 4 a 6 días desde el momento de la eclosión.

Una vez reabsorbido el saco vitelino, las larvas pasaron a ser alevinos que son peces pequeños, cuyas características morfológicas y la coloración aún no se parece a la de un pez adulto, la cual estos fueron inducidos al procedimiento experimental.



Figura 17. Cantidad de larvas de *Orestias* obtenidas en el laboratorio. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 27 de marzo del 2018.

El tiempo del proceso embrionario (fecundación – eclosión) de *Orestias agassii* y larvaje (absorción del saco vitelino) es de 18 a 22 días, a una temperatura del agua de 15.2°C mínima y una máxima de 16.2°C, con un pH de 8.2 y OD de 5mg/l.

Temperatura y tiempo de incubación.

Para la incubación se utilizó agua de la bahía del lago del Titicaca que fue bombeada por un sistema de bombeo, el tiempo de incubación dependió básicamente de la temperatura, que fue de 16 °C, donde eclosionaran a los 22 días.

Tabla 5: Temperatura en el proceso de incubación de ovas de *Orestias*.

Etapa	Promedio de Tiempo (días)	Temperatura media del agua (°C)
1ra Fase	8	16.2
2da Fase	14	16
3ra Fase	6	16.3
Desde la fecundación hasta la eclosión	22	16.1
Desde la eclosión hasta la reabsorción	28	14.2

Fuente: Elaboración propia.

Determinación del porcentaje de mortalidad en la incubación

El porcentaje de la mortalidad del proceso de fecundación e incubación se determinó de acuerdo a la siguiente formula (Loayza, 2009).

$$\%M = \frac{N^{\circ} \text{ ovas muertas}}{N^{\circ} \text{ total de ovas}} * 100$$



El porcentaje de la mortalidad fue del 14 % del total de ovas y en promedio de la tasa de incubación fue de 86 %, lo que indica que el método empleado fue eficiente. Esta variación, aunque no fue significativo, se atribuye a daños físicos que pudieron haber sufrido los productos sexuales durante el proceso de fecundación y el desarrollo embrionario durante la incubación.

Alevinos obtenidos en el laboratorio para la investigación

Luego que los alevinos hayan culminado su proceso de reabsorción de saco vitelino, se separó 3,000 alevinos de *Orestias luteus* y 3,000 alevinos de *Orestias agassii* (6 días de post-eclosión), mediante la biometría haciendo uso de un ictiómetro y balanza analítica, se obtiene una longitud promedio de 6.5 mm y un peso promedio de 0.0074 g presentando una coloración grisácea transparente y una forma triangular debido a que los ojos y cabeza son de mayor tamaño que su cuerpo.

Luego de esto se procedió a la aclimatación de los alevinos desconectando los termostatos por 2 horas, hasta obtener una temperatura de 14°C, para luego trasladarlos a los acuarios de tratamiento previo conteo (250 alevinos por cada unidad experimental), para ambas especies, cada unidad experimental estuvo atemperada mediante un termostato a 14°C promedio, con una aireación constante mediante burbujeo de aire.

Metodología de activación de las bacterias probióticas

Previo al experimento se realizó la activación del probiótico para su cultivo en placas y determinar la cantidad de UFC, según la metodología de Saldaña (2011) para la cual se tomó 333.33 ml de bacterias y se mezcló en 333.33 ml con melaza diluida esterilizada, proveniente de una combinación de 200 ml de melaza pura en 500 ml con agua corriente, luego a los 666.66 ml de la mezcla se agregó 333.33 ml de “papaya” *Carica papaya* verde batida (licuada, espesa y fresca), haciendo un total de un litro de probiótico, se selló en un frasco de vidrio de color oscuro por tres días, observándose que no quedara espacio entre el líquido y la tapa del frasco, el proceso de activación culminó entre 70 a 74 horas, teniendo en cuenta que la temperatura para la activación fue de 26.5 °C; y cuando se consigue el pH constante, es cuando el probiótico estará activado.

a) Confirmación de la activación de las bacterias probióticas:

El probiótico se activó a las 74 horas aproximadamente, con una temperatura de 26.5 °C, con un pH constante de 4.3, para determinar un pH adecuado para esto, según Cervantes (2014), antes de su utilización se debe realizar la medición, por lo que se encuentra entre el rango óptimo. Para esto según Valencia (2016) el pH debe estar entre 3.4 a 4.5 para bacterias probióticas activadas.



Figura 18. Bacterias Probióticas activado. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018.

b) Siembra del probiótico activado:

Para la determinación de la concentración de unidades formadoras de colonia (UFC), se realizó diluciones del probiótico activo en diluciones 10 para cada muestra según, Florez y Ordoñez (2014).

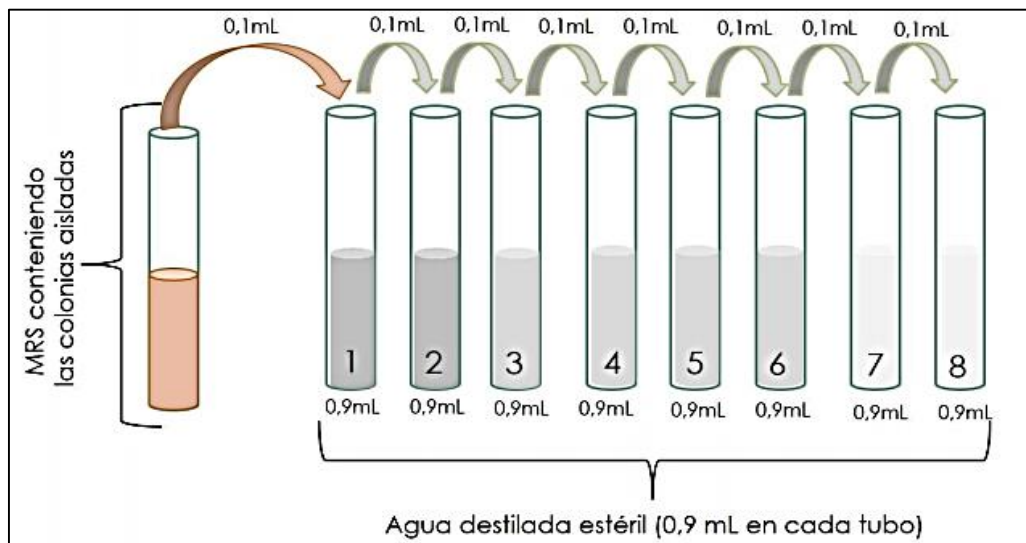


Figura 19. Dilución seriada de bacterias probióticas para la obtención UFC. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018.

Fuente: Obtenida de Quispe (2017).

Para la obtención de la cantidad UFC, de cada colonia aislada, fueron incubadas en tubos de ensayo conteniendo caldo MRS a una temperatura de 28 a 30° C por un tiempo de 48 horas, transcurrido el tiempo de incubación, se realizó las diluciones seriadas, para lo cual se tomó 0.1 ml de caldo de MRS conteniendo las colonias aisladas y se diluyó en 0.9 ml de agua destilada estéril, luego en un segundo tubo, se homogeniza y se toma 0.1 ml de muestra y se diluye en un tercer tubo con 0.9 ml de agua destilada estéril, de esta forma se realizó las 10 repeticiones secuenciales.

Se empleó un medio de cultivo (MC) que estuvo constituido por agar rugoso y ácido acético para regular el pH, se procedió a realizar la siembra en las placas que contenían 20 ml de MC, mediante la técnica de siembra del estriado, empleándose un volumen de 50 μ l como inóculo de siembra en 10 placas, tres replicas por cada dilución, y por último se dejó incubar en una estufa durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

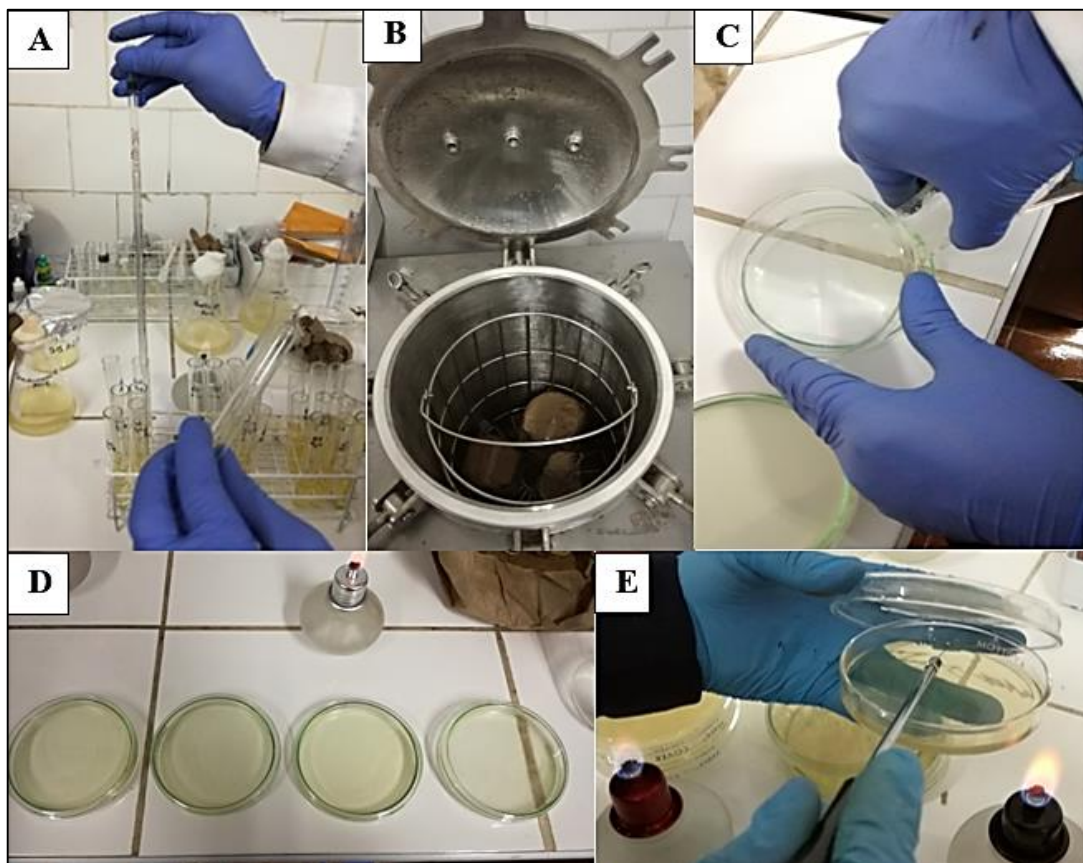


Figura 20. Metodología de cultivo de bacterias: A) Acción de la dilución seriada, B) Procedimiento de esterilizado en autoclave, C) Distribución de agar para el cultivo de bacterias en las placas Petri, D) Placas con medio de cultivo, E) Sembrado de bacterias para la identificación). Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018.

Trascurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar el conteo de colonias macroscópicamente, seleccionando aquella donde se encontró entre 25 a 250 colonias por placa, por la cual se eligió las diluciones de 10^5 y 10^6 , por contener entre 48 a 16 UFC promedio de las tres replicas.

Posterior a ello se realizó la caracterización de las UFC, obteniendo así que uno de los probióticos las colonias presentaron una morfología que es característica del género *Bacillus*, con formas irregulares, circulares, rizoides; muestran bordes enteros, lobulados, ondulados y elevación plana y convexa. La coloración fue blanca en todas las colonias observadas (Rozo, 2016).

c) Procedimiento para obtener cepas puras de bacterias probióticas

- Se cultivan las bacterias en placas con el TSA y Agar MRS. a 37°C por 48 horas.
- Donde se diferenciarán los distintos tipos de bacterias.
- Se realizaron repiques de cada bacteria identificado mediante sus características.



Figura 21. Obtención de bacterias probióticas: A) Obtención general de bacterias probióticas, B) Selección de bacterias de acuerdo a su morfología, C) Cultivo mediante el método del estriado. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 21 de marzo del 2018.

Luego de 48 horas se procedió a realizar los extendidos hasta obtener colonias diferentes en los respectivos medios de cultivo por segunda vez.



Figura 22. Obtención de géneros de bacterias probióticas aún no identificadas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018.

d) Tinción Gram para la determinación de bacterias probióticas.

Para su visualización en el microscopio a las bacterias probióticas, se observó a un aumento de 100x, siguiendo la metodología que corresponde para una bacteria Gram positiva.

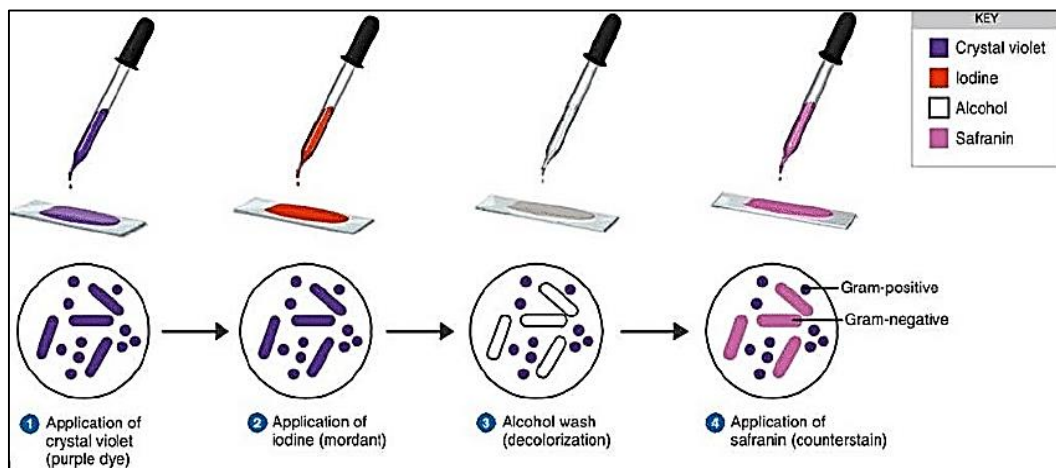


Figura 23. Metodología de tinción Gram para la observación morfológica de bacterias obtenidas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018.

Las bacterias identificadas pertenecen a los géneros: A1-1: *Lactococcus* sp., B3-4: *Bacillus* sp., C3-4: *Lactobacillus* sp. (Figura 25).



Figura 24. Identificación de las bacterias probióticas: A) *Lactococcus* sp., B) *Bacillus* sp., C) *Lactobacillus* sp. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018.

e) Recuento celular del probiótico (UFC ml-1)

Luego de la obtención de las colonias puras se procede a cultivar, mediante el repique 4 placas de cada uno de las bacterias obtenidas (12 placas), para la adición de estas al alimento vivo de los alevinos mediante la bioencapsulación.

Para llegar a la concentración 1.60×10^6 UFC. Las cepas fueron cultivadas en medio Tripticasa Soya Agar (TSA) de 24 a 48 horas a 27°C y en agar De Man, Rogosa, y Sharpe (MRS) se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C (Ardilla, 2010).

Transcurrido las 48 horas se procedió a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonia, como resultado se debe hacer el conteo según, Cervantes (2007) en efecto, de esto se determina la concentración del probiótico empleado en unidades formadoras de colonia. En tal sentido se determina que se tendrá un 1.60×10^6 UFC para el empleo en las unidades experimentales.

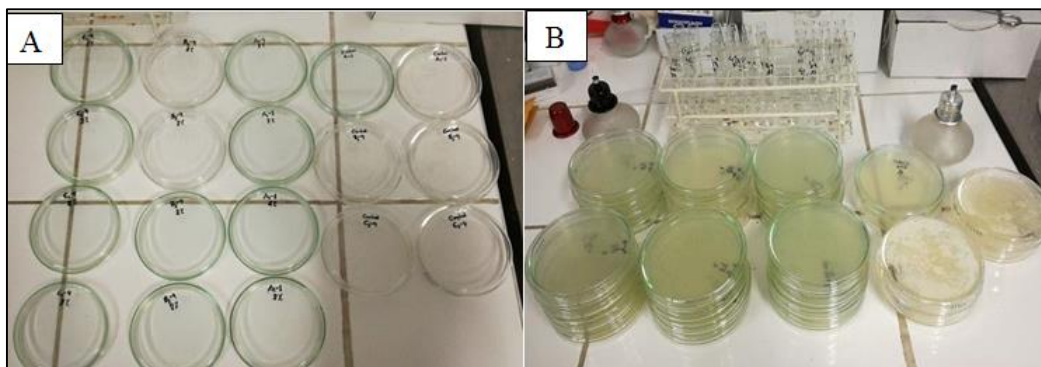


Figura 25. A) Placas distribuidas con agar para la siembra de bacterias probióticas obtenidas, B) Cantidad de bacterias obtenidas luego de la incubación para el conteo respectivo de UFC. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 28 de marzo del 2018.

Metodología de descapsulación de cistos de *Artemia*.

Se realizó el cultivo en 6 vasos, para lo cual los quistes de *Artemia* se pesó las raciones para cada tratamiento 10, 8, 6 y 4 g, para la descapsulación el agua tiene que mantener el porcentaje de salinidad como mínimo de 25 ppm y una temperatura adecuada, la metodología adaptada según. (Loayza, 2017; Valenzuela, 2018):

- Se hidrató los cistos de *Artemia* con agua de 500 ml por una hora con una fuerte aireación constante.
- Se detuvo la aireación para agregar la solución descapsulante (por cada g de quistes se agregó 35 ml de hipoclorito de sodio al 4 %) luego se homogenizo observando que desaparecían los puntos blancos que presentaron los quistes al contacto con la solución, hasta que se tornen de color naranja intenso durante un tiempo de 5 a 10 min aproximadamente (Loayza, 2017).
- Se colocó los cistos de *Artemia* en el tamiz de 120 μ y se enjuagó con agua potable, previamente dechlorada, hasta eliminar el olor del cloro, se dispuso colocar los cistos con agua en los vasos, con aireación constante por alrededor de 10 minutos, con la finalidad de neutralizar el cloro.
- En otros dos vasos se preparó 20 g de sal sin yodo/1l de agua homogenizado, la capacidad de vaso fue de 1.5 l de agua cada uno, se sembró los cistos de *Artemia* en los vasos para su eclosión, considerando una temperatura de 25 ° a 26 °C con una aireación constante y moderada.
- Luego de las 16 a 24 horas se procedió a la recolección de sólo nauplios de *Artemia* mediante el sifoneo con una manguerilla siliconada delgada con un pali globo a un extremo y/o pipeta, se pasa los nauplios aun tamiz de 120 μ y se enjuagó con abundante agua hasta eliminar restos de residuos del enriquecedor.
- Luego se procedió a la alimentación de los alevines de *Orestias*, con los nauplios obtenidos de manera proporcional a su dieta a cada unidad experimental.



Figura 26. Obtención de *Artemia*: A) Activación de nauplios, B) Desarrollo de cistos de *Artemia*, C) Nauplio de *Artemia* en estadio II, con presencia de abertura anal. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 30 de marzo del 2018.



Proceso de bioencapsulación

Una vez decapsulados los quistes, su eclosión se aseguró colocándolos en una solución con salinidad de 30 g/l manteniéndolos a una densidad de 2 g/l de nauplios, incubados a 26 °C con una iluminación constante y oxígeno bajo agitación mecánica, previniendo de este modo alguna contaminación bacteriana, no obstante, estas medidas y para asegurar una desinfección completa a la solución salina usada para la eclosión se le adicionaron 30 mg/l de cloranfenicol, así los nauplios fueron completamente esterilizados sin daño aparente, pasado las 24 horas de haber eclosionado ya los nauplios están listos para el proceso de bioencapsulación.

Para tener un control del grado de esterilidad de los nauplios, muestras de los mismos antes de ser inoculados fueron tomados bajo condiciones estériles lavados cuidadosamente, macerados en un homogenizador de tejidos y plaqueados en diferentes diluciones en medio YPG agar LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cloruro de sodio 10 g/l y agar 15 g/l) y TCBS agar. (Espinosa *et al.*, 2000).

Para el proceso de bioencapsulación la mezcla de bacterias probióticas (1.60×10^6 UFC ml⁻¹), fue adicionada a frascos de vidrio (vasos precipitados) conteniendo 255 ml de agua salobre (5%) autoclavada (121°C x 20 min.) y en seguida se adicionó los nauplios de *Artemia franciscana* de 24 h de edad (Instar II) a una densidad de 300 nauplios ml⁻¹. La mezcla de los frascos fue aireada en forma continua y para prevenir la contaminación bacteriana el aire fue filtrado haciendo burbujear en una solución salina al 20% (Reyes, 2008). En esta condición los nauplios utilizados para el grupo experimental fueron mantenidos durante 2 horas con bacterias probióticas para la bioencapsulación.

Para el grupo control (T1) se realizó el respectivo filtrado con una malla de 25 µ y lavarlos con agua salobre (5%) estéril. Después del cual los organismos fueron cosechados, enjuagados con agua salobre (5%) estéril, filtrada y suministrados a las postlarvas de acuerdo con el tratamiento correspondiente (Gelabert *et al.*, 2008), a las unidades experimentales. Los parámetros ambientales para el desarrollo de *Artemia franciscana* es someter al cultivo a una salinidad a 120 g/l a temperatura de 25 °C con un pH 7 y con aireación constante. En tanto para la población parental se sugiere la cantidad de 80 individuos en 500 ml de agua (Moraga *et al.*, 2015).



Dinámica de alimentación

La alimentación normal se realiza a los 6 días de eclosión, para ello se tomó en cuenta estudios antecendidos y la observación directa, la cual nos ayuda a determinar la cantidad de presa que requieren los alevinos, en este caso es de 6 a 12 de nauplios de *Artemia* de 0.5 a 1.0 mm en las primeras semanas. Según las observaciones realizadas durante el experimento esto va en aumento. Loayza (2017) nos indica que esto de la alimentación variara dependiendo del alevino por lo que estas densidades deben ser cuidadosamente estudiadas y controladas ya que si son exedidas deteriorara rápidamente la calidad del agua o, por lo contrario, si la densidad es baja no habrá suficientes presas para alimentar a todos los alevinos, en ambos casos se reflejara esto en la supervivencia y crecimiento.

El alimento se distribuyó con la ayuda de un tamiz en cantidades iguales a cada unidad experimental, según, Bardales (2015), para la fase experimental se aplicó la tasa de alimentación del 20% de la biomasa desde el inicio hasta el final del experimento, la ración diaria se calculó según el peso y números de peces por tanque en cada evaluación, la frecuencia de alimentación fue de tres veces por día en horas; 6:00 am, 12:00 am, y 18:00 pm. Teniéndose estos antecedentes, en la presente investigación se consideró los horarios entre las 07:00 am, 12:00 am y 16:00 pm, la cantidad de ración diaria se calculó según el peso y numero de peces por acuario en cada evaluación, y en relación al tamaño de los ejemplares según su crecimiento, la alimentación con adición de bacterias probióticas se distribuyó tomando en cuenta desde el día 1 (alimentación con bacterias probióticas bioencapsuladas en nauplios de *Artemia*).

Protocolo de alimentacion con probioticos

Los alevinos fueron alimentados cada 5, 10 y 15 días con adición de bacterias probióticas mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* desde el día dos de alevinaje, a una densidad de 6 -12 nauplios ml⁻¹, 3 veces por día (08:00 am, 12:00 am y 16:00 pm). Los nauplios que previamente bioencapsularon a los probióticos fueron proporcionados como alimento durante los primeros 90 días de desarrollo. (Tabla 6).

Tabla 6. Adición de bacterias probióticas, durante 90 días a alevinos de *Orestias*.

Tratamientos	Alimentación	Total de veces alimentados durante 90 días con bacterias probióticas
Tratamiento 1	Alimentación con nauplios de <i>Artemia</i> sin la adición de bacterias probióticas.	0
Tratamiento 2	Adición de bacterias probióticas cada 5 días mediante la bioencapsulación en nauplios de <i>Artemia</i> .	18
Tratamiento 3	Adición de bacterias probióticas cada 10 días mediante la bioencapsulación en nauplios de <i>Artemia</i> .	9
Tratamiento 4	Adición de bacterias probióticas cada 15 días mediante la bioencapsulación en nauplios de <i>Artemia</i> .	6

Fuente. Elaboración propia.

3.6.1.3. Variables a evaluar

a) Variable independiente:

Mesclas de bacterias probióticas de 1.60×10^6 UFC/ml.

T1: cero adiciones de bacterias probióticas.

T1: adición de bacterias probióticas cada 5 días.

T2: adición de bacterias probióticas cada 10 días.

T3: adición de bacterias probióticas cada 15 días.

b) Variable dependiente:

- **Peso final (g):** Se obtuvo el peso promedio al finalizar el experimento de los especímenes escogidos al azar de los diferentes tratamientos.
- **Ganancia de peso (GP):** Es el aumento total del peso que obtuvieron todos los peces durante el cultivo y se obtiene calculando el peso final menos el peso inicial de los alevinos (Cervantes, 2014).

$$GP = W_f - W_i$$

- **Longitud total (cm):** Es la longitud promedio al final del experimento de todas las unidades experimentales.

- **Ganancia de longitud (GL):** Es el aumento total de la longitud que obtuvieron todos los peces durante el cultivo y se obtiene calculando la longitud final menos la longitud inicial de los alevinos (Cervantes, 2014).

$$GL = L_f - L_i$$

Seguimiento biométrico de los alevinos

La biometría se efectuó al inicio (un día antes del tratamiento) y al final de la experimentación (a los 90 días de tratamiento), con el fin de reducir al máximo el estrés, debido al tamaño de los alevinos, de manera cuidadosa sin dañar al alevino en el procedimiento de manejo, haciendo uso de una pluma.



Figura 27. Metodología de la biometría de alevinos para la obtención de talla, con el uso de una pluma para facilitar el manejo de los alevinos. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 01 de julio del 2018.

Se realizó el registro biométrico longitud peso a 10 alevinos elegidos al azar de cada uno de las unidades experimentales, el incremento de peso (g) se determinó utilizando una balanza analítica con una sensibilidad de 0.001 g; y la longitud total (cm) se determinó mediante el uso de un ictiómetro graduado con sensibilidad de 0,1 cm, y los datos obtenidos se procesaron a través del software Microsoft Excel.

Se observa el incremento de tamaño de un alevino de *Orestias* que recibió una dieta con probiótico, es más voluminoso con respecto al de un alevino que no recibió una dieta sin probiótico (Figura 28).

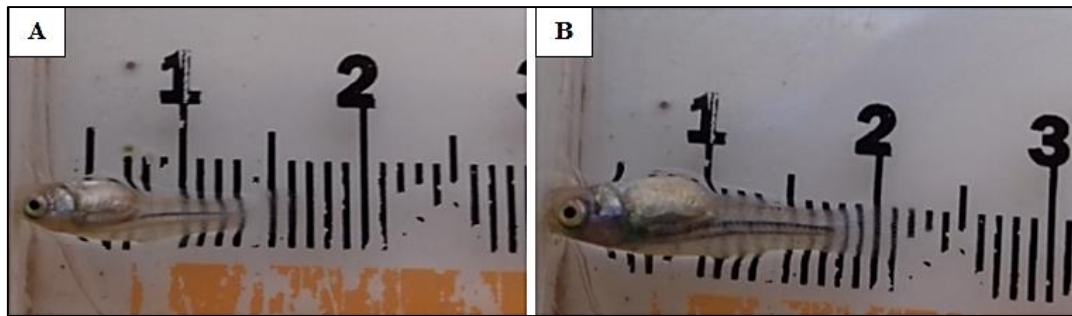


Figura 28. Biometría a los 90 días de tratamientos: A) Alevinos alimentados sin probiótico, B) Alevinos alimentados con adición de probióticos. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 01 de julio del 2018.

De la figura 28, se observa el incremento de tamaño de un alevino de *Orestias* que recibió una dieta con probiótico (alimentación exógena), es más voluminoso con respecto al de un alevino que no recibió una dieta sin probiótico. T2 (alimentación con probiótico), fue el tratamiento que obtuvo los mejores resultados en la mayoría de las variables evaluadas, se puede presumir que esto se deba a que la bacteria influyó de una u otra manera en aprovechamiento del alimento que estadísticamente no es significativo en comparación al resto de los tratamientos, y significativo con respecto al grupo control T1 (alimentación sin probiótico).

3.6.1.4. Aplicación estadística

Modelo estadístico: Diseño completamente al azar (DCA). Se evaluaron 4 tratamientos, cada uno con tres repeticiones. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico InfoStat para la comparación del crecimiento de los alevinos de *Orestias*, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (ANDEVA) usando la prueba de Tukey para analizar las diferencias entre tratamientos con alimento vivo y adición de bacterias probióticas y grupo control sin bacterias probióticas. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes con un nivel de significancia de 95%.

3.6.2. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento del porcentaje de sobrevivencia de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

3.6.2.1. Frecuencia y muestreo.

Las evaluaciones de los experimentos para la determinación del porcentaje de mortalidades, es mediante la observación diaria de las 24 unidades experimentales, que están distribuidos en 12 acuarios de alevinos de *Orestias luteus* y 12 acuarios de alevinos de *Orestias agassii*.

3.6.2.2. Descripción detallada de metodologías.

Monitoreo de la calidad de agua.

Los parámetros que se analizaron se determinaron en base a la importancia que se tiene dentro del manejo de la especie en estudio. Para la cual se realizó una evaluación de forma diaria durante los 90 días de tratamiento a cada unidad experimental, antes de cada alimentación a las 6:30 am, 11:30 am y a las 13:30 pm con la ayuda del equipo multiparámetro marca HANNA modelo HI 9146, donde se registró los parámetros de temperatura en °C, Oxígeno Disuelto en ppm y pH.

Tabla 7. Promedios de los parámetros fisicoquímicos del agua.

Tratamientos	T (°C)	OD (mg/l)	pH
T1	14.2	6.52	8.2
T2	14.0	6.52	8.2
T3	14.1	6.52	8.2
T4	14.2	6.52	8.2

Fuente. Elaboración propia.

Los promedios de los parámetros fisicoquímicos del agua, se mantuvieron en los rangos requeridos por la especie en estudio la temperatura registro un valor promedio de 14.1 °C, con un Oxígeno Disuelto (O.D.) de 6.52 mg/l, y potencial hidrógeno (pH) de 8.2, sin darse afecciones que permitió el crecimiento y desarrollo adecuado de los alevinos.

Manejo de unidades experimentales

El recambio de agua se realizó cada 7 días antes de la alimentación durante el experimento, una cantidad de 1/3 de agua retirada y 1/3 de agua agregada del lago, de manera cuidadosa, debido a que un cambio de agua total o un recambio de agua brusco lleva a un estrés fisiológico, induciendo a la pérdida de apetito.

La limpieza se realizó de forma diaria durante la investigación, el tiempo de ingesta se consideró un aproximado de 50 minutos, luego de eso se realizó la limpieza de todo el alimento no consumido y heces de los alevinos. La cual, Bardales (2015) consideró como tiempo de ingesta un aproximado de 30 minutos, luego de eso se realizó la limpieza con una manguera succionando el alimento sobrante y heces por el “método del sifoneo”, este procedimiento se realizó cada día durante el periodo de ejecución de la fase experimental.



Figura 29. Manejo de *Orestias luteus*, en las unidades experimentales. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 02 de mayo del 2018.



Figura 30. Manejo de *Orestias agassii*, en las unidades experimentales. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 02 de mayo del 2018.



3.6.2.3. Variables a evaluar.

c) Variable independiente:

Mesclas de bacterias probióticas de 1.60×10^6 UFC/ml.

T1: cero adiciones de bacterias probióticas.

T1: adición de bacterias probióticas cada 5 días.

T2: adición de bacterias probióticas cada 10 días.

T3: adición de bacterias probióticas cada 15 días.

d) Variable dependiente:

- **Porcentaje de sobrevivencia (%):** Expresa la relación entre el número de individuos que sobrevivieron al final del experimento y el número de individuos que fueron sembrados al inicio del experimento y la fórmula utilizada para obtener este parámetro fue la siguiente. (Lopez Cruz, 2011).

$$S (\%) = \frac{N_f}{N_i} * 100$$

Determinación del porcentaje de sobrevivencia de alevinos de *Orestias*

Se evaluó el número de ejemplares (alevinos) muertos y el porcentaje que presenta en todos los acuarios, con una observación diaria durante los 90 días de investigación, este índice zootécnico refleja la aceptación y aprovechamiento del alimento por parte de los alevinos, que puede ser observado en sus coloraciones y comportamientos. Para la cual, Loayza (2017) indica que, la mortalidad se controla diariamente antes de suministrar el alimento, y el material que se uso fue una pipeta con una bombilla para poder extraer los ejemplares muertos del interior del acuario.



Figura 31. Alevinos de *Orestias agassii* a los 90 días de tratamiento con la adición de bacterias probióticas mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 01 de julio del 2018.

3.6.2.4. Aplicación estadística.

Modelo estadístico: Diseño completamente al azar (DCA). Se evaluaron 4 tratamientos, cada uno con tres repeticiones. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico InfoStat para la comparación del incremento de sobrevivencia de los alevinos de *Orestias*, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (ANDEVA) usando la prueba de Tukey para analizar las diferencias entre tratamientos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes con un nivel de significancia de 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento de longitud y peso de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*

4.1.1. Incremento de longitud (cm) de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, post adición de bacterias probióticas.

Los alevinos de “carachi amarillo” *Orestias luteus* y “carachi negro” *Orestias agassii*, sometidos a los diferentes tratamientos fueron, con una longitud inicial de 0.65 cm.

En la Tabla 8, se reportan los valores de la longitud promedio (cm) de los alevinos de todos los tratamientos, durante los 90 días sometidos a la experimentación.

Tabla 8. Incremento en longitud (cm) de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, post adición de bacterias probióticas.

Repeticiones	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>
R1	1.62	1.7	2.09	2.3	1.99	2.25	1.86	2.09
R2	1.61	1.68	2.09	2.25	2.02	2.23	1.89	2.07
R3	1.62	1.67	2.05	2.28	1.92	2.25	1.88	2.08
Longitud Promedio	1.62	1.68	2.08	2.28	1.98	2.24	1.88	2.08
Incremento de longitud			0.46	0.6	0.36	0.56	0.26	0.4

Fuente. Elaboración propia.

Para alevinos de *Orestias luteus* el tratamiento que obtuvo mayor incremento de variable longitud fue el tratamiento (T2) con un valor de 2.08 cm, lo que representa un incremento de longitud de 0.46 cm, a diferencia del (T3) con un valor de 1.98 cm, lo que representa un incremento de longitud de 0.36 cm siendo el (T4) el de menor ganancia de longitud con un valor de 1.88 cm, lo que representa un incremento de longitud de 0.26 cm, con respecto al tratamiento control (T1) que obtuvo un valor de 1.62 cm de longitud.

Para alevinos de *Orestias agassii*, el tratamiento que obtuvo mayor incremento de tamaño en variable longitud fue el tratamiento (T2) con un valor de 2.08 cm, lo que representa un incremento de longitud de 0.6 cm, a diferencia del (T3) con un valor de 1.98 cm, lo que representa un incremento de longitud de 0.56 cm siendo el (T4) el de menor ganancia de longitud con un valor de 2.08 cm, lo que representa un incremento de longitud de 0.4 cm, con respecto al (T1), con un valor de 1.62 cm de longitud.

En la tabla 9. En cuanto al análisis de varianza (ANOVA) de la longitud inicial y final del experimento demostró que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para alevinos de *Orestias luteus*.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento de longitud (cm) de los alevinos de *Orestias luteus*, sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.35	3	0.12	136.54	<0.0001
Tratamientos	0.35	3	0.12	136.54	<0.0001
Error	0.01	8	8.6E-04		
Total	0.36	11			

El valor de $p = 0.0001$, sugiere el rechazo de H_0 , es decir existe diferencia del incremento de longitud de los alevinos de *Orestias luteus* entre los diferentes tratamientos sometidos a la evaluación. Con lo cual se concluye que al menos uno de los tratamientos adicionados con bacteria probiótica mediante el alimento vivo, tuvo un mayor incremento de longitud. Al ser los resultados significativos se realizó el análisis de contraste con la prueba de Tukey que determina diferencias entre los tratamientos. Así mismo se muestra que el coeficiente de variabilidad es de 1.55%.

Tabla 10. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento de la longitud (cm) de los alevinos de *Orestias luteus* en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.

Error: 0.0009 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T1	1.62	3	0.02	A
T4	1.88	3	0.02	B
T3	1.98	3	0.02	C
T2	2.08	3	0.02	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Mediante la prueba se denota significancia estadística entre los tratamientos, siendo cada uno de ellos diferentes en los resultados obtenidos.

En la tabla 11. En cuanto al análisis de varianza (ANOVA) de la longitud inicial y final del experimento demostró que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para alevinos de *Orestias agassii*.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento de longitud (cm) de los alevinos de *Orestias agassii*, sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.67	3	0.22	808.60	<0.0001
Tratamientos	0.67	3	0.22	808.60	<0.0001
Error	2.2E-03	8	2.7E-04		
Total	0.67	11			

El valor de $p = 0.0001$, sugiere el rechazo de H_0 , es decir existe diferencia del incremento de longitud de los alevinos de *Orestias agassii* entre los diferentes tratamientos sometidos a la evaluación. Con lo cual se concluye que al menos uno de los tratamientos adicionados con bacteria probiótica mediante el alimento vivo, tuvo un mayor incremento de longitud. Al ser los resultados significativos se realizó el análisis de contraste con la prueba de Tukey que determina diferencias entre los tratamientos. Así mismo se muestra que el coeficiente de variabilidad es de 0.80%.

Tabla 12. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento de la longitud (cm) de los alevinos de *Orestias agassii* en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.

Error: 0.0003 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T1	1.68	3	0.01	A
T4	2.08	3	0.01	B
T3	2.24	3	0.01	C
T2	2.28	3	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Mediante la prueba de contraste de Tukey se denota significancia estadística entre los tratamientos.

Prueba grafica de contraste (Figura 32), se analizó los resultados del efecto que producen las bacterias probióticas respecto a la variable de incremento de longitud en alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

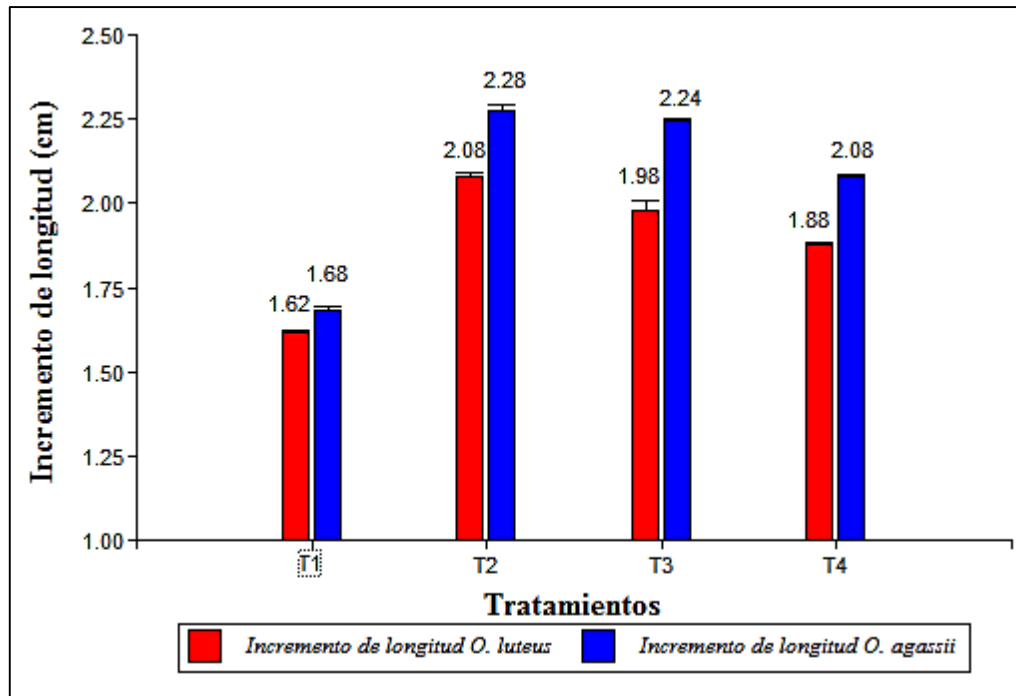


Figura 32. Análisis de contraste para determinar diferencias de incremento de longitud en alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, como consecuencia de diferentes tratamientos con adición de bacterias probióticas.

En la variable incremento de longitud al término de la investigación, se observó un efecto marcado por los tratamientos con adición de bacterias probióticas (T2, T3 y T4), respecto al tratamiento sin adición de bacterias probióticas (T1), siendo el T2 el que obtuvo un mayor incremento de longitud, respecto al tratamiento control para ambas especies de alevinos en la investigación. Esta variable de longitud la corroboran Florez y Ordoñez (2014) que según sus resultados en su investigación el (T0= 5.84 cm; T1 = 7.32 cm; T2 = 7.12; T3 = 7.99 cm) donde demuestra la eficiencia de la incorporación de probióticos en el alimento para la fase de alevinaje de tilapia roja *Oreochromis* sp.

El mayor incremento de variable longitud fue el tratamiento T2 = 2.08 cm, un incremento de 0.46 cm, T3 = 1.98 cm, un incremento de 0.36 cm, y el T4 = 1.88 cm, un incremento de 0.26 cm, con respecto al T1 = 1.62 cm de longitud. Este resultado está de acuerdo con las investigaciones realizadas por Guevara *et al.*, (2003) quienes concluyen que la adición de probióticos en las dietas mejoran el crecimiento de especies ícticas, en ese sentido, se deduce que el incremento de tamaño corresponde a la gran cantidad de vitaminas y aminoácidos que producen las bacterias benéficas (Lopez y Cruz, 2011). Es así que probiótico adicionado tanto en agua como el alimento da un mejor aprovechamiento de nutrientes esenciales, mayor digestibilidad, apetito, mejora del sistema inmune, incrementando el crecimiento (Jimbo, 2018).

Ademas, Bardales (2015) determinó que el efecto de la inclusión de 5, 10 y 15% del probiótico *Lactobacillus* sp. en la dieta en alevinos de “doncella”, *P. fasciatum*, presentaron diferencias significativas, en relación al grupo testigo obteniendo mayor crecimiento en el T1 (5% probiótico) con una longitud final de (19.63 ± 1.03 cm), y ganancia de longitud de (12.91 ± 0.32 cm). Asimismo, Ortega y Fuertes (2016) indican que las mejores tasas de crecimiento simple en las larvas de camaron se obtuvieron en el T4, al adicionar 3.9×10^8 UFC/g de la bacteria con posible potencial probiotico.

Por otro lado, Cervantes (2014), en la adición de diferentes concentraciones de probióticos distribuidos en los tratamientos, T1 (2% de probiótico), T2 (4% de probiótico) y T3 (8% de probiótico), muestran un efecto significativo en las variables, ganancia de peso y talla, con respecto al TC (0% de probiótico), esto indico que a mayor incremento de bacterias probióticas se tendrá una mayor eficiencia en el resultado, para la cual se requiere la determinación de la cantidad necesaria de la adición de probióticos y un estudio para la determinación de la cantidad adecuada para cada especie en cultivo (Saldaña, 2011).

4.1.2. Incremento de peso (g) de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, post adición de bacterias probióticas.

Se sometió alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, con un peso inicial de 0.0074 g, a cada unidad experimental, para los respectivos tratamientos.

En la Tabla 13, se reporta los valores de peso (g) promedio de los alevinos de todos los tratamientos durante los 90 días de la fase experimental. En cuanto al análisis de varianza (ANOVA) del peso inicial al final demuestra que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, siendo todos los tratamientos estadísticamente diferentes.

Tabla 13. Incremento en peso (g) de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, post adición de bacterias probióticas.

Repeticiones	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>	<i>O. luteus</i>	<i>O. agassii</i>
R1	0.048	0.051	0.076	0.082	0.0748	0.079	0.0716	0.075
R2	0.0475	0.0509	0.0749	0.0804	0.0742	0.0784	0.0714	0.0748
R3	0.0479	0.0506	0.0728	0.0814	0.0744	0.0785	0.0717	0.0747
Peso promedio	0.0478	0.0508	0.0746	0.0813	0.0745	0.0786	0.0716	0.0748
Incremento de peso			0.0268	0.0305	0.0267	0.0278	0.0238	0.024

Fuente. Elaboración propia.

En la adición de bacterias probióticas a alevinos de *Orestias luteus*, el tratamiento que obtuvo mayor incremento de variable peso fue el tratamiento (T2) con un valor de 0.0746 g, lo que representa un incremento en peso de 0.0268 g, a diferencia del tratamiento (T3) con un valor de 0.0745 g, lo que representa un incremento en peso de 0.0267 g, siendo el (T4) el de menor ganancia de peso con un valor de 0.0716 g, lo que representa un incremento en peso de 0.0238, respecto al tratamiento control (T1) que obtuvo un peso de 0.0478 g.

Para alevinos de *Orestias agassii* el tratamiento que obtuvo mayor incremento de variable peso fue el tratamiento (T2) con un valor de 0.0813 g, lo que representa un incremento en peso de 0.0305 g, a diferencia del tratamiento (T3) con un valor de 0.0786 g, lo que representa un incremento en peso de 0.0278 g, siendo el (T4) el de menor ganancia de peso con un valor de 0.0748 g, lo que representa un incremento en peso de 0.024, respecto al tratamiento control (T1) que obtuvo un peso de 0.0508 g, esto se explica que debido al enriquecimiento con bacterias probióticas mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* las bacterias probióticas afectó positivamente en el incremento de peso de los alevinos en estudio.

En la tabla 14. En cuanto al análisis de varianza (ANOVA) del peso inicial y final del experimento demostró que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para alevinos de *Orestias luteus*.

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento del peso (g) de los alevinos de *Orestias luteus*, sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.5E-03	3	5.0E-04	710.19	<0.0001
Tratamientos	1.5E-03	3	5.0E-04	710.19	<0.0001
Error	5.7E-06	8	7.1E-07		
Total	1.5E-03	11			

El valor de $p = 0.0001$, sugiere el rechazo de H_0 , es decir existe diferencia del incremento de peso de los alevinos de *Orestias luteus* entre los diferentes tratamientos sometidos a la evaluación. Con lo cual se concluye que al menos uno de tratamientos adicionados con bacteria probióticas mediante el alimento vivo, tuvo un mayor incremento de peso. Al ser los resultados significativos se realizó el análisis de contraste con la prueba de Tukey que determina diferencias entre los tratamientos. Así mismo se muestra que el coeficiente de variabilidad es de 1.25 %.

Tabla 15. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento del peso (g) de los alevinos de *Orestias luteus* en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.

Error: 0.0000 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T1	0.05	3	4.9E-04	A
T4	0.07	3	4.9E-04	B
T3	0.07	3	4.9E-04	C
T2	0.07	3	4.9E-04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Mediante la prueba de contraste de Tukey se denota significancia estadística entre los tratamientos, siendo cada uno de ellos diferentes en los resultados obtenidos.

En la tabla 16. En cuanto al análisis de varianza (ANOVA) de la longitud inicial y final del experimento demostró que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para alevinos de *Orestias agassii*.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) del incremento de peso (g) de los alevinos de *Orestias agassii*, sometidos a tratamientos con adición de bacterias probióticas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.8E-03	3	5.8E-04	2839.42	<0.0001
Tratamientos	1.8E-03	3	5.8E-04	2839.42	<0.0001
Error	1.6E-06	8	2.1E-07		
Total	1.8E-03	11			

El valor de $p = 0.0001$, sugiere el rechazo de H_0 , es decir existe diferencia del incremento de peso de los alevinos de *Orestias agassii* entre los diferentes tratamientos sometidos a la evaluación. Con lo cual se concluye que al menos uno de tratamientos adicionados con bacteria probióticas mediante el alimento vivo, tuvo un mayor incremento de peso. Al ser los resultados significativos se realizó el análisis de contraste con la prueba de Tukey que determina diferencias entre los tratamientos. Así mismo se muestra que el coeficiente de variabilidad es de 0.64 %.

Tabla 17. Análisis de contrastes múltiples de Tukey del incremento del peso (g) de los alevinos de *Orestias agassii* en las evaluaciones realizadas después de 90 días de evaluación.

Error: 0.0000 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T1	0.05	3	2.6E-04	A
T4	0.07	3	2.6E-04	B
T3	0.08	3	2.6E-04	C
T2	0.08	3	2.6E-04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Mediante la prueba se denota significancia estadística entre los tratamientos, alevinos sometidos a la adición de bacterias probióticas, mediante la bioencapsulación en alimento vivo, en los primeros 90 días de alevinaje.

Prueba grafica de contraste (Figura 33), se analizó los resultados del efecto que producen las bacterias probióticas respecto a la variable de incremento de peso en alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*.

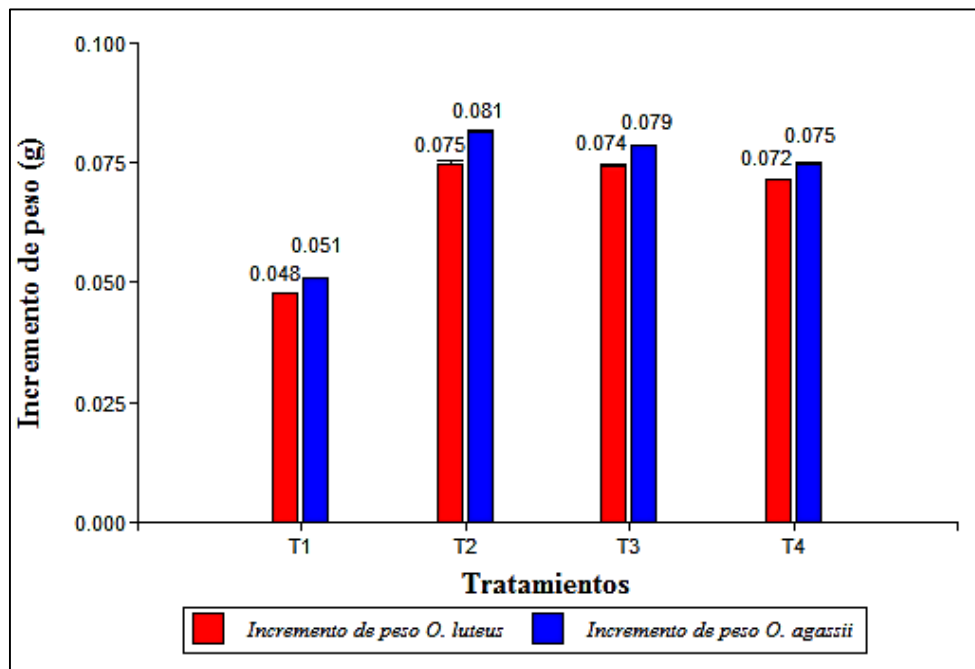


Figura 33. Análisis de contraste para determinar diferencias de incremento de pesos de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, como consecuencia de diferentes tratamientos con adición de bacterias probióticas.

Todos los tratamientos difieren entre sí, corroborando los resultados obtenidos con la prueba numérica de contraste de Tukey. Siendo la variable incremento de peso al término del ensayo, donde se observó un efecto marcado por los tratamientos con adición de bacterias probióticas (T2, T3 y T4), respecto al tratamiento sin adición de bacterias probióticas (T1) siendo el T2 el que obtuvo un mayor incremento de peso respecto al tratamiento control para ambas especies de alevinos sometidos a la investigación.

El mayor incremento peso obtenido es en el T2 = 0.0746 g, con un incremento de 0.0268 g, seguido T3 = 0.0745 g, con un incremento de 0.0267 g, y T4 = 0.0716 g, con un incremento de 0.0238, respecto al T1 = 0.0478 g. En este sentido Bardales (2015), obtuvo mayor crecimiento en el T1 (5% probiótico) con un peso final de $(42.23 \pm 5.56$ g) y ganancia de peso de $(40.88 \pm 2.03$ g). Por otro lado, Maldonado y Taricuarima



(2017) en la inclusión del probiótico en dietas para alevinos de banda negra en proporciones de 40 y 70 ml·kg⁻¹, promovieron el incremento tanto en peso como en longitud de los alevinos de banda negra *M. schomburgkii* en condiciones de laboratorio. En otra investigación, el crecimiento en peso de alevinos de *Oreochromis niloticus* observó diferencias significativas entre el efecto de 2% y 4 % con respecto al 8% de la concentración de *Lactobacillus* sp. enriquecido con proteína hidrolizada de vísceras de *Argopecten purpuratus* (Saldaña, 2011).

Este efecto es debido a que los probióticos son un promotor de crecimiento ya que una bacteria probiótica estimula la degradación de las proteínas en el tracto intestinal y mejora la digestibilidad aparente de la misma, dándose aportes benéficos al proceso digestivo del hospedero, mediante el aporte de macro y micronutrientes o aporte de enzimas digestivas complementarias a las que el organismo posee (Chabrilón *et al.*, 2007). Es así que los probióticos pueden considerarse promotores del crecimiento en organismos acuícolas, además de otros beneficios diversos, ya que mejoraron el crecimiento y sobrevivencia en el cultivo del “camarón” *Penaeus monodon* (Berrezueta, 2017).

Por otro lado, Balcázar (2002), observa que al administrar probióticos a larvas de peces en etapas de desarrollo subsecuentes, éstas incrementan su apetito, crecen más y presentan menos problemas por enfermedades, por lo que pueden utilizarse como tratamientos profilácticos. Asimismo, Lopez y Cruz (2011) en la inclusión de probióticos en la dieta de tilapias durante la fase de engorde mejora los incrementos de peso, consumo alimento, conversión alimenticia y sobrevivencia. Además, Hernandez *et al.*, (2009) indicaron que las larvas y juveniles de *Chirostoma estor* alimentados con la dieta enriquecida mostraron una talla y peso mayor que los peces alimentados con la dieta control. Respecto al peso Florez y Ordoñez (2014) afirman que el comportamiento de la tasa de crecimiento simple presenta mayores valores en T1, T2 y T3 (tratamientos con adición de probióticos), respecto al T0 (sin adición de probióticos), en la fase de alevinaje de la tilapia roja *Oreochromis* sp.

El efecto de dietas conteniendo 2, 4 y 8 % de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento y supervivencia de alevinos de *Oreochromis niloticus*, se incrementa significativamente al emplear dietas conteniendo *Lactobacillus* sp. enriquecido con proteína hidrolizada de vísceras de *Argopecten purpuratu* obteniendo el mayor crecimiento en peso y talla

con la dieta conteniendo de 8% de *Lactobacillus* sp. enriquecido (Saldaña, 2011). Además, las mejores densidades de cultivo en la crianza de alevinos de *P. brachyomus* utilizando el suplemento probiótico EM.1 lo obtuvo en tratamiento 1 (5 pacos/50 l) llegando a obtener 21.6 g y 11.9 cm en peso y longitud con respecto a los de más tratamientos (Valencia, 2016).

En los estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la aplicación de un alto número de bacterias seleccionadas como probióticos tienen la capacidad de contribuir al establecimiento de la microbiota intestinal, incrementar el peso por la mejora en la asimilación del alimento, incrementar la supervivencia, la resistencia a infecciones y la respuesta inmune de los organismos cultivados (Villamil y Martínez, 2009).

4.2. Determinación del efecto de la adición de bacterias probióticas en el incremento del porcentaje de sobrevivencia de alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*

4.2.1. Incremento del porcentaje de sobrevivencia de *Orestias luteus*, post adición de bacterias probióticas.

Se sometió a tratamiento a 3,000 alevinos de “carachi amarillo” *Orestias luteus*, distribuidos en 12 unidades experimentales a 250 alevinos cada uno.

La mortalidad se registró durante los 90 días de investigación, registrando la cantidad de animales muertos, en cada una de las unidades experimentales. La obtención del porcentaje de sobrevivencia, es en base a la diferencia entre animales vivos y muertos.

Tabla 18. Incremento del porcentaje de sobrevivencia en *Orestias luteus*, post adición de bacterias probióticas.

Tratamiento	N° inicial de alevinos	N° final de alevinos	% de ejemplares muertos	% de Sobrevivencia
T1 (0 días)	250	168	32.8	67.2
T2 (5 días)	250	229	8.4	91.6
T3 (10 días)	250	218	12.8	87.2
T4 (15 días)	250	195	22	78

Fuente. Elaboración propia.

Se obtiene un incremento mayor del porcentaje de sobrevivencia en T2 que obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 91.6 %, lográndose un incremento en porcentaje de sobrevivencia de 24.4 %, a diferencia del T3 con un valor de 87.2 %, teniendo así un incremento en porcentaje de sobrevivencia de 20 %, siendo el T4 el de menor porcentaje de sobrevivencia con 78 %, obteniéndose un incremento en porcentaje de sobrevivencia de 10.8 %, con respecto al T1 (tratamiento control), con un porcentaje de sobrevivencia de 67.2 %.

4.2.2. Incremento del porcentaje de sobrevivencia de *Orestias agassii*, post adición de bacterias probióticas.

Se sometió a los diferentes tratamientos, a 3,000 alevinos de “carachi amarillo” *Orestias agassii*, distribuidos en 12 unidades experimentales a 250 alevinos cada uno.

Tabla 19. Incremento del porcentaje de sobrevivencia en *Orestias agassii*, post adición de bacterias probióticas.

Tratamiento	N° inicial de alevinos	N° final de alevinos	% de ejemplares muertos	% de Sobrevivencia
T1 (0 días)	250	192	23.2	76.8
T2 (5 días)	250	236	5.6	94.4
T3 (10 días)	250	228	8.8	91.2
T4 (15 días)	250	219	12.4	87.6

Fuente. Elaboración propia.

Se obtuvo un incremento mayor del porcentaje de sobrevivencia en T2 con un valor de 94.4 %, con un incremento en porcentaje de sobrevivencia de 17.6 %, a diferencia del T3 que obtuvo un 91.2 %, contándose con un incremento en porcentaje de sobrevivencia de 14.4 %, siendo el T4 el de menor porcentaje de sobrevivencia con 87.6 %, obteniéndose un incremento en porcentaje de sobrevivencia de 10.8 %, respecto al T1 (tratamiento control) con un porcentaje de sobrevivencia de 76.8 %.

Prueba grafica de contraste (Figura 34), se analizó los resultados del efecto que producen las bacterias probióticas respecto a la variable de incremento del porcentaje (%) de sobrevivencia en alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*. Distribuido en: T1: Alimentación con nauplios de *Artemia* sin adición de bacterias probióticas denominado tratamiento control, presento diferencia respecto a los tratamientos; T2: Adición de bacterias probióticas cada 5 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia*, seguido del T3: Adición de bacterias probióticas cada 10 días mediante la

bioencapsulación en nauplios de *Artemia*, y T4: Adición de bacterias probióticas cada 15 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia* sp. al final de la investigación. (Figura 34).

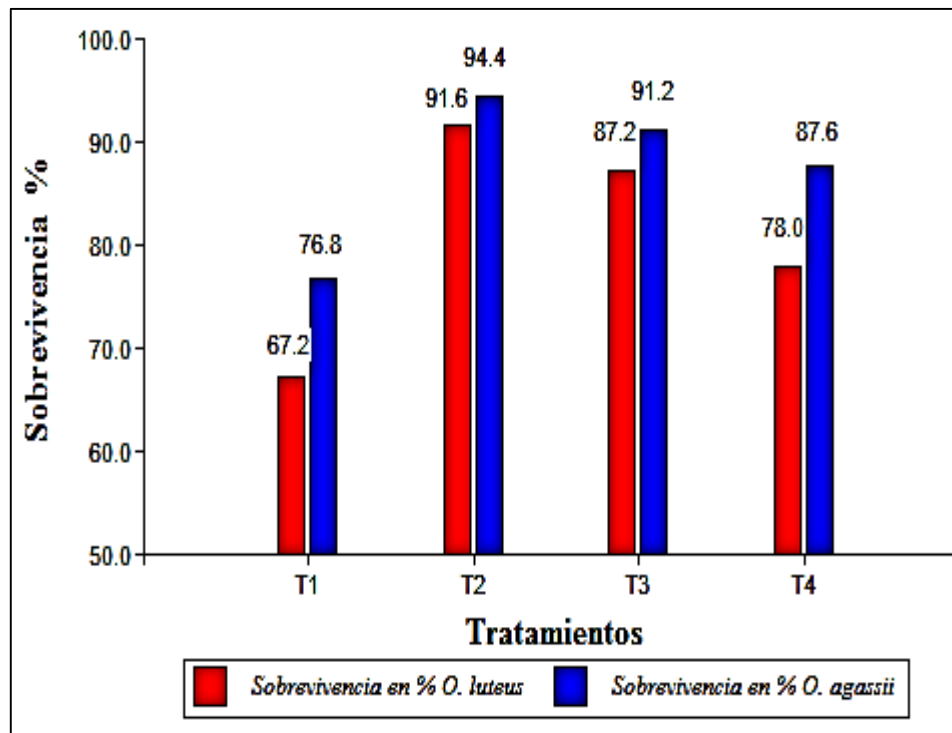


Figura 34. Análisis de contraste para determinar diferencias del incremento del % de sobrevivencia en alevinos de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, como consecuencia de diferentes tratamientos con adición de bacterias probióticas.

Todos los tratamientos difieren entre sí. De los diferentes tratamientos experimentales presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí, teniéndose T2, T3 y T4 (alimentación con adición de probióticos), y T1 (alimentación sin probiótico), siendo el T2 donde se tuvo una mayor cantidad de sobrevivencia para ambas especies de 236 equivalente a los 94.4 % de alevinos para *Orestias agassii* y una sobrevivencia de 229 equivalentes a 91.6 % de alevinos para *Orestias luteus* vivos al final de la investigación.

Esto se debe a que las bacterias lácticas presentan una característica de, exclusión competitiva de bacterias nocivas, por competencia por nutrientes o por sitios de fijación en el intestino; aumento de la respuesta inmunológica del hospedero a través de la producción de compuestos inhibidores; capacidad de liberar sustancias químicas con efecto bactericida o bacteriostático, constituyéndose en una barrera contra patógenos oportunistas y la producción de compuestos como bacteriocinas, lisozimas, antibióticos, sideróforos, proteáceas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, entre



otros (Verschuere *et al.*, 2000). Además, Sullivan (2001) encontró que, la interacción en lugares específicos del intestino puede estimular la inmunidad general del huésped, así como ciertos anticuerpos a microorganismos patógenos, la ingestión de ciertas bacterias ácido lácticas aumentó la secreción de los niveles de IgA en los organismos actuando como inmunoestimulantes.

Por otra parte, Florez y Ordoñez (2014) obtuvieron, en el T1 una sobrevivencia de 87.40%, por lo que se asume que el uso de probióticos es recomendable en la etapa de alevinaje, puesto que es fuente de nutrientes y mejora la digestión por efecto de enzimas esenciales respecto al control al cual no se adiciono ningún estimulante de crecimiento y en el que se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 61,48 %, al incorporar *Lactobacillus cassei* en metanauplios de *Artemia*. Asimismo, Castro *et al.*, (2005) obtiene buenos resultados, durante un periodo de nueve semanas obteniendo un buen crecimiento y sobrevivencia de los peces. Por otro lado, Sánchez (2015) al adicionar bacterias seleccionadas en cultivo de semillas del “osti6n” *C. sikamea*, mejoro la condici6n inmunol6gica de las semillas, incrementando su resistencia ante una infecci6n por *Vibrio*, aumentando su supervivencia, y mejorando su estado nutricional, permitiendo as6 una mayor energ6a disponible para el crecimiento.

Es as6 que, las bacterias 6cido l6ctico bioencapsuladas proporcionan mejoras significativas en la supervivencia de larvas de “rodaballo” *Scophthalmus maximus*, y se sugiere que es factible usar cultivos de microalgas como vectores para la introducci6n de antagonistas bacterianos en la acuicultura (Verschuerer *et al.*, 2000). La cantidad 2, 4 y 8 % de *Lactobacillus* sp. sobre la supervivencia de alevines de *Oreochromis niloticus*, se incrementa significativamente al emplear dietas conteniendo *Lactobacillus* sp. obteniendo la mayor supervivencia en el grupo tratado con alimento con 8% de *Lactobacillus* sp. enriquecido (Saldaña, 2011).

Lopez y Cruz (2011) indicaron que, la aplicaci6n de probióticos contribuyeron a mejorar la sobrevivencia de las tilapias, debido a que los microorganismos ben6ficos compiten con los pat6genos por sitios de adhesi6n a la mucosa intestinal y se da el principio de exclusi6n competitiva, es as6 que se define qu6. La dieta con alimento enriquecido redund6 en la sobrevivencia m6s alta de los peces (Hernandez *et al.*, 2009).



Asimismos, Díaz (2016) resalta, la importancia de suministrar alimento vivo durante la etapa post-reabsorción de saco vitelino del escalar debido a que aporta nutrientes y enzimas exógenas, que permite los procesos de desdoblamiento de moléculas nutricionales y asimilación de estas para mejorar el mantenimiento, crecimiento y sobrevivencia de esta especie en condiciones de cautiverio, ya que las tasas de sobrevivencia más altas se observaron en el T3 (90%) y T4 (86%) correspondiente a nauplios de *Artemia* enriquecida con omega-3, y la menor supervivencia en el T5 (56%) y T6 (60%), demostrando la eficiencia de suministrar alimento vivo como primera alimentación en *P. scalare*.

Por otro lado, Saldaña (2011) refiere que la supervivencia de alevines de *Oreochromis niloticus* se ve incrementada significativamente al emplear dietas conteniendo *Lactobacillus* sp. enriquecido con proteína hidrolizada de vísceras de *Argopecten purpuratus*. Observándose diferencias significativas entre el efecto de la concentración de *Lactobacillus* sp. enriquecido de 2% con respecto al 8 %. Del mismo modo, Ortega y Fuertes (2016) sostienen que la mejor supervivencia se presentó en el tratamiento T4, con un 94.67 % siendo este superior al presentado por el T1 con un 93.556 % (Probiótico comercial) y al tratamiento testigo con 37.11 %, evidenciándose la utilidad del uso de microorganismos autoctonos.

Para determinar la eficiencia de las bacterias probióticas diversos autores demostraron la existencia de estos microorganismos en el intestino de peces tal es el caso de: Gutiérrez (2016) que determino que en el intestino de “tilapia” *Oreochromis* sp. se encuentran bacterias probióticas que fueron aisladas e identificadas como *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbrueckii*. Estas bacterias mostraron los mejores perfiles de desempeño probiótico al compararse con los demás aislados evaluados, al aumentaron el % de sobrevivencia y presentaron mejores ganancias de peso y talla que los no alimentados con probióticos, lo cual sugiere que estos microorganismos tienen un efecto positivo en la producción acuícola.

Asi mismo, Gatesoupe (2000) indica que los *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, organismos Gram negativos anaerobios facultativos predominan en el tracto digestivo de peces y crustáceos, y estos son comúnmente los probióticos más eficientes para acuicultura siendo diferentes de aquellos designados para especies terrestres. Por otro lado, Díaz y Martínez (2009) en estudios realizados *in vivo* e *in*



vitro han demostrado que la aplicación de un alto número de bacterias seleccionadas como probióticos tienen la capacidad de contribuir al establecimiento de la microbiota intestinal, incrementar el peso por la mejora en la asimilación del alimento, incrementar la supervivencia, la resistencia a infecciones y la respuesta inmune de los organismos cultivados, así como mejorar la calidad de agua en experimentos realizados a pequeña escala, es por ello que. La inclusión de probiótico comercial (Amino Plus) en la dieta para Pacotanas en estadio juvenil mejora su crecimiento, lo cual se evidenció en los indicadores de crecimiento (GPI, VCP, TCP).

Los resultados obtenidos de Abasolo (2015), sugieren que la eficiencia y modo de acción de un probiótico puede variar entre cepas de una misma especie, generando en un mismo hospedero respuestas diferentes en función de su estadio de desarrollo ontogénico y proveer diferentes tipos de protección contra patógenos, incluyendo antagonismo y exclusión, mejor asimilación de nutrientes y fortalecimiento general del sistema inmune innato. En este sentido, González (2014) indica que los datos de biomasa final del tratamiento con probióticos fue superior a todos los anteriores, además Rodríguez (2017) indica que, el uso de probióticos en acuicultura puede mejorar la microbiota coligada al tracto gastrointestinal (TGI), porque promueven los metabolitos que generan incompatibilidad contra los patógenos, activan y favorecen el sistema inmunológico, preservan la mucosa del intestino, ayudan de manera indirecta a mejorar algunos parámetros de crecimiento y mejoran la calidad del agua.

En otros casos como en el estudio de Hualinga (2013) se presenta una, nula tasa de mortalidad reportada evidenciando un alto grado de adaptación de esta especie a los alimentos suplementados con probióticos en el crecimiento y composición corporal de alevinos de “paco” *Piaractus brachipomus* cultivados en corrales, y en las larvas y juveniles de *Chirostoma estor* alimentados con la dieta enriquecida mostraron una talla y peso mayor que los peces alimentados con la dieta control. Mientras que en el cultivo del pescado blanco el *Lactobacillus casei* es un probiótico adecuado, debido a su accesibilidad y su facilidad de bioencapsulación por *B. plicatilis* y *A. franciscana*, así como por los beneficios generados, expresados en ganancia en peso, tasa de crecimiento específico, factor de condición y sobrevivencia de los peces alimentados con la dieta enriquecida. (Hernandez *et al.*, 2009).



V. CONCLUSIONES

La adición de bacterias probióticas posee un efecto de incremento respecto a la longitud y peso de alevinos, de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, siendo el T2 (alimentación con adición de bacterias probióticas cada 5 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia*), quien mostró un crecimiento favorable para alevinos de *Orestias luteus* que se manifestó en una longitud promedio de 2.1 cm, y peso promedio de 0.076 g, que representó un incremento de longitud de 0.48 cm, y un incremento de peso de 0.027 g respecto al T1 (tratamiento control), y para los alevinos de *Orestias agassii*, el T2 (alimentación con adición de bacterias probióticas cada 5 días mediante la bioencapsulación en nauplios de *Artemia*), es quien obtuvo el mayor incremento de promedio de longitud de 2.3 cm, un peso de 0.082 g, representando un incremento en longitud de 0.6 cm, y un peso de 0.032 g, respecto al T1 (tratamiento control).

Los resultados obtenidos a los 90 días de la investigación con la adición e bacterias probióticas presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí, entre el T1 (alimentación sin probiótico) y T2, T3 y T4 (alimentación con adición de bacterias probióticas cada 5, 10 y 15 días), siendo el T2 donde se obtuvo un incremento mayor en la cantidad de sobrevivencia para ambas especies, en número de 236 equivalente a los 94.4 % de alevinos para *Orestias agassii*, y una sobrevivencia de 229 equivalentes a 91.6 % de alevinos para *Orestias luteus* vivos, al final de la investigación.



VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar investigación en el proceso de bioencapsulación de bacterias probióticas, ya que la temperatura y la cantidad de probióticos bioencapsulados son muy variadas respecto a factores fisicoquímicos en el agua.

Continuar con la etapa de crecimiento de *Orestias luteus* y *Orestias agassii*, en condiciones controladas y probar diferentes adiciones de las concentraciones de bacterias probióticas durante el crecimiento de alevinos.

Realizar la comparación del uso de bacterias probióticas *in situ* para determinar la viabilidad del uso efectiva de las baterías en cultivo de *Orestias*.

Realizar estudios de alevinos obtenidos *Orestias luteus* y *Orestias agassii* acerca de la composición química (alevinos alimentados con adición de bacterias probióticas y alevinos alimentados sin adición de bacterias probióticas), en comparación con alevinos del medio natural.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abasolo, F. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido "mano de león" *Nodipecten subnodosus* y de la "concha nácar" *Pteria sterna* con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Apun, J. (2007). Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de "tilapia" *Oreochromis niloticus* (Linneaus 1758), cultivada en el laboratorio. Guasave, Sinaloa.
- Ardila, D. (2010). Evaluación del efecto de aislados bacterianos sobre el peso, talla y supervivencia a infecciones experimentales en juveniles de "tilapia nilótica" *Oreochromis niloticus*. Santa Marta: Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales.
- Arratia, G. (1981). Géneros de peces de aguas continentales de Chile. Museo Nacional de Historia Natural, 34: 3-108.
- Atencio, W. (2013). Determinación de la concentración letal media (CL50-96) y efecto histopatológico del sulfato de cobre mediante bioensayos con alevinos del "carachi amarillo" *Orestias luteus*. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- Avila, M., Seguel, M., Plaza, H., Bustos, E., & Otaiza, R. (1994). Estado de situación y perspectivas de la Acuicultura en Chile. CORFO - IFOP, 17.
- Balcázar, J. (2002). Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. Machala: Universidad Tecnica de Machala: Carrera de ingeniería Acuícola.
- Bardales, I. (2015). Efecto de una dieta con tres niveles del probiótico *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento y sobrevivencia de alevinos de "doncella" *Pseudoplatystoma fasciatum*, en ambientes controlados. Yarinacocha : Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia.
- Berrezueta, E. (2017). Usos y Aplicaciones de probióticos en el cultivo de camarón y sus mecanismos de acción. Machala: Universidad Tecnica de Machala.
- Buitron, C. (2005). Utilización de diferentes tipos de kakabans para incubación in situ de ovas de "carachi" *Orestias agassii*, "punku" *Orestias luteus* y "carachi enano" *Orestias olivaceus* en el lago menor del Titicaca. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andres.



- Buschmann, A. (2006). A review of the impacts of salmonid farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES Journal of marine science*, 7; 1338-1345.
- Calero, G. (2006). Seleccionando el probiótico adecuado para el cultivo de camarón. Obtenido de <http://www.industriaacuicola.com/PDFs/5.2%20-SeleccionandoProbiotico.pdf>
- Castañón, V., Flores, T., & Limachi, J. (2002). Manual pesquero para el repoblamiento del lago Titicaca con peces nativos. La Paz, BO, 13; 85 .
- Castro, G., Castro, J., Castro, T., Estrada, A., & Garcia, V. (2005). Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. UAM-X. División de CBS. Depto. El Hombre y su Ambiente, 1 - 5.
- Cervantes, E. (2014). Efecto de la adición de diferentes concentraciones del probiótico *Lactobacillus* sp. en el alimento para el mejoramiento del crecimiento y supervivencia de alevinos de "paiche" *Arapaima gigas*, en condiciones de laboratorio en Pucallpa. Pucallpa - Peru: Universidad Nacional de Huayali.
- Chabrillón, M., Díaz, P., Balebona, M., & Moriñigo. (2007). Application of Lactic Acid Bacteria (LABs) as probiotics in fish farming. *Alternativa. Panorama Acuícola Magazine*. México, 4.
- Chafloque, V., & Choquehuanca, W. (2018). Efecto de *Lactobacillus* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*, como suplemento en dietas, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de *Piaractus brachypomus* "paco" en laboratorio. Nuevo Chimbote - Peru: Universidad Nacional del Santa .
- Cortes, M. (2003). Guia para el manejo, cria y conservacion del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linneaus, 1766). *Ciencia y Tecnologia* , 76 (1): 1001-110.
- Cruz, Z. (2013). Aplicaciones de probióticos en el sector de la acuicultura. *Revista Industrias Pesquera*, 2063-2064: 42 - 45.
- Cuadro, A. (2014). Uso de probióticos en acuicultura. Metodología de aplicación práctica y sencilla. *Revista electrónica de ingeniería en producción*. Guayaquil, 1-15.
- Da Costa, P. (1972). Nota sobre a ocorrência e biologia de *Artemia salina* (L) naregiao de Cabo Frio. Rio de Janeiro - Brasil: Secao de Publicaco es do Instituto de Pesquisas de Marinha.



- Dejoux, C., & Iltis, A. (1991). El Lago Titicaca - Síntesis del conocimiento limnológico actual. La Paz - Bolivia: HISBOL.
- Díaz, J. (2016). Evaluación de tres dietas alimenticias suministradas en la fase de alevino al pez ornamental amazónico "escalar" *Pterophyllum scalare* - Schultze, 1823. Manizales: CIMAD.
- Díaz, L., & Martínez, M. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR, 23.
- Escobar, F. (2016). Análisis temporal del rol de los peces en los procesos de auto-organización de la laguna de Terminos, México. La Paz, B.C.S: Instituto Politécnico Nacional.
- Esguerra, D. (2012). Evaluación en un sistema cerrado de cuatro aislados bacterianos con potencial probiótico en la dieta de "tilapia" *Oreochromis niloticus*. Santa Marta: Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Espinosa, A., García, C., Cabrera, E., Arenal, A., Pimentel, E., Carrillo, O., & Fajardo, J. (2002). Bioencapsulación de levadura *Pichia pastoris* en nauplios de *Artemia salina*. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA, 6; 748-753.
- FAO, E. e. (2010). Fisheries and Aquaculture Department. Un Food and Agriculture Organization, 219 .
- Florez, J., & Ordoñez, J. (2014). Evaluación del efecto de un estimulante de crecimiento tipo probiótico en la fase de alevinaje de "tilapia roja" *Oreochromis* sp., bajo condiciones de laboratorio. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias.
- Franssen, N., & Gido, K. (2006). Use of stable isotopes to test literature-based trophic classifications of small-bodied stream fishes. *American Midland Naturalist*, 1-10.
- Gatesoupe, F. (2008). Actualización de la importancia de las bacterias del ácido láctico en el cultivo de peces: natural ocurrencia y tratamientos probióticos (En inglés). *Diario de Microbiología Molecular y Biotecnología*, 14 (1-3); 107-114.
- Gelabert, R., Brito, R., Gaxiola, M., Castro, T., & Rosas, C. (2008). Efecto de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos sobre el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de postlarvas (PL5-PL40) de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). *Uciencia*, 12.



- González, Y. (2014). Efecto de la adición de ácidos orgánicos y probióticos sobre el crecimiento del "camarón" *Litopenaeus vannamei*. Machala: Universidad Técnica de Machala.
- Guevara, J., Mateus, R., & Quintero, L. (2003). Probióticos en la fase de levante del ciclo de producción de la "mojarra roja" *Oeochromis* sp. Universidad Nacional de Colombia, 1-5.
- Guevara, M. (2005). Alimento vivo y su importancia en acuicultura. Córdova: Ciencias Acuicolas.
- Guillian, M., Thompson, F., & Rodrigues, J. (2003). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 14.
- Gutierrez , L. (2016). Caracterización de cepas de *Bacillus* sp. y bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de "tilapia roja" *Oreochromis* sp. como potencial consorcio para procesos de microencapsulación. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Gutierrez, R. (2013). Análisis del contenido estomacal del "ispi" *Orestias ispi*. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.
- Gutiérrez, Y., Mochcco, O., Díaz, J., & Chaño, I. (2014). Efecto de la inclusión del probiótico comercial "amino plus" en el alimento extruido sobre el crecimiento del pez híbrido "pacotana" *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum*. *Biodivers Amazon*. Vol. 4, 11.
- Guzmán, J., & Sielfeld, W. (2009). Dieta de *Orestias agassii*, (Teleostei: Cyprinodontidae) del salar del Huasco. ISSN 0717-652X, Universidad de Concepción. *Casilla*, 5; 28-32.
- Hagiwara, A. (2001). Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200: 111-127.
- Henríquez, C. (2013). Caracterización de propiedades probióticas de microorganismos del tracto digestivo de Salmónidos. Santiago de Chile: Universidad de Chile .
- Hernandez, M., Castro, t., Garduño, M., Castro, G., & Baltierra, J. (2009). Efecto del alimento vivo enriquecido con *Lactobacillus casei* en la sobrevivencia y crecimiento de larvas y juveniles de *Chirostoma estor* (Pisces: Atherinopsidae). *Ciencia Pesquera*, 8.
- Hernandez, R., Fernandez, C., & Baptista, P. (2014). Metodología de la Investigación . Mexico: Mc Craw Hill.



- Hernández, S. (2015). Evaluación de la aplicabilidad de probiótico en las fases larvarias de bocachico y tilapia para optimizar rendimiento productivo. Estación piscícola Bajo, Magdalena: Universidad de la Costa.
- Hualinga, K. (2013). Efecto del probiótico EM® agua en el crecimiento y composición corporal de alevinos de *Piaractus brachyomus* “paco” (Cuvier, 1818) Pisces serrasalmidae, cultivados en corrales, CICMCR – IIAP – Bello Horizonte, San Martín. Iquitos - Peru: Universidad Nacional de Amazonia Peruana.
- Huet, M. (1998). Tratado de piscicultura. Ed. Mundi Prensa. 3ra edicion, 745 p.
- Hugo Treviño, J. T. (2000). El potencial ictiológico. ORSTUM Fonds Documentaire, 11; 549 - 559.
- Imaki, A. (1987). Introduccion a la crianza de Trucha Arco Iris. La Paz Bolivia .
- Jimbo, J. (2018). Uso de probióticos en el cultivo de camarón como alternativa a la prevención de enfermedades. Machala: Universidad Técnica de Machala UTMACH.
- Lara, M., Olivera, M., Guzman, B., & Lopez, W. (2002). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in "nile tilapia" *Oreochromis niloticus*. Mérida, Yucatán - Mexico: Aquaculture.
- Lauzanne, K., Millar, R., & Bardach, J. (1991). Especies Nativas, los *Orestias* en el lago Titicaca. Bolivia : Ed. HISBOL-ORSTOM, Fonds Documentaire .
- Leger, P., Bengtson, D., Simpson, K., & Sorgeloos, P. (1986). The use and nutritional value of Artemia as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Annu, 24; 521 - 623.
- Loayza, A. (2009). Comparación de la incubación de ovas de “punku” *Orestias luteus*, en condiciones de laboratorio e in situ. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.
- Loayza, W. (2017). Crecimiento y sobrevivencia en la primera etapa de alevinaje de *Trichomycterus rivulatus* "suche" alimentados con nauplio de *Artemia salina* y *Daphnia pulex*, en condiciones controladas. Puno - Peru: Universidad Nacional del Altiplano.
- Lopez, B., & Cruz, L. (2011). Elaboración de un probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la "tilapia roja" *Oreochromis* sp., en etapa de engorde en la zona de Santo Domingo. Santo Domingo: Escuela Politécnica del Ejército.



- Magdalena, M., Silva, C., & Rozowski, J. (2011). Microbiota intestinal: rol en obesidad . Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile., 1-6.
- Maldonado, R., & Taricuarima, M. (2017). Tres Niveles de inclusión del probiótico EMTM en el alimento sobre el crecimiento y composición corporal en alevinos de "banda negra" *Myleus schomburgkii*, (Serrasalminidae) cultivados en corrales. Iquitos, Peru: Universidad Nacional de Amazonia Peruana.
- Merrifield, D., Dimitrioglou, A., Foey, A., Davies, S., Baker, R., Bogwald, J., . . . And Ringo, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 1-8; 302.
- Monroy, M., Castro, T., Castro, J., Castro, G., & Lara, R. (12 de febrero de 2012). Beneficio del uso de los probioticos en la flora bacteriana intestinal de los organismos acuaticos. Beneficios del uso de probióticos , 1 - 8. Obtenido de <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/85/pdfs/probioticos.pdf>
- Moraga, P., Ávila, R., & Vilaxa, A. (2015). Salinidad y temperatura óptimas para reproducción ovípara y desarrollo de *Artemia franciscana*. *IDESIA*, 8.
- Nayak, S. (2010). Probiotics and immunity. A fish perspective Review. *Fish Shellfish Immunol*, 29: 2-14.
- Ohashi, M. (1992). Pruebas de reproducción de semillas de "mauri". Estudio ecológico de especies ícticas nativas. Parte III. Tiquina - Pongo, La Paz: Centro de Desarrollo Piscícola y Enseñanza Técnica del Altiplano.
- Orlove, b., Levieil, D., & Treviño, H. (1991). El Lago Titicaca, Síntesis del conocimiento limnológico actual. *ORSTOM-HISBOL*, 3; 505-508 .
- Ortega, L., & Fuertes, K. (2016). Evaluación de bacterias con potencial probiótico en la alimentación de larvas de "camaron blanco" *Litopenaeus vannamei* en el municipio de Tumaco. San Juan de Pasco: Universidad de Nariño.
- Ortigósa, A. (2017). Probióticos en la producción piscícola. Neiva – Huila, Colombia: UNAD - ECAPMA.
- Ossorio, R. (2018). Bioencapsulación de *Streptomyces* sp. RL,8 en nauplios de *Artemia franciscana* y estudio de su resistencia contra vibrio patógeno. Santa Clara: Universidad Central "Maria Abreu" de las Villas.
- Papoutsoglou, S., Mylonakis, G., Milou, H., Karakatsouli, N., & Chadio, S. (2000). Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled "carp" *Cyprinus carpio* L. reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering*, 22; 309-318.



- Pari, D. (2012). Factores que Influyen en el consumo de *Orestias agassii* y *Orestias luteus* "carachi" en la ciudad de Puno . Puno: Universidad Nacional del Áltiplano.
- Polo, M. (2005). Reproducción artificial e incubación artesanal in situ del "qañu" *Orestias albus*. La Paz, Bolivia : Universidad Mayor de San Andrés.
- Poma, N. (2005). Reproducción artificial e incubación artesanal in situ del mauri. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés.
- Prieto, G. (2006). Tipo de alimento, sobrevivência e desempenho inicial de pós-larvas de "paco" *Piaractus mesopotamicus*. Ciencia e Agrotecnologia, 30 (5):1002-1007.
- Quiroz, E. (2013). Control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia fransiscana* mediante un consorcio de bacterias probióticas y fagos. La Paz - Bolivia: Instituto Politecnico Nacional.
- Quispe, W. (2017). Aislamiento de *Lactobacillus* sp. de "trucha arco iris" *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en PUNO. Puno - Peru: Universidad Nacional del Altiplano.
- Ramirez, M. (2006). Tecnología de microorganismos efectivos (EM) aplicada a la agricultura y medio ambiente sostenible. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander - Escuela de Ingeniería Química.
- Reyes, W. (2008). Efecto de dos probióticos bioencapsulados en nauplios de *Artemia franciscana* en el mejoramiento del desarrollo larval del "camarón de río" *Cryphiops caementarius*, en laboratorio. Trujillo - Peru: Universidad Nacional de Trujillo.
- Rodriguez, A. (2017). Probióticos en la producción piscícola. Neiva – Huila, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD.
- Rozo, C. (2016). Determinar el tiempo de suministro de probióticos que permita mantener durante más tiempo una alta viabilidad de permanencia de microorganismos benéficos. Bogotá - Colombia: Universidad de la Salle.
- Ruiz, V. (2004). Ictiofauna de aguas continentales chilenas. Chile: Universidad de Concepción.
- Saldaña, G. (2011). Efecto de dietas con diferentes concentraciones de *Lactobacillus* sp. enriquecido con proteína hidrolizada de vísceras de *Argopecten purpuratus*, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de *Oreochromis niloticus* en



- laboratorio. Trujillo - Perú: Universidad Nacional de Trujillo, Escuela de Postgrado.
- Salgado, I. (2001). *La Artemia y su cultivo en el Peru*. Piura - Peru: Universidad Nacional de Piura, Dpto. Académico de Ciencias Biológicas.
- Samaniego, L., & Sosa, M. (2002). *Lactobacillus* sp. Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Matanzas, Cuba.: <https://es.scribd.com/document/263893572/Actividad-Probiotica-Antimicrobiana>.
- Sánchez, A. (2015). Evaluación potencial de bacterias aisladas del tracto digestivo de la almeja *Anadara ruberculosa* en el cultivo de invertebrados marinos de importancia comercial. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Norte, S.C. CIB.
- Sarmiento, J., Azabache, L., Mariño, L., & Hinojosa, A. (1987). Sinopsis biológica de las principales especies icticas del lago Titicaca. Lima - Perú.
- Satalaya, H. (2013). Efecto del probiótico em (microorganismos eficientes) sobre el crecimiento de alevinos de "paco" *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) confinados en jaulas durante la segunda fase de alevinaje en Padre Abad- Perú. Iquitos - Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Acosta, B., & Real, F. (2005). Uso de probióticos en acuicultura. *Revista Canaria de las Cencias Veterinarias*, 4.
- Sullivan, D. (2001). Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49.
- Tacón, A. (2002). Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications. *FAO Fisheries Circular*, 8; 10-18.
- Tapia, S. (2015). Uso del probiótico *Shewanella putrefaciens* en el cultivo de *Solea senegalensis*: implicaciones sobre la microbiota intestinal. Málaga: Universidad de Málaga RIUMA.
- Tchernavin, V. (1994). A revisión of the subfamily Orestiinae. *Proc. Zool. Soc Lóndon*, 114:140-233.
- Treviño, H., Torrez, J., & Ronca, M. (2000). El potencial ictiológico. *URSTUM Fonds Documentaire*, 11.
- Valencia, J. (2016). Comparación de densidades de cultivo de "paco" *Piaractus brachypomus* utilizando el suplemento probiótico E-M, IIAP sede Ucayali- Perú. Trujillo - Peru: Universidad Nacional de Trujillo.



- Valenzuela, D. (2018). Alimentación de alevinos de *Orestias agassii* y *Orestias luteus* a base de nauplios de *Artemia salina*. Puno - Peru: Universidad Nacional del Altiplano.
- Verschuere, L., Rombaut, P., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology*, 64; 655-671.
- Vilca, J., Castillo, Y., Jara, L., & Coila, Y. (2002). Desarrollar la capacidad de programas de pesca artesanal en el ámbito peruano del sistema TDPS. Puno - Peru: Proyecto PER/98/G-32.
- Villamil, L., & Martínez, M. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 23; 165-187.
- Villamil, L. (2009). Evaluación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* como agentes probióticos sobre la resistencia a infecciones e incremento en peso de "tilapia nilotica" *Oreochromis niloticus*. Santa Marta: Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras.
- Villegas, C., & Kanazawa, A. (1980). Rearing of the larval stages of prawn. *Penaeus japonicus*. Bate, using artificial diet. *Mem. Kagoshima. University Research Center for the South Pacific*, 6; 43-49.
- Wittwer, G. (2012). Caracterización bacteriana del intestino del "salmon del atlántico" adulto. Chile.
- Zuñiga, G. (1998). Cordados. Puno: Mundialito .



ANEXOS

Anexo A. Panel fotográfico

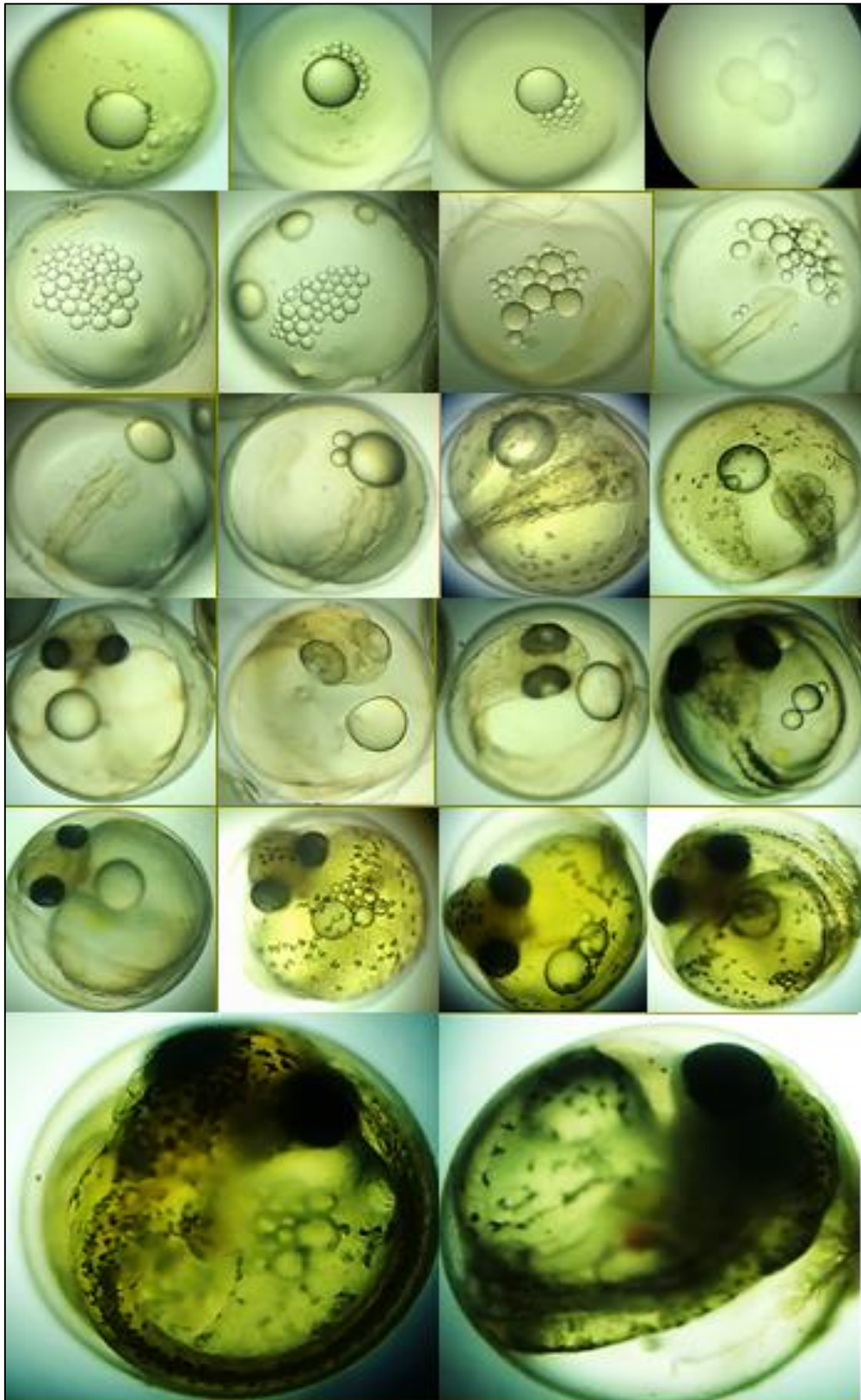


Figura 35. Observación del desarrollo de ovas de *Orestias*. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 06 al 28 de marzo del 2018.

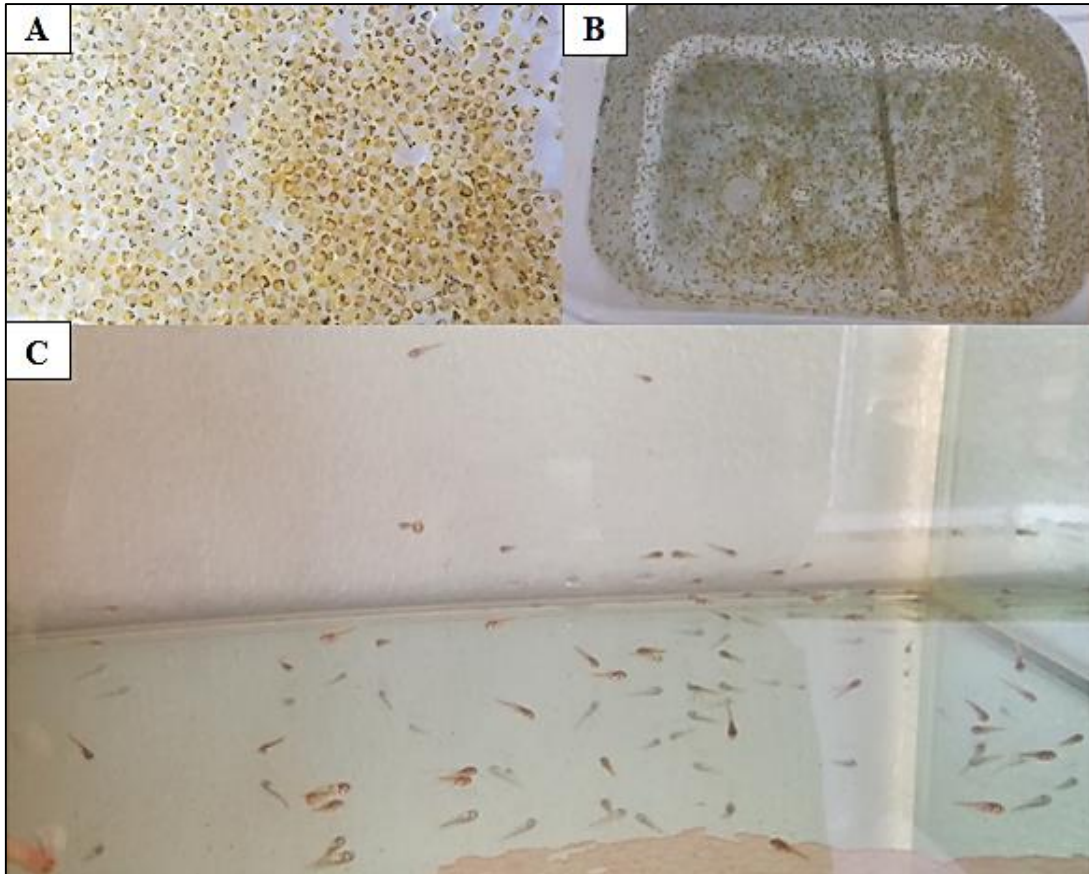


Figura 36. A) Ovas en eclosión, B) Cantidad de alevinos obtenidos, C) Alevinos de un mes.
Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 27 de marzo del 2018.



Figura 37. A) Autoclave, B) Esterilizado de aza de siembra. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018.

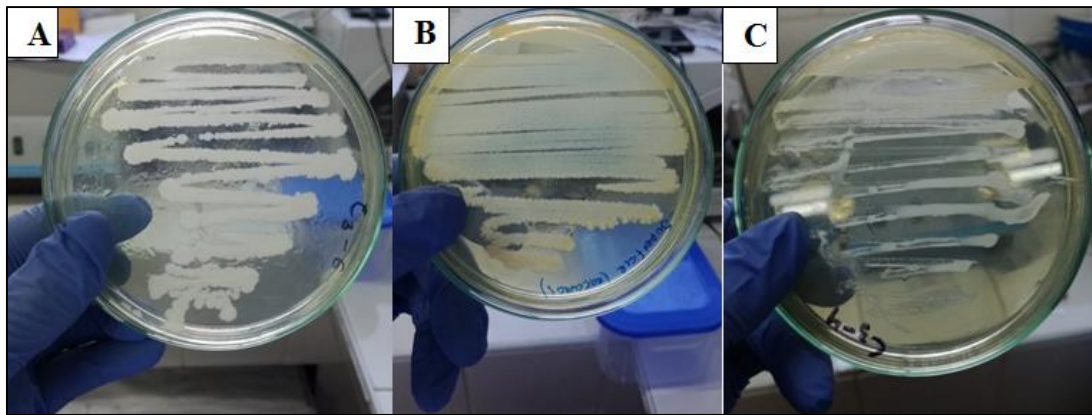


Figura 38. Obtención de bacterias probióticas. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 23 de marzo del 2018.

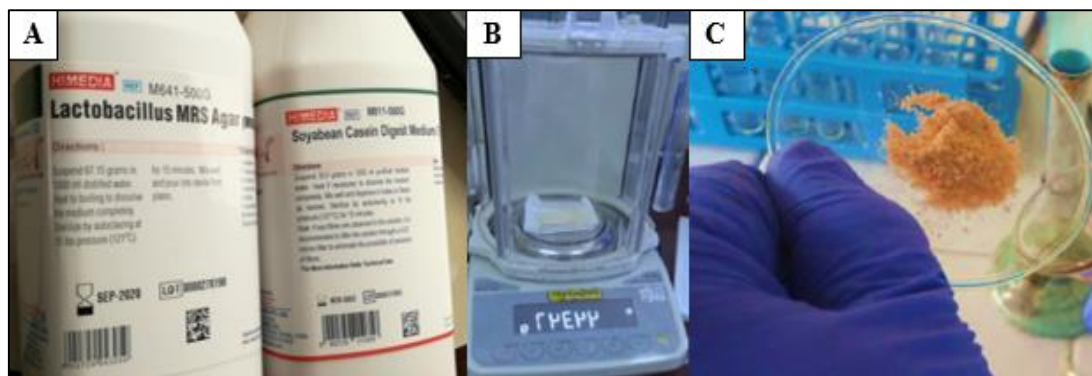


Figura 39. A) Medios de cultivo, B) Pesado de medios de cultivo, C) Probiótico. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 19 de marzo del 2018.

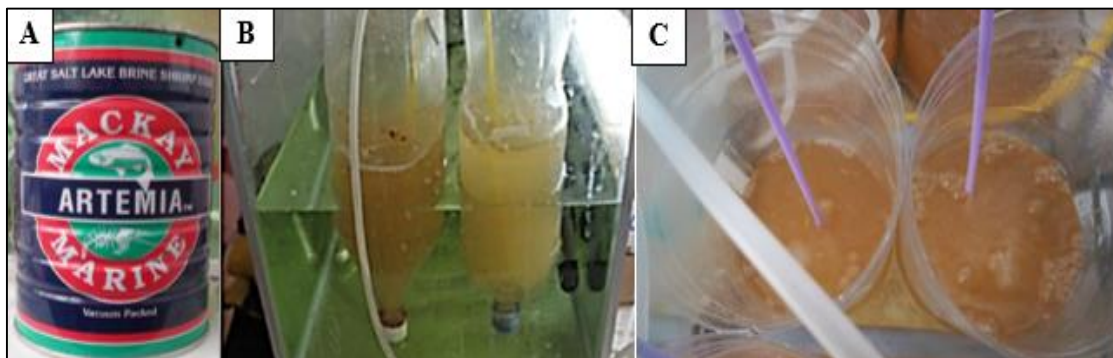


Figura 40. A) Cistos de *Artemia*, B) Cultivo *Artemia*, C) Bioencapsulación. Laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce - Puno, 30 de marzo del 2018.

Anexo B. Tablas

Tabla 20. Registro de obtención de ovas de *Orestias*.

Fechas de desove	Nombre y apellidos de los proveedores	localidad	hembras	machos	Total peces	Volumen total	Cantidad de ovas incubadas
26-02-18	Juan Balcona	Vallecito	04	03	07	250	33,750
	Justino Balcona	Vallecito	140	60	200		
	David Balcona	Vallecito	11	10	21		
27-02-18	Justino Balcona	Vallecito	170	135	305	300	40,500
	Juan Balcona	Vallecito	45	31	76	300	40,500
	Amadeo Balcona	Vallecito	85	55	140	250	33,750
	Daniel Balcona	Vallecito	102	88	190		
28-02-18	Justino Balcona	Vallecito	130	120	250		
	Juan Balcona	Vallecito	07	07	14	300	40,500
	Benito Balcona	Vallecito	130	72	202	300	40,500
01-03-18	Amadeo Balcona	Vallecito	100	78	178	300	40,500
	Daniel Balcona	Vallecito	54	38	92		
	Justino Balcona	Vallecito	250	107	357	300	40,500
02-03-18	David Balcona	Vallecito	140	78	218	300	40,500
	Benito Balcona	Vallecito	60	40	100	250	33,750
	Justino Balcona	Vallecito	150	125	275	300	40,500
	Amadeo Balcona	Vallecito	70	50	120	350	47,250
03-03-18	Raymundo Cruz	Vallecito	100	87	187		
	Justino Balcona	Vallecito	200	128	328		
	David Balcona	Vallecito	100	75	175	300	40,500
	Benito Balcona	Vallecito	95	95	190	300	40,500
	Raymundo Cruz	Vallecito	200	70	270	350	47,250
05-03-18	Juan Balcona	Vallecito	40	23	63		
	Justino Balcona	Vallecito	50	30	80	150	20,250
	Amadeo Balcona	Vallecito	100	56	156	300	40,500
	Raymundo Cruz	Vallecito	300	105	405	300	40,500

Tabla 21. Desarrollo biológico de *Orestias*.

Ova	Las ovas de <i>Orestias</i> tienen una disposición de los filamentos muy dispersa y distribuida. El color no es tan pigmentado. El diámetro de la ova es de 1.90 mm.
Ova fecundada	La ova fecundada muestra el micrópilo cerrado, presenta el citoplasma concentrado en un polo, existe una división celular, a las 6 horas se observan 4 células o blastómeros y a las 7 horas se observan 8 células.
Mórula	A las 12 horas se puede apreciar más de 100 blastómeros en la zona del blastodisco.
Blástula	A los 3 días se observa más de 1000 células en la zona del blastodisco
Morfogénesis	A los 7 días se puede observar el vitelo completamente cubierto por el disco germinativo
Embrión	A los 15 días se observa que el embrión ocupa el 90% del perímetro de la ova, se visualizan los melanóforos dispersos sobre el cuerpo, más densas en la región de la cabeza y latido del corazón. El saco vitelino se reabsorbe gradualmente
Eclosión	La eclosión se realiza a los 20 a 22 días y dura hasta 24 días, donde se observa la rotura de la membrana externa de la ova producida por la presión del embrión.
Larva	La larva en el momento de eclosionar mide aproximadamente 0.65 cm. El peso del saco vitelino impide la flotación por lo que se encuentran en el fondo de la incubadora. La reabsorción del saco vitelino dura aproximadamente 6 días, a partir de ese momento las larvas pasan a ser alevines.

Tabla 22. Biometría de la réplica 1 de *Orestias luteus*.

N° de especies	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso
1	1.6	0.048	2.1	0.079	2	0.076	1.8	0.074
2	1.5	0.043	1.9	0.074	1.9	0.073	2.1	0.076
3	1.7	0.051	2.2	0.077	2	0.076	2	0.072
4	1.6	0.049	2	0.072	1.9	0.072	1.7	0.067
5	1.7	0.05	2.2	0.081	2	0.076	2.1	0.077
6	1.6	0.049	2	0.076	1.8	0.074	1.5	0.069
7	1.5	0.044	2.2	0.071	2.1	0.076	1.9	0.071
8	1.8	0.052	2.1	0.074	2	0.076	2	0.072
9	1.4	0.041	1.8	0.072	1.9	0.07	1.9	0.069
10	1.8	0.053	2.4	0.084	2.3	0.079	1.6	0.069
Promedio	1.62	0.0480	2.09	0.076	1.99	0.0748	1.86	0.0716

Tabla 23. Biometría de la réplica 2 de *Orestias luteus*.

N° de especies	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso
1	1.6	0.05	2	0.072	1.9	0.073	2	0.072
2	1.6	0.049	2.4	0.081	2	0.076	1.9	0.069
3	1.5	0.044	2	0.076	1.9	0.072	1.8	0.069
4	1.7	0.049	2.3	0.071	2	0.076	1.8	0.076
5	1.6	0.041	1.9	0.072	2	0.075	2.1	0.078
6	1.8	0.053	1.8	0.071	2.1	0.07	2	0.072
7	1.6	0.048	2.3	0.079	2.2	0.078	1.7	0.067
8	1.4	0.041	2.1	0.074	2	0.073	2	0.072
9	1.7	0.051	1.8	0.072	1.8	0.07	1.7	0.069
10	1.6	0.049	2.3	0.081	2.3	0.079	1.9	0.07
Promedio	1.61	0.0475	2.09	0.0749	2.02	0.0742	1.89	0.0714

Tabla 24. Biometría de la réplica 3 de *Orestias luteus*.

N° de especies	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso
1	1.5	0.044	1.9	0.074	1.9	0.076	1.7	0.069
2	1.8	0.052	2.1	0.072	1.8	0.072	2	0.07
3	1.4	0.041	1.9	0.072	2	0.076	2.1	0.078
4	1.8	0.053	1.8	0.072	1.8	0.076	1.8	0.069
5	1.6	0.048	2.4	0.084	2.1	0.076	2	0.067
6	1.7	0.049	2.1	0.078	1.9	0.073	1.8	0.077
7	1.6	0.049	2.3	0.081	2	0.076	1.7	0.069
8	1.5	0.043	1.6	0.046	1.8	0.073	1.8	0.072
9	1.7	0.051	2.2	0.071	2	0.075	2	0.076
10	1.6	0.049	2.2	0.078	1.9	0.071	1.9	0.07
Promedio	1.62	0.0479	2.05	0.0728	1.92	0.0744	1.88	0.0717

Tabla 25. Biometría de la réplica 1 de *Orestias agassii*.

N° de especies	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso
1	1.8	0.052	2.4	0.08	2.4	0.074	2.3	0.079
2	1.9	0.055	2.3	0.081	2.3	0.081	2.2	0.074
3	1.8	0.053	2.5	0.086	2.1	0.086	2	0.068
4	1.5	0.048	2.1	0.089	2	0.077	2.1	0.089
5	1.5	0.049	2.1	0.068	2.3	0.068	2	0.078
6	1.9	0.054	2.5	0.098	2.3	0.098	1.9	0.068
7	1.4	0.046	2.4	0.081	2	0.071	2.2	0.076
8	1.7	0.051	2	0.068	2.5	0.068	1.9	0.069
9	1.8	0.053	2.5	0.096	2.3	0.089	2.4	0.081
10	1.7	0.049	2.2	0.073	2.3	0.078	1.9	0.068
Promedio	1.70	0.0510	2.30	0.0820	2.250	0.0790	2.09	0.0750

Tabla 26. Biometría de la réplica 2 de *Orestias agassii*.

N° de especies	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso
1	1.5	0.049	2.5	0.086	2.3	0.081	2.2	0.074
2	1.9	0.054	2.1	0.077	2.1	0.086	2	0.068
3	1.4	0.046	2.1	0.076	2	0.077	2.1	0.085
4	1.7	0.051	2.5	0.098	2.4	0.074	2.1	0.078
5	1.8	0.053	2.4	0.081	2.3	0.089	1.9	0.068
6	1.7	0.049	2	0.07	2.1	0.072	2.2	0.076
7	1.6	0.051	2.1	0.08	2.3	0.068	1.9	0.073
8	1.9	0.055	2.3	0.081	2.3	0.098	2.1	0.079
9	1.8	0.053	2.3	0.082	2	0.071	2.3	0.079
10	1.5	0.048	2.2	0.073	2.5	0.068	1.9	0.068
Promedio	1.68	0.0509	2.25	0.0804	2.23	0.0784	2.07	0.0748

Tabla 27. Biometría de la réplica 3 de *Orestias agassii*.

N° de especies	T1 (0 días)		T2 (5 días)		T3 (10 días)		T4 (15 días)	
	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso	Long	Peso
1	1.9	0.055	2	0.068	2.3	0.098	2.1	0.076
2	1.6	0.051	2.4	0.08	2	0.071	1.9	0.068
3	1.5	0.048	2.3	0.081	2.4	0.068	2.2	0.071
4	1.7	0.05	2.5	0.096	2.3	0.081	1.9	0.069
5	1.8	0.054	2.2	0.073	2.1	0.081	2.2	0.081
6	1.4	0.046	2.3	0.086	2	0.077	2.3	0.079
7	1.7	0.051	2.1	0.083	2.4	0.074	1.9	0.072
8	1.8	0.053	2.1	0.068	2.3	0.089	2.2	0.074
9	1.5	0.046	2.5	0.098	2.4	0.078	2	0.068
10	1.8	0.052	2.4	0.081	2.3	0.068	2.1	0.089
Promedio	1.67	0.0506	2.28	0.0814	2.25	0.0785	2.08	0.0747

Tabla 28. Distribución de tratamientos para alevinos de *Orestias luteus*.

Tratamientos	Densidad (alevinos/60L)	Numero de peces			
		R1	R2	R3	TOTAL
T1 (Control)	250	250	250	250	750
T2 (Cada 5 días)	250	250	250	250	750
T2 (Cada 10 días)	250	250	250	250	750
T2 (Cada 15 días)	250	250	250	250	750
	TOTAL	1000	1000	1000	3000

Tabla 29. Distribución de tratamientos para alevinos de *Orestias agassii*.

Tratamientos	Densidad (alevinos/60L)	Numero de peces			
		R1	R2	R3	TOTAL
T1 (Control)	250	250	250	250	750
T2 (Cada 5 días)	250	250	250	250	750
T2 (Cada 10 días)	250	250	250	250	750
T2 (Cada 15 días)	250	250	250	250	750
	TOTAL	1000	1000	1000	3000

Tabla 30. Obtención de datos de sobrevivencia de alevinos de *Orestias luteus*.

N° inicial de alevinos	T1 (0 días)	T2 (5 días)	T3 (10 días)	T4 (15 días)
250	169	229	215	198
250	171	225	219	201
250	164	233	220	187
Promedio	168	229	218	195

Tabla 31. Obtención de datos de sobrevivencia de alevinos de *Orestias agassii*.

N° inicial de alevinos	T1 (0 días)	T2 (5 días)	T3 (10 días)	T4 (15 días)
250	193	238	217	216
250	185	231	226	219
250	198	239	241	222
Promedio	192	236	228	219



INVERSIONES MILENIUM E.I.R.L.
Ubicado en: Km 12 de la Panamericana Sur
Sector Sallihua – Callejón, Puno



CONSTANCIA

Quien suscribe, JULIÁN ISAAC BARRA MINDANI, con D.N.I N°: 09343108,
como Gerente General de INVERSIONES MILENIUM E.I.R.L.

Hace constar:

Que la Srta. **LIDIA BEATRIZ RAMOS MAMANI**, egresado de la Facultad Ciencias Biológicas de la UNA Puno, ha ejecutado su proyecto de investigación titulado **“Efecto de la adición de bacterias probióticas en crecimiento y sobrevivencia de alevines de “Carachi amarillo” *Orestias luteus* y “Carachi negro” *Orestias agassii*, en condiciones de laboratorio”**, en el laboratorio de Productos Hidrobiológicos de Agua Dulce PHAD, ya que es un laboratorio equipado con todos los materiales, equipos y un ambiente necesarios que requiere la tesista para la ejecución de su proyecto. Desde el 05 de febrero al 31 de julio del 2018. Demostrando eficiencia, responsabilidad y deseos de superación de manera satisfactoria.

Se expide el presente a solicitud personal para fines administrativos que crea por conveniente.

Puno, 28 de octubre del 2019

INVERSIONES MILENIUM E.I.R.L.

Julian Barra Mindani
GERENTE TITULAR

Email: mileniumplanta@gmail.com
Ruc: 20498185305



URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS BEATRIZ RAMOS MAMANI.pdf (D62309393)
Submitted: 1/13/2020 10:36:00 PM
Submitted By: acanales@unap.edu.pe
Significance: 1 %

Sources included in the report:

Mantilla-Urkund (1).docx (D40643051)
Mantilla -urkund 2.docx (D40643783)
TESIS 21_05_2019_SUCA HUAMAN, Frank Jover.docx (D52480692)
TESIS REDACCION FINAL.pdf (D48050793)
TESIS REDACCION FINAL.pdf (D48051139)
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4857/1/T-ESPE-IASA%20II-002358.pdf>

Instances where selected sources appear:

10



1 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EFECTO DE LA ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE ALEVINES DE "CARACHI AMARILLO" *Orestias luteus* Y "CARACHI NEGRO" *Orestias agassii*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO TESIS PRESENTADA POR: Bach. LIDIA BEATRIZ RAMOS MAMANI PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE: LICENCIADO EN BIOLOGÍA PUNO – PERÚ 2019

2 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA TESIS EFECTO DE LA ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE ALEVINES DE "CARACHI AMARILLO" *Orestias luteus* Y "CARACHI NEGRO" *Orestias agassii*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO PRESENTADA POR: Bach. LIDIA BEATRIZ RAMOS MAMANI PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE: LICENCIADO EN BIOLOGÍA APROBADA POR: PRESIDENTE :

_____ D. Sc. Buenaventura Optaciano Carpio Vásquez PRIMER
MIEMBRO : _____ Mg. Sc. José David Velezvia Díaz SEGUNDO
MIEMBRO : _____ D. Sc. Juan José Pauro Roque DIRECTOR /
ASESOR : _____ M. Sc. Edwin Federico Orna Rivas Área :
Acuicultura Tema : Efecto de Bacterias Probióticas en alevines de *O. agassii* y *O. luteus*.

3 DEDICATORIA A mi hermana Tania Erika Ramos Mamani que siempre me alentó a ser mejor en la vida, por demostrar esa fortaleza de salir adelante y tener ese carácter que la hace única para afrontar a la vida. A mis sobrinos Rosa Judith Pari Ramos y Luis Edwarth Pari Ramos por haberme dado tantas alegrías y cariño a mi hermano Juan Pari Parillo por apoyarme. A mis padres Pedro Eloy Ramos Ccolla y Nilda Marcelina Mamani Choque que, aunque no estuvieron a mi lado en este camino siempre los tuve presente y les hice mi motivación por haberme dado la vida. A Dios Todopoderoso, por darme la sabiduría y la fuerza necesaria para enfrentar los obstáculos de la vida y seguir adelante aun en los momentos más difíciles, por ser la fuerza que impulsa nuestra existencia en el camino que recorreremos en la vida.

4 AGRADECIMIENTO A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y toda la plana de docentes que me instruyo y guio en toda mi formación académica. Al laboratorio de Recursos Hidrobiológicos de Agua Dulce (PHAD), ubicado en Callejón Ichu km 12, donde el señor Julián Barra Mindani, me dio la oportunidad de trabajar y desarrollar mi proyecto de investigación. Al señor Cristóbal Arazola, por el apoyo en el proceso de ejecución de mi proyecto de investigación, por brindarme su confianza, y brindarme su amistad. A mi director de tesis, M. Sc. Edwin Federico Orna Rivas, por el apoyo brindado, sus recomendaciones, su amabilidad y tiempo otorgado a mi persona. A los miembros de jurado D. Sc. Buenaventura Optaciano Carpio Vásquez, Mg. Sc. José David Velezvia Díaz y D. Sc. Juan José Pauro Roque por las correcciones, observaciones y sugerencias hechas para enriquecer el presente trabajo y tiempo dedicado en la revisión. A mis amigas Maritza Huanca Perca, por el apoyo incondicional en la elaboración de mi proyecto de tesis y a mi amiga Ruth G. León por su apoyo, amistad, comprensión, confianza, alegrías y tristezas compartidas. A mi amigo, cómplice, y compañero de vida Juan Carlos Calderón Chipana quien fue mi motor y motivo en el proceso de mi elaboración de tesis. A todas mis compañeras y compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas que compartieron el camino conmigo en el proceso de mi formación. A