

T
1205

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124327

24327



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

USO DE CEPAS PROBIÓTICAS PARA EL CONTROL DE *Aeromonas hydrophila*
(Chester, 1901), **CAUSANTE DE SEPTICEMIA HEMORRÁGICA EN *Pterophyllum***
***scalare* (Liechtenstein, 1823) (PEZ ÁNGEL)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A

MARÍA DEL CARMEN MONROY DOSTA

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES:

DRA. TALÍA CASTRO BARRERA

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

ASESOR:

DR. LINO MAYORGA REYES

MÉXICO, D. F

DICIEMBRE, 2010

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el convenio PFP-2093

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presento

María del Carmen Monroy Dosta

El día 13 de Diciembre de 2010

Jurado

Firma

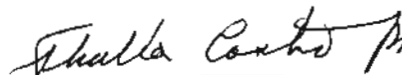
Directora: Dra. Talía Castro Barrera

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Lino Mayorga Reyes

Sinodal: Dr. Luis Héctor Hernández Hernández

Sinodal: Dr. Daniel Mota Rojas



AGRADECIMIENTOS

A las siguientes instituciones, por el apoyo financiero, de infraestructura y administrativo:

- **Universidad Autónoma Metropolitana**
- **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de la beca numero 206262**

A la Dra. Talía Castro Barrera, Directora de Tesis, por ser parte importante en mi formación profesional, al brindarme sus conocimientos, apoyo y confianza para la realización de esta tesis, pero sobre todo por brindarme su apreciable amistad.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino, Coodirector de tesis, por sus valiosas observaciones, su disposición y apoyo constante para la realización de esta Tesis.

Al Dr. Lino Mayorga Reyes, Asesor de tesis, por concederme no solo parte de su tiempo, sino también sus conocimientos y apoyo para terminar favorablemente este proyecto.

DEDICATORIA

A Mi abuela Josefina García García, por enseñarme el gran sentido de la responsabilidad y el deber

A mi madre, Paula Dosta García, porque con su bondad infinita, amor y trabajo, ha sido el mejor ejemplo a seguir.

A mi hermosa familia: Juan José, Viridiana, Midory y Omar, por ser la experiencia más bella de mi vida.

A mis hermanos, porque siempre me han brindado su confianza, amor y respeto

A la familia Mendoza Gutiérrez, por su cariño y respeto, en especial a Yolita por su comprensión y apoyo para mi superación profesional.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antagónico de cepas probióticas frente a *Aeromonas hydrophila*, causante de la septicemia hemorrágica en *Pterophyllum scalare* (pez ángel). Para alcanzarlo, se aisló la carga bacteriana del tracto digestivo de peces sanos en medios selectivos MRS, BHI y TCBS; las cepas obtenidas se sometieron a diferentes pruebas para determinar su potencial probiótico como: crecimiento en pH ácido, resistencia a sales biliares, colonización del epitelio intestinal e inhibición *in vitro* de *Aeromonas hydrophila*. Las cepas positivas en las pruebas anteriores se utilizaron para enriquecer el crustáceo *Artemia*, como forma de alimentación del pez ángel, y determinar si las cepas le confieren al pez mejoras en la sobrevivencia y el crecimiento (longitud total, anchura, alto y peso). Asimismo, se evaluó la capacidad de adherencia de las cepas al tejido epitelial, mediante el análisis bacteriológico de una porción del TGI y heces después de la administración de las bacterias. También se determinó la ubicación de éstas en el epitelio intestinal, utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Por otra parte, se estableció el efecto antagonista *in vivo* de las cepas probióticas aisladas frente a *A. hydrophila*, para lo cual se alimentaron peces con *Artemia* enriquecida con cada una de las tres cepas que demostraron potencial probiótico (La1, La2 y LA3) y con la combinación de estas. Posteriormente, los peces fueron inoculados con *Aeromonas hydrophila* a una concentración de 1×10^7 ufc/mL. Se caracterizó el cuadro clínico presentado por los organismos después de la inoculación del patógeno. Del riñón de los peces que

murieron y de las lesiones producidas por la infección se recuperó *A. hydrophila*, para corroborar que el agente causal de la infección fue el patógeno inoculado.

Por último, se realizó la identificación molecular de las tres cepas probióticas mediante el aislamiento de ADNr16s. Para ello, se efectuó la técnica de PCR utilizando primers universales 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); E939R (5'-CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC -3') y los primers específicos para *B. thuringiensis*: Fw bacill (5'- GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATG AAC -3) y Rv bacill (5'- TGA TCC AGC CGC ACC TTC CGA TAC -3'). Se obtuvo la secuencia genética bacteriana de cada cepa y se comparó, mediante el programa de búsqueda de similitud BLAST, con las secuencias contenidas en las bases mundiales (GENEBANK) y se obtuvieron las relaciones filogenéticas de dichas cepas.

Del tracto digestivo de *P. scalare* se aislaron 108 cepas bacterianas, de las cuales 20 crecieron en pH ácido y sales biliares. Sólo tres de éstas cepas presentaron una alta colonización del epitelio intestinal y la capacidad de inhibir *in vitro* a *Aeromonas hydrophila*, por lo que sólo estas cepas fueron consideradas como potenciales probióticos para *P. scalare*. Es importante mencionar que a lo largo del experimento estas tres cepas se nombraron como La1, La2 y La3, hasta el momento de su identificación molecular.

En cuanto al efecto del uso de las bacterias La1, La2 y La3 sobre el crecimiento y sobrevivencia de *P. scalare*, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos en comparación con los peces alimentados con *Artemia* sin probióticos. Se observó que la cepa La3 promueve mejor el crecimiento del pez ángel, al incrementar la longitud total, anchura y peso en un 50% en comparación

con el lote testigo y la combinación de las cepas administradas. La sobrevivencia fue del 100% en todos los tratamientos. Los resultados del Factor de Condición indican que los peces alimentados con las cepas La2, La3 y la combinación, obtienen una mejor relación peso longitud ya que se obtienen valores muy por encima de la Km inicial en comparación con los peces alimentados con la cepa La1 y el testigo, que siempre se mantuvieron por debajo de la Km inicial.

Las pruebas de colonización de las bacterias en el tracto digestivo de los peces indicaron que las tres cepas tienen un alto potencial de colonización sobre todo en la parte anterior del tracto digestivo, al poderse aislar los morfotipos característicos de las bacterias administradas en medio BHI durante 60 días. Se estableció que la cepa La2 fue la que presentó mayores valores promedio de ufc/mL (25 a 80), a medida que transcurrió el periodo experimental.

Con respecto al análisis bacteriológico de las heces, se pudo establecer que la cepa La3 tiene un alto grado de colonización y competencia dentro del tracto digestivo de *P. scalare* ya que se obtuvieron conteos promedio por arriba de 120 ufc/mL hasta la sexta semana después de que se suspendiera la administración de las cepas a través de *Artemia*, en comparación con las cepas La1 y La2 en las que se obtuvieron conteos de ufc/ mL con promedios de 70 y 30 respectivamente, en ese mismo tiempo. Se observó también la presencia de la cepa La3 hasta la décima semana, mientras que las cepas La1 y La2, a partir de la octava semana no se obtuvieron las colonias características de estas cepas. Los cortes histológicos efectuados a la parte anterior del intestino de pez ángel comprobaron la presencia de

las cepas La1, La2 y La3 en la luz y las vellosidades intestinales, dando marcaje positivo de un anticuerpo para *Bacillus*.

En relación al efecto antagonista de las cepas frente a *Aeromonas hydrophila* en el cultivo de pez ángel, los peces a los que se les administro *A. hydrophila* y que no fueron alimentados con probióticos desarrollaron el proceso infeccioso, observándose signos y lesiones de enfermedad como branquias y ojos hemorrágicos, nado irregular y lesiones en la piel. La sobrevivencia de estos tratamientos fue del 8%, en comparación con los peces alimentados con las diferentes cepas probióticas, que obtuvieron mayor resistencia a la inoculación del patógeno y no desarrollaron signos ni lesiones de enfermedad, manteniéndose sanos hasta la finalización del experimento, con una sobrevivencia del 90%.

La secuencia genética obtenida de las cepas probióticas aisladas de *P. scalare*, solo nos permitió ubicar a estas bacterias dentro del género *Bacillus*, ya que no se pudo identificar a ninguna, a nivel de especie, debido a las variaciones que se encontraron en las secuencias de las tres cepas con respecto a secuencias de las especies conocidas hasta la fecha. La cepa La1 resultó tener coincidencia con *Bacillus sp.*; La2 coincidió con *Bacillus subtilis* con 99% de similitud; La3 resultó tener una similitud del 100% con la construcción sintética de un clon del gen BA1990 de *B. anthracis*. Estos resultados hacen suponer la posibilidad de que se trate de especies no identificadas con anterioridad.

ABSTRACT

The object of this study was to evaluate antagonistic effect of probiotics strains against *Aeromonas hydrophila*, which causes hemorrhagic septicemia in *Pterophyllum scalare* (angelfish). To achieve it, it was isolated the bacterial load of fish healthy digestive tract in selective media MRS, BHI and TCBS; strains were subjected to various tests to determine its probiotic potential as growth in pH acid, bile salts resistance, colonization of intestinal epithelium and inhibition in vitro of *Aeromonas hydrophila*. The positive strains in previous tests were used to enrich the crustacean *Artemia*, to feed angelfish, and determine whether strains give the fish improved survival and growth (total length, width, height and weight). Also it was evaluated the capacity of adhesion of strains to the epithelial tissue by analyzing bacteriological a portion of the GIT and feces after the administration of bacteria. Also it was determined their location in the intestinal epithelium using immunohistochemical techniques. Moreover, it was established the antagonistic effect *in vivo* of probiotic strains isolated from *A. hydrophila*, for which fish were fed with *Artemia* enriched with each of the three strains that showed probiotic potential (La1, La2 and LA3) and with the combination of these. Subsequently, fish were inoculated with *Aeromonas hydrophila* at a concentration of 1×10^7 cfu / mL. It was characterized the clinical description presented by the organism after the pathogen inoculation. From the kidney of fish that died and injuries produced by infection it was recovered *A. hydrophila*, to confirm that the causative agent of infection was the pathogen inoculated.

Finally, it was performed the molecular identification of the three probiotic strains by isolating ADNr16s. To this it was carry out the PCR technique using universal primers 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), E939R (5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC -3') and specific primers for *B. thuringiensis*: bacille Fw (5'-GTT TGATCC TGG AAC ATG CTC AGG -3) and Rv bacille (5'-TGA AGC TCCTAC ACC CGC TTC CGA -3 '). Gene sequence was obtained of each bacterial strain and compared with the similarity search BLAST program with the sequences contained in the global database (Gene Bank) and it was obtained the phylogenetic relationships of these strains.

From *P. scalare* digestive tract, 108 bacterial strains were isolated of which 20 grew in acid pH and bile salts. Only three of these strains showed a high colonization of the intestinal epithelium and the ability to inhibit *in vitro Aeromonas hydrophila*, so only three of these strains were considered as potential probióticos for *P. scalare*. It is important to mention that throughout the experiment these three strains were named as La1, La2 and La3, until the time of molecular identification

As for the effect of the use of La1, La2 and La3 bacteria on the growth and survival of *P. scalare*, there were significant differences ($P < 0.001$) between treatments in comparison with fish fed with *Artemia* without probiotics. It was noted La3 strain promotes better the growth of the angel fish, by increasing 50% the total length, width and weight compared with the control group and the combination of the strains. Survival was 100% in all treatments. The results the factor of condition indicates that the fish fed with the La2, La3 strains, and the combination, get a better length and

weight obtained values above the initial Km compared to fish fed the La1 strain and control, who always remained below the initial Km.

The bacteria colonization tests in the digestive tract of fish indicated that the three strains have a high potential colonization, especially in the anterior part of the digestive tract, as to be able to isolate morphotypes characteristic of the bacteria administered in the medium BHI for 60 days. It was established that La2 strain showed higher average values of cfu/mL (25 to 80) as the experimental period passed.

With regard to bacteriological analysis of the feces, it was found that La3 strain has a high degree of colonization and competition within the digestive tract of *P. scalare* and counts were obtained in average above 120 cfu/ mL until the sixth week after suspending the administration of the strains through *Artemia* compared with strains La1 and La2 in which counts were obtained of cfu/ mL with averages of 70 and 30 respectively, at the same time. It was also observed the presence of La3 strain until the tenth week, meanwhile the strain La1 and La2, from the eighth week the colonies characteristics of these strains were not obtained. The histological sections made to the anterior part of the digestive gut of the angelfish proved the presence of La1, La2 and La3 strains in the gut light and villi, giving a positive marking antibody for Bacillus.

In relation to the antagonistic effect of strains against *Aeromonas hydrophila* in the angelfish cultivate, fish that were administered with *A. hydrophila* and were not fed with the probiotic, developed infectious process, signs and lesions observed gill and eye disease such as bleeding, swimming irregular and skin lesions. The survival of

these treatments was 8%, compared with fish fed with the different probiotic strains, which were more resistant to pathogen inoculation and did not develop signs of illness or injury, remained healthy until the end of the experiment, with a 90 % survival.

The genetic sequence of probióticos strains isolated from *P. scalare* only allowed us locate these bacteria within the genus *Bacillus*, because it was not possible to identify the specie, due to the variations found in the sequences of the three strains with respect to the sequences of species known until today. La1 strain was coincided with *Bacillus* sp. La2 coincided with *Bacillus subtilis* with 99% similarity; La3 have 100% similarity with the construction of a synthetic clone of the BA1990 gene of in *B. anthracis*. These results presume the possibility to found new species, unidentified until today.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Acuicultura de ornato en México	4
2.2 Características de <i>Pterophyllum scalare</i>	4
2.3 Las enfermedades y el cultivo de peces de ornato	6
2.4 Septicemia hemorrágica en los peces	8
2.5 <i>Aeromonas hydrophila</i> en acuicultura	9
2.6 <i>Aeromonas hydrophila</i> y su resistencia a diferentes antibióticos	10
2.7 Probióticos en la acuicultura	13
2.8 <i>Artemia</i> como biocápsula	16
2.9 Género <i>Bacillus</i>	17
2.10 Clasificación y filogenia.	18
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas de peces sanos de <i>Pterophyllum scalare</i>	21
6.2 Pruebas para caracterizar a un microorganismo como probiótico	22
6.2.1 Resistencia al pH ácido	22
6.2.2 Evaluación de la resistencia de las bacterias aisladas a las sales biliares	23
6.2.3 Capacidad de adherencia	23
6.2.4 Capacidad antagónica <i>in vitro</i>	24
6.3 Evaluación del crecimiento de <i>P. scalare</i> alimentado con las cepas probióticas aisladas	24
6.3.1 Crecimiento masivo de las cepas	24

6.4 Cultivo de <i>Artemia franciscana</i>	25
6.5 Incorporación del probiótico en metanauplios de <i>Artemia franciscana</i>	25
6.6 Alimentación de los peces con <i>Artemia</i> enriquecida con las bacterias aisladas	26
6.7 Evaluación de la capacidad de colonización de la bacterias aisladas	27
6.7.1 Análisis microbiológico	27
6.8 Análisis bacteriológico de la materia fecal de los peces	28
6.9 Ubicación de bacterias probióticas en el tracto digestivo de <i>P. scalare</i> mediante Inmunohistoquímica	29
6.10 Aislamiento e identificación de <i>Aeromonas hydrophila</i> de peces enfermos	30
6.11 Inhibición de <i>A. hydrophila</i> por bacterias probióticas aisladas de <i>P. scalare</i> In vivo	31
6.11.1 Caracterización del cuadro clínico	32
6.11.2. Recuperación del patógeno	32
6.12 Identificación molecular de bacteria mediante el aislamiento de ADNr 16s	31
6.12.1 Aislamiento de ADN	32
6.12.2 Electroforesis en gel de agarosa	33
6.12.3 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	34
6.12.4 Purificación de productos de PCR	36
6.12.5 Secuenciación e identificación de cepas La1, La2 y La3	37
7. RESULTADOS	38
7.1 Aislamiento bacteriano	38
7. 2. Pruebas para caracterizar a un microorganismo como probiótico	39
7.2.1 Actividad de Inhibición in vitro	40
7.3 Evaluación del crecimiento de <i>Pscalare</i>	41
7.3.1 Incorporación de La1, La2 y La3 en el tracto digestivo de <i>Artemia</i>	41
7.3.2 Supervivencia y crecimiento de <i>P scalare</i>	41
7.3.3 Longitud total	42
7.3.4 Altura	42
7.3.5 Anchura	43

.....Continuación

7.3.6 Peso	44
7.3.7. Factor de Condición(Km)	44
7.4 Ubicación de las bacterias probióticas en el tracto digestivo de <i>P. scalare</i>	46
7.4.1 Análisis Bacteriológico	47
7.4.2 Análisis Bacteriológico de las heces	47
7.4.3 Análisis Inmunohistoquímico	48
7.5 Inhibición de <i>A. hydrophila</i> por las cepas La1, La2 y La3 en el cultivo de pez ángel	50
7.5.1 Caracterización del cuadro clínico presentado por los peces	51
7.5.2. Supervivencia	53
7.5.3. Recuperación del patógeno	53
7.6. Identificación molecular de las cepas probióticas aisladas de <i>P. scalare</i>	55
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES	66
10.- RECOMENDACIONES	68
11. BIBLIOGRAFIA	69
12. ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS	84

1. INTRODUCCIÓN

La afición por el mantenimiento de los organismos acuáticos tiene miles de años, pero no es hasta el siglo pasado cuando se inició el estudio de los requerimientos de las especies cultivables para hacer uso adecuado y rentable de éstos. Por medio de la acuicultura se produce una gran cantidad de organismos acuáticos de valor comercial, entre los cuales se incluyen los peces de ornato. Los peces tropicales de agua dulce tienen un interés intrínseco; llenos de colorido, a menudo de formas exóticas y de pequeño tamaño, son coleccionados y apreciados por acuariófilos en todo el mundo (Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; *et al.* Mañón, 2008).

Actualmente, en México se ha desarrollado un fuerte interés en la producción de especies de ornato, como una estrategia para la generación de ingresos económicos. La intensificación en la producción de peces y la falta de control del comercio internacional de los organismos acuáticos vivos y de los productos derivados de estos animales ha provocado la movilización de gran cantidad de organismos y, como consecuencia, el transporte de gran cantidad de patógenos que en condiciones ambientales diferentes a las habituales pueden tener consecuencias catastróficas, pudiendo desarrollar graves epizootias, zoonosis, impacto ambiental y pérdidas económicas (Verschuere *et al.*, 2000).

Los principales agentes causantes de los procesos infecciosos en los peces son bacterias, virus, hongos y parásitos. En lo que se refiere a enfermedades causadas por bacterias, se han descrito muchas especies como patógenas, dentro de las cuales están los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Pseudomonas*, que son componentes

de la flora normal del agua, piel, branquias o intestino de los peces. En condiciones desfavorables, estas bacterias pueden desencadenar enfermedades infecciosas como la septicemia hemorrágica, cuyo agente etiológico es *Aeromonas hydrophila*, constituyente de la microbiota intestinal de los peces y del agua de cultivo, y que ocasiona grandes pérdidas en la producción de especies ornamentales en todo el mundo (Austin *et al.*, 1995; Nikoskelainen *et al.*, 2003).

Para el control de los procesos infecciosos, los acuicultores han usado y abusado de la aplicación de compuestos químicos y antibióticos, los cuales son administrados rutinariamente e incorporados en el alimento (o directamente en los estanques de cultivo), aun cuando desconocen si existe un estado de enfermedad infecciosa. Esta práctica ha provocado un gran incremento en la presencia de plásmidos resistentes a dichos compuestos en diferentes bacterias patógenas de peces, problemas ecológicos y la restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de los peces, llegando a incidir en la salud humana (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2004; Venkant *et al.*, 2004).

Por tal motivo, en la actualidad se están buscando alternativas para el control de enfermedades de los peces diferentes a las aplicadas hasta la fecha. Una estrategia de control bacteriológico, muy interesante y con resultados prometedores, se ha enfocado al empleo de probióticos, como alternativa para contrarrestar el uso de antibióticos y quimioterapéuticos, bajo el principio de la exclusión competitiva y la inmunoestimulación como una forma de contrarrestar las enfermedades de los peces (Gullian *et al.*, 2004).

Existen diferentes especies bacterianas utilizadas como probióticos, aunque las más utilizadas son los lactobacilos y las bifidobacterias. Sin embargo, uno de los problemas en la obtención de bacterias probióticas es la forma de selección. De acuerdo con Gómez y Roque (1998) en muchas ocasiones este proceso es de connotación empírica y con limitada evidencia científica, ya que la mayoría de las bacterias se han aislado del tracto digestivo del ser humano o de algunos mamíferos, han sido producidas y comercializadas para uso animal y están siendo utilizadas en la acuicultura sin tomar en cuenta que las bacterias con fines probióticos deben cumplir con algunos aspectos como el potencial de colonización del tracto digestivo del huésped, la capacidad para competir contra patógenos y la de incrementar la resistencia a enfermedades, de tal manera que surge la necesidad de obtener probióticos específicos para los fines que se persiguen y no utilizar siempre las mismas cepas, que a veces no son las óptimas.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto bactericida de cepas probióticas contra *Aeromonas hydrophila*, causante de la septicemia hemorrágica en *Pterophyllum scalare* (pez ángel).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Acuicultura de ornato en México

La acuicultura de ornato en México es una actividad importante para el sector rural del país, sobre todo en los Estados de Morelos, México y Jalisco. A nivel comercial, constituye uno de los sectores productivos con mayor potencial de crecimiento en el país, en virtud de ser una importante fuente generadora de empleos directos e indirectos que promueve el desarrollo socio-económico regional debido a su efecto multiplicador, asociado a muchas otras actividades productivas. Además, representa una atractiva posibilidad para incursionar, no sólo en el mercado nacional sino también en el internacional (APPOEM, 2000). En el año 2001 se identificaron en México 136 especies de peces de ornato con potencial de cultivo, de las cuales se aprovechan 57, con un dominio tecnológico que permite practicar cultivos de ciclo completo. Otras 16 están en proceso de alcanzar un desarrollo tecnológico más avanzado y para el resto se poseen diferentes grados de dominio en su cultivo (Cházaro y Niembro, 2001).

2.2 Características de *Pterophyllum scalare*

Un caso muy especial es *Pterophyllum scalare* (pez ángel) (figura 1), un cíclido con alto potencial económico en el mundo y que se ha constituido a través de los años en uno de los peces de ornato más apreciados, por su gran belleza y elegancia, su temperamento apacible y compatible con muchas especies, además de poseer una gran adaptabilidad en cautiverio. Sin embargo, poco se conoce acerca de las

condiciones óptimas que esta especie requiere para su crecimiento y reproducción, lo que ha ocasionado el que sea blanco de infecciones bacterianas en los centros productores del país (Neal, 1995).

Pterophyllum scalare es originario de los ríos de Sudamérica, específicamente del Río Amazonas y de sus afluentes en Perú y Ecuador; generalmente vive en aguas con poco movimiento y con abundante vegetación. Presenta un cuerpo comprimido casi circular y grandes aletas con rayos dibujados hacia largos filamentos. Poseen un solo par de orificios nasales, es un nadador lento, permanece casi todo el tiempo suspendido, prácticamente sin movimiento y depende de su coloración para escapar de los depredadores (Soriano y Hernández, 2002).

El agua en donde el pez ángel se encuentra en condiciones naturales es suave (niveles bajos de carbonatos) y ligeramente ácida, aunque puede sobrevivir y crecer en una amplia variedad de aguas duras; sin embargo, diversos autores (Neal, 1995; Soriano y Hernández, 2002; Zilberg *et al.*, 2004, Argudelo, 2005) han sugerido que las condiciones para la reproducción deben mantenerse con un pH de 6,8 a 7,2, con un fotoperíodo de 8 a 12 horas luz. Otro factor esencial es la temperatura, la cual se sugiere debe estar entre 26 y 28°C. Los niveles de nitratos deben mantenerse por debajo de los 0.3 mg/L, por lo que son muy recomendables recambios parciales de agua en los acuarios de reproducción.

Entre los cíclidos existen formas de reproducción extremadamente diversas; en el caso de *P. scalare* la hembra desova los huevecillos adhiriéndolos a troncos, hojas o rocas, esta especie es monógama y presenta cuidados de la puesta y alevines por

ambos progenitores (Marks, 1995; Neal, 1995, García y Gómez, 2005; Ortega *et al.*, 2009).

Taxonomía

Reino: Animalia

Phylum o filo: Chordata

Subphylum o subfilo: Vertebrata

Clase: Teleostomi

Subclase: Antinopterygii

Infraclase: Teleostei

Superorden: Acanthopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Cichlidae

Género y especie:

Pterophyllum scalare (Lichtenstein, 1823)

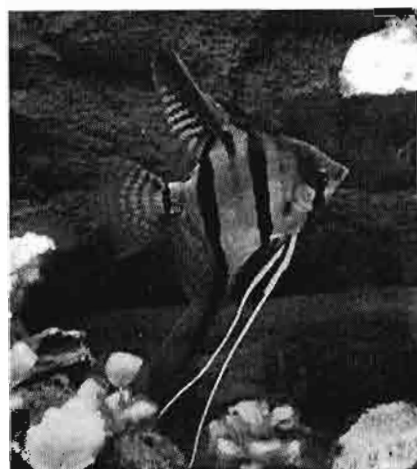


Figura 1.- *Pterophyllum scalare*

2.3 Las enfermedades y el cultivo de peces de ornato

Las patologías de los peces se reconocen cada vez más como un problema para la producción y comercialización, lo que afecta el desarrollo económico y social en muchos países. Estudios realizados en granjas de 16 países de Asia dan una idea de la extensión de las pérdidas financieras imputables a las enfermedades; dichas pérdidas fueron estimadas en más de tres millones de dólares por año (OIE, 2000). México no es la excepción, ya que en centros de producción de peces de ornato se han registrado pérdidas hasta del 90 % de su producción debido a este problema.

El estado de enfermedad en los peces se caracteriza por la aparición de anomalías en el comportamiento, por la aparición de signos y lesiones que provocan un descenso de los rendimientos y, a menudo, la muerte de los organismos afectados. Estas manifestaciones son debidas a causas de orden físico, químico o biológico, actuando solas o en asociación, con el fin de perturbar las funciones fisiológicas del animal.

Los principales agentes causantes de los procesos infecciosos en los peces son bacterias, virus, hongos y parásitos. En lo que se refiere a enfermedades causadas por bacterias, se han descrito muchas especies como patógenas, entre las cuales cabe destacar a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Pseudomonas* (Tabla 1), componentes de la microbiota normal del agua, piel, branquias o intestino de los peces y que en condiciones desfavorables pueden desencadenar enfermedades infecciosas (Barja y Estévez, 1998).

Tabla 1. Principales enfermedades de los peces de origen bacteriano

Enfermedad	Agente causal
Aeromoniasis	<i>Aeromonas</i> spp (Stanier, 1943)
urunculosis	<i>Aeromonas salmonicida salmonicida</i> (Lehmann and Neumann, 1896)
Septicemia	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Chester, 1901)
Vibriosis	<i>Vibrio</i> spp (Pacini, 1854)
Septicemia	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Migula, 1894)
Enfermedad de la boca roja	<i>Yersinia ruckeri</i> (Ewing et al., 1978)
Columnaris	<i>Flexibacter columnaris</i> (Bernardet and Grimont, 1989)
Mycobacteriosis o tuberculosis	<i>Mycobacterium</i> spp (Lehmann and Neumann, 1896)
Nocardiosis	<i>Nocardia</i> spp (Trevisan, 1887)
Edwardsielliosis	<i>Edwardsiella tarda</i> (Ewing and McWhorter, 1965)
Septicemia	<i>Edwardsiella ictaluri</i> (Hawke et al., 1981)
Pasteurellosis	<i>Pasteurella</i> spp (Trevisan, 1887)
Enfermedad de agua fría	<i>Cytophaga psychrophila</i> (Reichenbach, 1989)

(Nirchio, 2002).

2.4 Septicemia hemorrágica en los peces

La septicemia hemorrágica en los peces es una enfermedad sistémica asociada con el agente etiológico *Aeromonas hydrophila*. Esta bacteria es capaz de proliferar en el agua dulce sobre todo si contiene una sobrecarga de materia orgánica, por lo que la incidencia de esta enfermedad está asociada con la calidad el agua, el estrés

causado por el hacinamiento y a las variaciones de temperatura (Fuentes y Pérez, 1998).

Clínicamente la enfermedad se presenta como una epizootia dando como resultado un alto índice de mortalidad en pocas horas. Las lesiones macroscópicas externas incluyen ulceraciones en la piel, aletas deshilachadas, petequias, distensión abdominal, exoftalmia, branquias hemorrágicas, escamas erosionadas y necrosis en los órganos mayores (Harikrishnan y Balasundaram, 2005).

2.4 *Aeromonas hydrophila* en acuicultura

Esta bacteria es un bacilo corto de 0.3-1.0 μm de diámetro y de 1.0-3.5 μm de largo. Es Gram negativa y presenta un flagelo polar. Aeróbica, con metabolismo de tipo tanto respiratorio como fermentativo, y su temperatura óptima de crecimiento es de 22 a 28°C. Ha sido considerada como patógeno primario de muchos poiquiloterms (donde están incluidos anfibios, peces y reptiles), así como también de animales homeotermos: aves, mamíferos acuáticos y terrestres. En humanos es agente etiológico de diversas enfermedades, que en ocasiones pueden presentar hemorragia (Cipriano *et al.*, 2001).

A. hydrophila fue aislada por primera vez por Sanarelli, en 1981 con el nombre de *Bacillus hydrophilus fuscus*; desde entonces ha sido tema de estudio para la determinación de su relación etiológica con el hospedero. Este microorganismo es fácil de aislar, a partir de riñón o sangre de organismos enfermos, en medios ordinarios de cultivo.

Cipriano *et al.* (1984) indicaron la presencia de *A. hydrophila* como causante de procesos infecciosos durante la producción de peces de ornato. Dixon e Issvoran (1993) aislaron repetidamente *A. hydrophila* de pez dorado y carpa koi con signos de infección. Shome y Shome (1999) establecieron que *A. hydrophila* es la causa de altas mortalidades en la carpa común en la India. Sumawidjaja *et al.* (2001), por su parte, involucraron a esta bacteria en estados de epizootia en los cultivos de peces en Indonesia, Malasia, Singapur y Tailandia.

En el caso de las granjas productoras de peces de ornato del Estado de Morelos, México, se ha identificado frecuentemente la presencia de esta bacteria en procesos infecciosos, estableciéndose como el agente causal de septicemias asociadas a condiciones ambientales adversas, en donde este microorganismo se manifiesta como muy virulento (Negrete y Romero; 1998; 1999; Negrete *et al.*, 2002).

2.5 *Aeromonas hydrophila* y su resistencia a diferentes antibióticos

La acuicultura es una actividad económica en la que, al igual que en la ganadería y en la avicultura, es muy común el empleo de antibióticos como profilácticos, aun cuando en muchos países se ha prohibido su uso (Cabello, 2004). El empleo de antibióticos está dirigido a prevenir infecciones en poblaciones de animales altamente susceptibles a enfermedades debido a perturbaciones inmunológicas producidas por el hacinamiento, las manipulaciones y problemas dietéticos creados por su crianza en un sistema industrial. Está demostrado que su

aplicación en acuicultura genera la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en los entornos acuáticos donde se desarrolla esta actividad, y existen evidencias epidemiológicas y moleculares que señalan que los genes que median esta resistencia pueden ser transmitidos de bacterias acuáticas a bacterias capaces de producir infecciones en humanos y en animales terrestres (Sorum, 2000). Esto demuestra que los ambientes acuáticos y terrestres carecen de fronteras respecto del flujo de genes de resistencia a antibióticos y también que el fenómeno de resistencia es un problema global, ya que el uso de antibióticos en un ambiente tendrá, a lo largo del tiempo, repercusiones en otros ambientes aparentemente lejanos (Esteve *et al.*, 2003).

Las infecciones bacterianas causadas por miembros del género *Aeromonas* muestran una resistencia elevada a antibióticos, lo que permite el aumento de infecciones imposibles de curar y por ende graves pérdidas económicas para los productores. Esta bacteria es capaz de producir patologías en humanos, por lo que se podría considerar una zoonosis. Según Hayes (1993), *A. hydrophila* puede colonizar heridas en la piel del humano, y tiene capacidad para producir tres cuadros diferentes: una celulitis con inflamación y enrojecimiento, una mionecrosis con intenso eritema y licuefacción muscular y una gangrena eritematosa con necrosis y formación de gas; o por otro lado ocasionar, tras ser ingerida, cuadros de bacteriemia con fiebre, dolor abdominal, vómitos y diarrea.

Austin *et al.* (1995), mencionaron que son dos los mecanismos involucrados en la resistencia de *Aeromonas hydrophila*: adquisición de plásmidos con información genética específica a partir de otras bacterias de la misma especie o especies

relacionadas y la selección genética provocada por el uso indebido de antibióticos. Los antibióticos más utilizados en acuicultura son: cloranfenicol, nifurpirinol (Furanace), kanamicina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, estreptomicina y sulfamerazina.

En la tabla 2, se aprecia el comportamiento de *A. hydrophila* frente a diversas drogas antimicrobianas, según lo reportado por Bravo *et al.* (2007).

Tabla 2.- resistencia de *A. hydrophila* a diferentes antibióticos

ANTIBIOTICO	<i>Aeromonas hydrophila</i> (% de resistencia)
Ciprofloxacina	25
Ácido nalidíxico	25
Amikacina	50
Gentamicina	25
Estreptomicina	100
Cloranfenicol	50
Ceftriaxona	25
Eritromicina	100
Carbenicilina	100
Ampicilina	100
Penicilina	100
Meticilina	100

2.6 Probióticos en la acuicultura.

El concepto de probiótico no es un descubrimiento reciente: Metchnikoff, en 1907, afirmaba que la ingestión de organismos benéficos era un buen mecanismo de control contra el establecimiento de organismos patógenos (Gatesoupe, 1994; Fuller, 1997). Desde entonces, la utilización de bacterias benéficas como medida de control biológico para la producción de animales terrestres ha sido ampliamente estudiada, logrando ser una de las estrategias preventivas más modernas y constituyéndose en un proceso de uso rutinario. Estudios posteriores determinaron que los efectos benéficos de los probióticos se deben a que bajan el pH y se adhieren formando una película protectora, además de producir sustancias naturales que poseen capacidad antibiótica llamadas bacteriocinas o biocinas y pequeñas cantidades de agua oxigenada, ácido láctico y peróxido de hidrógeno, que inhiben el crecimiento de bacterias indeseables (Casas y Dobrogosz, 2000). Entre los géneros de bacterias utilizadas como probióticos para uso animal se encuentran bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.

En el caso de la acuicultura, el uso de los probióticos se ha intensificado. Una de las causas es probablemente la imitación con respecto a su uso en la alimentación de animales monogástricos y mascotas, además de la propia intensificación en la producción de peces y crustáceos (Briones y Lozano, 2003; Campaña *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2003). El primer probiótico usado comercialmente se registró en 1992 y fue una cepa no patógena de *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto *et al.* 1961), que permitió mejorar sustancialmente el

rendimiento en viveros de camarones en Ecuador y México (Verschuere *et al.*, 2000); Ramírez y Dixon (2003) aislaron del tracto digestivo del pez Oscar (*Ostronotus ocellatus*) y del pez ángel (*P. scalare*), bacterias identificadas como *Clostridium* y *Porphyromonas*, sin embargo su potencial bactericida no fue determinado.

Asimismo, existen referencias sobre el uso de diferentes bacterias ácido lácticas para el control de enfermedades en el cultivo de diferentes especies de camarón, como es el caso de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus thermophilus*, (Garriques y Arévalo, 1995; Gómez-Gil *et al.*, 2000).

Estudios posteriores han establecido que la manipulación microbiana es una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de microorganismos patógenos y, además, constituye una alternativa para la sustitución de agentes quimioterapéuticos para la prevención de enfermedades, al desarrollarse una competencia por los sitios de fijación con las bacterias patógenas (Vázquez *et al.*, 2005). Más aún, las bacterias probióticas mejoran la nutrición del huésped, al suministrarle nutrientes esenciales, incrementan la digestión del alimento, eliminan parte de la materia orgánica disuelta y producen sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas (Rengpipat *et al.*, 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000 *et al.*).

El desarrollo de probióticos adecuados no es una tarea simple y requiere investigación científica y fundamentada, pruebas a escala real, así como el desarrollo de herramientas apropiadas de monitoreo y producción que permitan

asegurar la aplicación de cepas seguras que realmente provean beneficios en las especies de cultivo sin poner en riesgo a los peces y en ambiente que les rodea (Decamp y Moriarty, 2006)

Para seleccionar microorganismos posiblemente probióticos es necesario conocer su potencial de colonización, capacidad de competencia con patógenos, producción de sustancias antimicrobianas y capacidad para incrementar la resistencia a las enfermedades (figura 2).

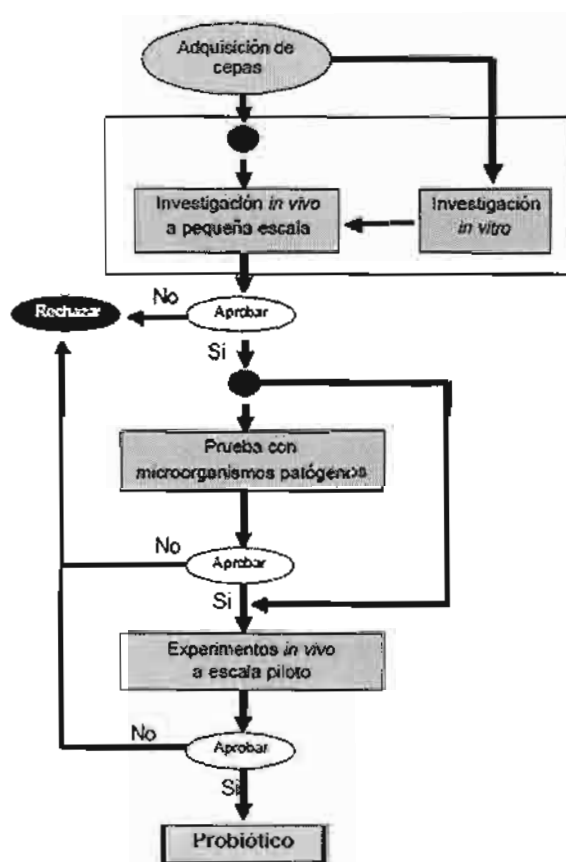


Figura 2.- Fundamentos para selección y aplicación de probióticos (Balcázar, 2002).

El potencial de colonización es la capacidad que presentan los microorganismos para ingresar en el hospedero y mantenerse vivos por un largo periodo de tiempo. Su permanencia en el hospedero está sujeta a diversos factores como capacidad para adherirse en la superficie del epitelio intestinal, producción de sustancias que antagonicen con la flora endógena para fomentar su proliferación y resistencia a mecanismos fisiológicos del animal.

La fijación de las bacterias en las superficies epiteliales está determinada por una serie de estructuras superficiales o moléculas conocidas como adhesinas, y se logra gracias a un flujo lento del probiótico a través del tracto gastrointestinal. Finalmente, es importante mencionar que uno de los factores más importantes es que permite reemplazar el uso de antibióticos para el control de enfermedades. Los probióticos no matan otras bacterias pero compiten con ellas, inhibiendo su desarrollo y contribuyendo al equilibrio biológico (Balcázar, 2002).

2.7 *Artemia* como biocápsula

El crustáceo branquiópodo del género *Artemia* (Kellog, 1906) constituye un excelente alimento vivo utilizado en acuicultura, debido a numerosas ventajas, entre las que sobresalen: su valor nutritivo, fácil digestión, alta tolerancia a diversos medios de cultivo, así como su fácil manejo. Una de las ventajas que sobresalen de *Artemia* es que puede emplearse como transportador o conductor de componentes que son difíciles de administrar a peces y a crustáceos, como nutrientes esenciales, pigmentos, profilácticos y terapéuticos (Legar *et al.*, 1986). A este proceso se le

conoce como técnica de bioencapsulación, la cual ofrece múltiples beneficios ya que al incorporar estos componentes en el cuerpo de *Artemia* se está evitando que estos vayan al agua y deterioren la calidad de la misma; por otra parte, la bioencapsulación facilita que estos componentes lleguen directamente a los consumidores, dando como resultado que dicho organismo se convierte a los efectos prácticos en una cápsula viva (Gelabert, 2001).

2.8 Género *Bacillus*

El género *Bacillus* está constituido por bacterias Gram-positivas que forman esporas, tienen forma de bastón con un metabolismo fermentativo, respiratorio o mixto. La presencia de esporas permite la fácil colonización de casi cualquier ambiente. Dentro del género *Bacillus* se encuentran varias especies que son comúnmente utilizadas como probióticos, entre ellas *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*. Cada una tiene propiedades diferentes y efectos diversos en el hospedero; se caracterizan porque secretan una amplia variedad de exoenzimas que generan un ambiente poco idóneo para otras bacterias, causando así uno de los efectos característicos de algunos probióticos, la exclusión competitiva (Moriarty, 1999; Gatesoupe, 2002; Hong *et al.*, 2005).

Las bacterias del género *Bacillus* se pueden encontrar en ambientes muy diversos, terrestres, acuáticos, en sedimentos y en organismos como crustáceos, peces y en el tracto digestivo humano. Aunque han sido ampliamente utilizadas y estudiadas, se necesita realizar mayor número de pruebas para verificar la seguridad

de que son probióticos. Se tiene información de que algunas cepas como *B. cereus* han causado enfermedades como envenenamiento por comida, ya que producen enterotoxinas y toxinas eméticas; otras especies de este mismo género son muy peligrosas, como *B. anthracis*; pero otras han sido certificadas como probióticos seguros y son ampliamente utilizadas (Decamp y Moriarty, 2006; Beleneva, 2008).

2.8.1 Clasificación y Filogenia

Los primeros intentos de clasificación del género *Bacillus* se basaron en dos características: crecimiento aeróbico y formación de endoesporas. Esto dio como resultado que varios tipos de bacterias, que poseían diferentes tipos de fisiología y ocupaban una gran variedad de hábitats, fueran integrados dentro de este grupo, con categorías no muy claras. Actualmente la taxonomía de *Bacillus* ha sido mejorada en gran medida debido al uso y análisis de las moléculas de ARNr 16s obtenidas mediante secuenciación. Esta técnica también ha revelado relaciones filogenéticas sorprendentes, como el parentesco de algunas especies de *Bacillus* con ciertas especies no formadoras de esporas, incluyendo a nivel de orden a *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. A nivel de familia se relacionan con *Listeria* y *Staphylococcus* (Todar, 2004).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las bacterias aisladas del tracto digestivo del pez *P. scalare* tendrán la capacidad de inhibir o eliminar la incidencia de *Aeromonas hydrophila* en los peces en cultivo?

4. HIPOTESIS

Si se administran a través del alimento (*Artemia franciscana*) cepas probióticas aisladas del tracto digestivo de peces *P. scalare* sanos, entonces se excluirá la presencia de la bacteria *Aeromonas hydrophila* causante de la septicemia hemorrágica en el cultivo del pez ángel, constituyendo así una alternativa para la sustitución de químicos y antibióticos para el control de esta enfermedad

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto bactericida de cepas probióticas contra *Aeromonas hydrophila*, causante de la septicemia hemorrágica en *Pterophyllum scalare* (pez ángel).

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la carga bacteriana predominante del tracto digestivo de peces de la especie *P. scalare* sanos.
2. Evaluar la capacidad probiótica de las cepas aisladas
3. Aislar e identificar *A. hydrophila* de peces enfermos.
4. Determinar la capacidad antagonista de las bacterias probióticas frente a *A. hydrophila* en peces *P. scalare*.
5. Evaluar la sobrevivencia y el crecimiento de *P. scalare* alimentado con las cepas probióticas aisladas
6. Establecer la ubicación de las bacterias probióticas en el tracto digestivo de los peces mediante técnicas de inmunohistoquímica
7. Identificar a las bacterias probióticas aisladas mediante ADN Rs16

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas de peces sanos de *Pterophyllum scalare*

De un centro productor de pez ángel ubicado en Xochimilco, Ciudad de México, se obtuvo un lote de 100 peces juveniles (15 cm de longitud total) sanos, es decir, que no mostraron ningún signo o lesión que indicaran cualquier proceso infeccioso. Los peces se introdujeron en una tina de cultivo equipada previamente en el laboratorio para mantenerlos durante un periodo de aclimatación, bajo las mismas condiciones de cultivo de los centros de producción: 28°C, pH 7, oxígeno disuelto 5 mg/mL y 0.3 ppm de nitratos y nitritos. Los peces fueron alimentados diariamente con adultos de *Artemia franciscana* y se observó su comportamiento durante 15 días.

Una vez transcurrido el periodo de aclimatación, los peces se mantuvieron en ayuno 24 horas. Posteriormente se tomaron 20 ejemplares con ayuda de un red de cuchara, se anestesiaron durante un minuto con sulfometano de tricaina (0.1 g/L). Se hizo una disección con bisturí, haciendo un corte por encima de la línea lateral desde el opérculo hasta la base de la aleta caudal. Se extrajo el tracto digestivo del pez y se tomó una porción, la cual se homogeneizó en 90 mL de solución salina estéril (Figura. 3).



Figura 3.- Extracción del tracto digestivo de *P. scalare*.

Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 y se inoculó 0.1 mL en placas de agar MSR, BHI y TCBS por triplicado. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. Transcurrido el periodo de incubación se efectuó el conteo de las unidades formadoras de colonias para cada dilución (ufc/mL), se caracterizó la morfología colonial y a través de resiembras sucesivas las cepas fueron purificadas. Posteriormente se efectuó la tinción de Gram para observar la morfología celular con ayuda de un microscopio óptico.

6.2 Pruebas para caracterizar a un microorganismo como probiótico

6.2.1 Resistencia al pH ácido

Para demostrar la resistencia de las bacterias a pH ácidos, se simuló la barrera gástrica haciendo crecer a los microorganismos aislados en medios de cultivo ácido en el rango de pH de 1.5, 2.5 y 3.0, desechando las cepas que no sobrevivieron ante dichas condiciones de estrés.

6.2.2 Evaluación de la resistencia de las bacterias aisladas a las sales

Para efectuar esta prueba se utilizaron 3 matraces Erlenmeyer de 150 mL de capacidad con 100 mL de caldo MRS más 0.1%, 0.5% ó 1.0% de bilis fresca, respectivamente. Los matraces se inocularon con 1 mL de las cepas de microorganismos que sobrevivieron en condiciones ácidas y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 3 h de contacto. Como control se utilizó la viabilidad del cultivo en medio caldo MRS (Oxoid) sin bilis.

4.2.3 Capacidad de adherencia

La determinación del porcentaje de bacterias benéficas establecidas en el tracto digestivo se realizó de acuerdo con Riquelme *et al.* (2000), mediante el análisis bacteriológico de una porción del tracto digestivo de los peces alimentados con las cepas que sobrevivieron a las condiciones de estrés antes mencionadas. Dicho análisis se efectuó al inicio del experimento y a los 15 y 30 días de cultivo, aislando los diferentes morfotipos crecidos en las placas de MRS. Mediante recuentos selectivos de unidades formadoras de colonias (ufc/mL) y tinción de Gram se calculó el porcentaje de bacterias benéficas presentes, en relación con las bacterias cultivables totales observadas a lo largo del experimento. Una vez establecido el potencial de colonización de las bacterias aisladas, se seleccionaron las cepas que colonizaron el TGI en un porcentaje mayor al 80 % (Gullian *et al.*, 2004) para iniciar las pruebas de inhibición *in vitro* de patógenos potenciales en acuicultura.

4.2.4 Capacidad antagónica *in vitro*

Con las cepas que obtuvieron resultados positivos en las pruebas anteriores, se procedió a realizar las pruebas de inhibición *in vitro*, para lo cual se sembró por triplicado *Aeromonas hydrophila* cepa patógena de peces, en cajas de agar BHI. Las cajas se incubaron 24 h a 30°C. Posteriormente, utilizando el método de difusión en pozos, se adicionaron 70 µL de una suspensión de las cepas benéficas aisladas en agua estéril, con la absorbancia a 620 nm correspondiente a una población bacteriana de 10^7 ufc/mL y diluciones hasta 10^6 ufc/mL. Las cajas se incubaron durante 24 h a 30°C, y transcurrido este tiempo se observó la formación de halos de inhibición. Se consideraron positivas aquellas cepas que presentaron halos superiores a 2 mm.

6.3 Evaluación del crecimiento de *P. scalare* alimentado con las cepas probióticas aisladas

6.3.1 Crecimiento masivo de las cepas

Las tres cepas que demostraron tener capacidad probiótica se denominaron La1, La2 y La3 para facilitar su manejo durante la experimentación. Dichas cepas se inocularon en 250 mL de caldo MRS, incubándose 24 hr a 35°C o hasta obtener una concentración de 2×10^7 ufc/mL. Esto se determinó mediante la medida de la

densidad óptica con la ayuda de un espectrofotómetro JENWAY 6400®, a una longitud de onda de 620 nm. La relación entre el valor obtenido por espectrofotometría y el número de ufc/mL se hizo de acuerdo a lo establecido por Gullian (2001).

Una vez obtenida la concentración de células requeridas se procedió a encapsularlas en *Artemia* para poder alimentar a los peces y evaluar su efecto sobre el crecimiento. Por tal motivo fue necesario iniciar el cultivo de este organismo en el laboratorio.

6.4 Cultivo de *Artemia franciscana*

Para el cultivo de *Artemia*, se tomaron quistes de la población de las salinas de Hidalgo, San Luis Potosí y se pusieron a eclosionar en agua con 40 g/L de salinidad; temperatura de 24°C y luz constante durante 24 h. Una vez obtenidos los nauplios, se cultivaron en cilindros de plástico de 200 L de capacidad, con 160 L de agua a 60 g/L de salinidad. Los organismos fueron alimentados cada 24 h con las microalgas *Tetraselmis sp.* e *Isochrysis galvana* (Castro et al., 2005).

6.5 Incorporación del probiótico en metanauplios de *Artemia franciscana*

Para la incorporación de las bacterias se colocaron 50 adultos de *Artemia franciscana* en 200 mL de agua, previamente esterilizada, en donde se inocularon 3 mL de las cepas a una concentración de 2×10^7 ufc/mL durante 30 min. Transcurrido

este tiempo, con ayuda de un microscopio estereoscópico Olympus-ZX12, se verificó que el tracto digestivo de *Artemia* estuviera completamente lleno con la bacteria en estudio. Posteriormente se paso por un tamiz con una luz de malla de 2.0 mm de abertura la suspensión de *Artemia* y se procedió a alimentar a los peces.

6.6 Alimentación de los peces con *Artemia* enriquecida con las bacterias aisladas

En el laboratorio se prepararon cuatro acuarios de 40 L con diez peces cada uno, los cuales se mantuvieron durante 15 días en periodo de aclimatación a 28°C, pH 7, oxígeno disuelto 5 mg/L y 0.2 ppm de concentración de nitritos. Trascurrido este periodo, los peces fueron alimentados diariamente durante 60 días con adultos de *Artemia* (50 *Artemias* / pez) inoculados con 2×10^7 ufc/mL de las bacterias benéficas aisladas anteriormente. Los peces se distribuyeron en cada uno de los cuatro acuarios dispuestos de la siguiente forma: el acuario 1 se asignó como testigo; en éste, los peces fueron alimentados con adultos de *Artemia* sin probióticos, del acuario 2 al 4, se alimentaron con *Artemia* enriquecidas con las cepas probióticas aisladas, contando con tres replicas por tratamiento. Diariamente se retiraron residuos de comida y heces de los acuarios, para mantener la calidad del agua. Se monitorearon parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, oxígeno disuelto, nitritos y nitratos) utilizando el equipo HACH. Modelo DR/850 colorimeter 2000.

Para evaluar el crecimiento de los peces, cada 15 días se tomaron medidas de longitud total, altura, ancho y peso en cada uno de los tratamientos.

A los datos biométricos (largo, alto, ancho y peso) se les aplicaron pruebas de estadística descriptiva para obtener la media y la desviación estándar, además se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (<0.005) se efectuó la prueba de comparación de medias múltiples por el método de Tukey, con el programa Systat 10.2. Así mismo se calculó el Factor de Condición (Km), para lo cual se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Factor de Condición Km} = 100(P)/L^3$$

6.7 Evaluación de la capacidad de colonización de la bacteria ácido láctica aislada en el tracto digestivo de *Pterophyllum scalare*

6.7.1 Análisis microbiológico

La determinación del porcentaje de colonización de las bacterias en el tracto digestivo de los peces se realizó utilizando la metodología de Riquelme *et al.* (2000), haciendo un análisis bacteriológico de una porción de la parte anterior del tracto digestivo de los peces alimentados con adultos de *Artemia* enriquecida con las bacterias aisladas. Dicho análisis se efectuó al inicio del experimento y a los 15, 30 y 60 días del cultivo. Se tomaron 5 peces al azar por cada tratamiento y se mantuvieron en ayuno durante 24 h; transcurrido este tiempo, los peces se anestesiaron con sulfometano de tricaina (0.1 g/L) durante un minuto. Con un bisturí se efectuó la disección, haciendo un corte por encima de la línea lateral desde el

opérculo hasta la base de la aleta caudal. Se extrajo el tracto digestivo, éste se lavó varias veces con ayuda de una piseta con agua destilada estéril para eliminar los residuos de heces y se colocó en tubos de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril, se homogeneizó durante 5 minutos en un homogeneizador (Virtis Company). Del homogeneizado original se realizaron diluciones 1:10 y se sembró 0,1 mL de cada dilución en las cajas de agar con medios selectivos (MRS y BHI). Las cajas se incubaron a 35°C durante 72 h, aislando los diferentes morfotipos crecidos en las placas de MRS. Mediante recuentos selectivos de unidades formadoras de colonias se calculó el porcentaje de la bacteria benéfica presente, en relación con las bacterias totales observadas al inicio del experimento.

6.8 Análisis bacteriológico de la materia fecal de los peces

Después del período de alimentación con las diferentes cepas de probióticos, se realizó un análisis bacteriológico de las heces de los peces para establecer el tiempo de permanencia de las bacterias en el tracto digestivo después de que se dejó de administrar el alimento enriquecido con las cepas en estudio.

Cada semana se recogieron de 10 a 50 mg de heces de cada acuario, se pasaron a través de un papel de filtro estéril (Millipore) para eliminar el exceso de agua. Estas muestras fueron homogeneizadas en 10 mL de una solución amortiguadora de fosfato (PBS). Se efectuaron diluciones 1:10, de las cuales 0.1 mL se inoculó en placas de agar MRS y BHI, que se incubaron a 27°C durante 24 h. Después del período de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias

(ufc), se corroboraron las características morfológicas y se realizó la tinción de Gram para cada grupo bacteriano. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y los conteos se efectuaron durante 10 semanas.

6.9 Ubicación de bacterias probióticas en el tracto digestivo de *P. scalare* mediante inmunohistoquímica

Para la técnica de inmunohistoquímica se tomaron secciones de tejido intestinal del pez después de ser alimentado con las bacterias en estudio. Las muestras se fijaron en formol al 10% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Una vez fijadas, las muestras se procesaron mediante técnicas rutinarias de histología, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 μm . Las laminillas se pre-trataron con 3-amonipropiltiethoxysilano al 3% (Sigma Laboratorios) y las secciones de tejido se desparafinaron a 60°C durante 10 minutos. Se realizaron los siguientes lavados: tres cambios de xilol durante 5 minutos cada uno; posteriormente se sumergieron en dos cambios de alcohol al 10%, dos cambio de alcohol al 70% y por ultimo en agua destilada durante cinco minutos. Para la inmunodetección se utilizó un kit de marcaje InmunoCruz Staining System (Santa Cruz Biotechnology, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como anticuerpo primario se utilizó anti-*Bacillus* sp (HRP) con una dilución 1:20 (Affinity Bioreagents, USA) y como medio de contraste se aplicó hematoxilina de Gill durante cinco segundos.

6.10 Aislamiento e identificación de *Aeromonas hydrophila* de peces enfermos

Con el fin de obtener el patógeno a utilizar en la investigación, se visitó un centro productor de pez ángel durante un proceso de infección y se tomaron muestras de riñón y de las lesiones observadas en la piel, branquias, aletas y ojos de los peces. Las muestras fueron sembradas en placas de agar (TCBS). Las colonias obtenidas se purificaron a través de resiembras sucesivas en placas de agar BHI, hasta obtener la homogeneidad en la morfología celular. Se efectuó tinción de Gram y pruebas bioquímicas complementarias (movilidad, citocromo C, oxido fermentación de la glucosa, tolerancia al NaCl, catalasa y resistencia al agente vibriostático 0/129).

La identificación molecular de *A. hydrophila* se llevó a cabo efectuando el aislamiento del ADN (16S rDNA) mediante el sistema DNA Easy Kit (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se efectuó la técnica de PCR para establecer la presencia de *A. hydrophila* en las muestras, para lo cual se utilizaron los siguientes oligos: Aer8-5'-TGCTGGCTGTGACGTTACTCGCAG-3' y Aer9-5'-TTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATC-3' (Martínez-Murcia *et al.*, 1992).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Amplifitron II Thermolyne Barnstead Internacional), bajo las siguientes condiciones: preincubación a 95°C, 10 minutos y 30 ciclos de desnaturalización, 95°C durante 60 segundos, hibridación, 68°C durante 1 minuto y extensión, 72°C durante 30 segundos, terminando en un paso de 4°C. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en un fotodocumentador GelDoc 2000 (Bio-Rad, Hercules,

California). Se utilizó una muestra de ADN de la cepa de colección *A. hydrophila* ATCC356554A como control positivo.

6.11 Inhibición de *A. hydrophila* por bacterias probióticas aisladas de *P. scalare*

In vivo

Para evaluar el efecto antagónico en los peces de las bacterias probióticas aisladas frente a *A. hydrophila*, se utilizaron 200 ejemplares juveniles sanos (que no presentaran signos o lesiones de infección). En 12 acuarios de 40 L de capacidad se distribuyeron en cada uno diez peces, los cuales se mantuvieron en el laboratorio a una temperatura de 28°C, pH 7, oxígeno disuelto 5 mg/L y una concentración de nitritos de 0.3 ppm.

Para alimentar a los peces se volvió a enriquecer a *Artemia* con las bacterias probióticas de la forma antes descrita y se alimentó a los peces durante 7 días. Transcurrido este periodo se inició la inoculación de *Aeromonas hydrophila* a través de *Artemia* (2×10^7 ufc/mL) durante 30 días más. Los tratamientos fueron los siguientes:

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	TRATAMIENTO 4	TRATAMIENTO 5
Control (<i>Artemia sola</i>)	Combinación (La1, La 2, La3) + <i>A. hydrophila</i>	La1+ <i>A.</i> <i>hydrophila</i>	La 2 + <i>A.</i> <i>hydrophila</i>	La3+ <i>A.</i> <i>hydrophila</i>

*Cada tratamiento se llevó al cabo con tres replicas.

6.11.1 Caracterización del cuadro clínico

A partir del momento en que se administró el patógeno se registraron la mortalidad, los cambios de comportamiento y signos y lesiones presentados por los peces, con el fin de caracterizar el cuadro clínico presentado por los organismos.

Para analizar los datos obtenidos, se efectuó un análisis discriminante, con el fin de establecer la existencia de variables influyentes, es decir qué órganos se ven más afectados por la administración de *A. hydrophila* (Ruíz y Deturnell, 2000). Se asignó un valor numérico a cada una de las variables contempladas: coloración, piel, escamas, aletas y cola, boca, branquias, ojos, cuerpo, apetito, comportamiento, nado, tubo digestivo, riñón, hígado, vejiga natatoria, vesícula biliar, corazón y gónadas, de acuerdo con el grado de lesión: El valor 0 se asignó cuando no se observó daño o lesión, 1 se asoció con daño ligero, 2 con daño grave y 3 con daño severo. El análisis se efectuó con el paquete estadístico Systat 10.2

6.11.2. Recuperación del patógeno

Con el fin de corroborar que el agente causal de la infección o de la muerte de los organismos fue *A. hydrophila*, se tomaron muestras de las lesiones producidas por la infección experimental y del riñón en el caso de los peces que murieron. Dichas muestras fueron sembradas en medio TCBS y los microorganismos se purificaron a través de resiembras sucesivas en medio BHI. Se confirmó la presencia de *A. hydrophila* por medio de la técnica de PCR.

6.12 Identificación molecular de bacteria mediante el aislamiento de ADNr 16s

6.12.1 Aislamiento de ADN

Las cepas probióticas aisladas del tracto digestivo de *P. scalare* se conservaron a -10°C en agar BHI y con glicerol al 10% hasta su uso. Para el aislamiento del ADN las cepas fueron reactivadas tomando con un asa bacteriológica una muestra de cada bacteria y se sembraron en 100 mL de caldo de cultivo BHI, incubándose a 30°C durante 48 h o hasta obtener una concentración de partida de 2×10^7 ufc/mL.

Para la extracción, se tomó 1 mL del cultivo de las cepas La1, La2 y La3 y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos para obtener un botón celular (pellet) de donde se aisló el ADN. Posteriormente se utilizó el kit para extracción de ADN genómico —Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.12.2 Electroforesis en gel de agarosa

Para determinar la pureza e integridad del ADN genómico de interés, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0.25 g de agarosa y 500 µL de buffer TAE (1X) en un volumen de 25 mL de agua destilada.

Para cargar las muestras de ADN en los pocillos, el gel fue sumergido en la cámara de corriente con 2 mL de buffer TAE (1X) en 100 mL de agua destilada. Se tomaron 2 µL de muestra de ADN aislado y se mezclaron con 2 µL de buffer de carga

(sacarosa y azul de bromofenol). Posteriormente cada muestra fue cargada en un pocillo diferente. Las muestras se corrieron a 100 V durante 30 min, utilizando una fuente de poder BIO-RAD Power Basic ®. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel durante 10 segundos en bromuro de etidio (0.5mg/mL), posteriormente se lavó con agua destilada durante 2 h y se analizó bajo luz UV en un rango de 302-366 nm en un fotodocumentador SYNGENE® (Synoptics Ltd.).

6.12.3 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Con el ADN genómico aislado de las tres cepas se realizaron dos amplificaciones, utilizando dos pares de primers diferentes para poder secuenciar el gen del ADN ribosomal completo. Para la primera amplificación se utilizaron los primers universales 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y E939R (5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC -3'). Para la segunda amplificación, tomando como base los resultados de la primera amplificación en donde las secuencias obtenidas estaban muy cercanas a *Bacillus thuringiensis*, se utilizaron primers específicos, tomando como base la porción del gen ADNr 16s de *Bacillus thuringiensis* con 1500 pb, los cuales fueron Fw bacill (5'- GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATG AAC -3) y Rv bacill (5'- TGA TCC AGC CGC ACC TTC CGA TAC -3').

Para la reacción de amplificación se realizó un pool de muestra, el cual fue distribuido entre 4 microtubos para PCR previamente marcados como La1, La2, La3 y control (-), tomando 49 µL de pool para cada uno y agregando al final 1 µL de

muestra del ADN correspondiente a cada tubo para completar un volumen total de muestra de 50 μL . Para el tubo control (-) se agregó 1 μL de agua destilada, en lugar de ADN (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes de pool para el PCR

Reactivo	LA1	LA2	LA3	Control (-)	Pool
Buffer (10%)	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	20 μL
dNTP's (10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	4 μL
MgCl ₂ (1.5 mM)	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL	12 μL
Primer 9F (10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	4 μL
Primer E939R (10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	4 μL
Taq. pol. (5 U/mL)	0.25 μL	0.25 μL	0.25 μL	0.25 μL	1 μL
H ₂ O	37.75 μL	37.75 μL	37.75 μL	37.75 μL	151 μL
ADN	1 μL de ADN	1 μL de ADN	1 μL de ADN	1 μL de agua	3 μL de ADN 1 μL de agua

Una vez mezclados los reactivos del pool y las muestras de ADN en cada tubo, éstos se colocaron en un termociclador (Biometra® Tgradient) para llevar a cabo la reacción de amplificación, manejando condiciones específicas de temperatura y tiempo para 30 ciclos de amplificación (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones para PCR utilizando primers universales y específicos de *B. thuringiensis*.

Condiciones de PCR para primers universales	Condiciones de PCR para primers específicos
1) 95°C 10 minutos	1) 95°C 10 minutos
2) 95°C 30 segundos	2) 95°C 1 minuto
3) 55°C 30 segundos	3) 55°C 1 minuto
4) 72°C 1 minuto	4) 72°C 1 minuto
5) 72°C 30 segundos	5) 72°C 10 minutos
6) 4°C pausa	6) 4°C pausa

Una vez terminada la amplificación se cargaron las muestras obtenidas en un gel de agarosa y se realizó una electroforesis a 100 V durante 30 min, para observar los productos de PCR de los ADN aislados. Para ello se siguieron las mismas condiciones descritas anteriormente y se utilizó un marcador molecular de 100 pb.

6.12.4 Purificación de productos de PCR

Para eliminar residuos de primers, nucleótidos, polimerasa y sales se realizó una purificación de los productos de PCR mediante el uso del kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente se tomaron 5 µL de cada una de las muestras obtenidas de la purificación y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando como

estándar 1 µl de marcador molecular de 100 pb para corroborar el tamaño de la banda resultante de cada muestra.

6.12.5 Secuenciación e identificación de cepas La1, La2 y La3

Para la secuenciación de cada cepa, se tomaron 10 µL de una solución de 40 ng/L de los productos de la purificación de la reacción de PCR y se enviaron al servicio de secuenciación de la FES-Iztacala, UNAM. Las secuencias obtenidas se interpretaron por medio de los programas Chromas y Blast. Finalmente, la información obtenida se comparó con la base mundial de secuencias y se obtuvieron las relaciones filogenéticas (GENEBANK).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento bacteriano

Del tracto digestivo de *Pterophyllum scalare* se aislaron un total de 80 cepas de bacilos Gram+ en Medio MRS (figura 4), pudiéndose observar la presencia de endosporas en el 50% de los mismos. En comparación, las bacterias aisladas en los medios BHI y TCBS, donde se obtuvieron 15 y 13 cepas, respectivamente, en su mayoría presentaron formas de bacilos cortos y bacilos curvados Gram-.

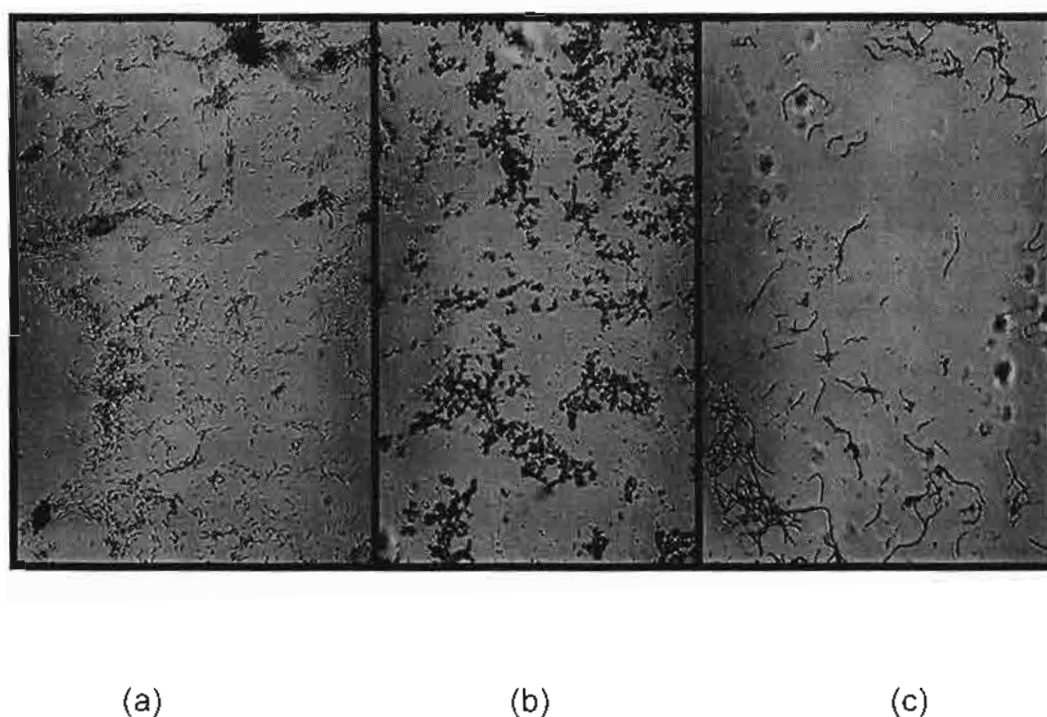


Figura 4.- Morfología celular de las bacterias probióticas aisladas del tracto digestivo de *P. scalare* (a) La1, (b) La2, (c) La3

7.2. Pruebas para caracterizar a un microorganismo como probiótico

De las 108 cepas aisladas originalmente del TGI de *P. scalare*, sólo 20 crecieron en pH ácido y en presencia de sales biliares, aunque sólo tres de éstas presentaron una alta colonización del epitelio intestinal y la capacidad de inhibir a *Aeromonas hydrophila*, produciendo halos de inhibición mayores a 2 mm (Tabla 5).

Tabla 5.- Cepas positivas a las pruebas para comprobación de capacidad probiótica bacteriana.

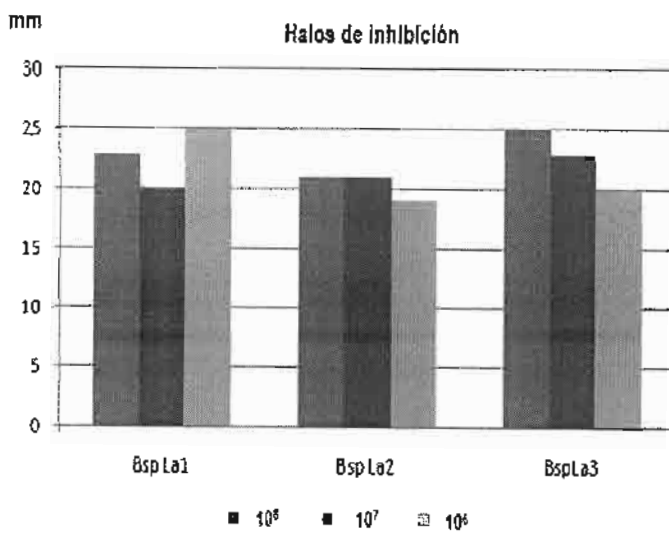
Cepa	Prueba de pH ácido			Prueba de sales biliares			Prueba de adherencia al TGI
	1.5	2.5	3	0.1%	0.5%	1.0%	
La1	+	+	+	+	+	+	+
La1a	+	+	+	+	+	+	-
La1b	+	+	+	+	+	+	-
La2	+	+	+	+	+	+	-
La2a	+	+	+	+	+	+	-
La2a1	+	+	+	+	+	+	-
La2a22	+	+	+	+	+	+	+
La3	+	+	+	+	+	+	-
La3a	+	+	+	+	+	+	-
La3a1	+	+	+	+	+	+	-
La3a2	+	+	+	+	+	+	-
La3a22	+	+	+	+	+	+	-
La3a23	+	+	+	+	+	+	+
La4	+	+	+	+	+	+	-
La4a	+	+	+	+	+	+	-
La4a1	+	+	+	+	+	+	-
La42	+	+	+	+	+	+	-
La4b	+	+	+	+	+	+	-
La5b2	+	+	+	+	+	+	-
La7ac	+	+	+	+	+	+	-

+ Reacción positiva

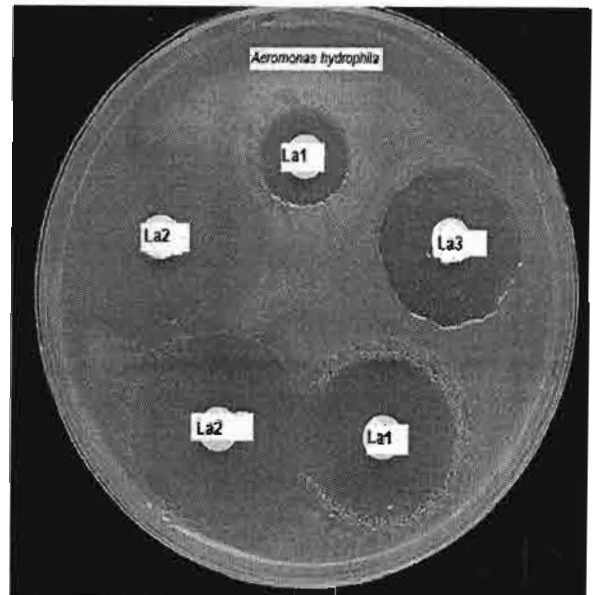
- Reacción negativa

7.2.1 Actividad de inhibición *in vitro*

En cuanto a la actividad de inhibición *in vitro*, no se observó una diferencia significativa entre las tres cepas probióticas y las dosis utilizadas del microorganismo patógeno, ya que en todo los casos se formaron halos de inhibición que alcanzaron valores promedios de entre 19 a 24 mm (Figura 5 a y b); esto indica que las tres cepas tienen un alto grado de inhibición de *A. hydrophila*.



(a)



(b)

Figura 5 a y b .- Halos de inhibición *in vitro* de *A. hydrophila* debida a las cepas La1, La2 y La3

7.3 Evaluación del crecimiento de *P. scalare* alimentado con *Artemia* enriquecida con bacterias probióticas La1, La2 y La3

7.3.1 Incorporación de La1, La2 y La3 en el tracto digestivo de *Artemia*

El tiempo de incorporación total de las bacterias en el tracto digestivo de *Artemia* fue de 30 minutos después de ser inoculadas, manteniéndose una concentración de 2×10^7 ufc/mL) (figuras 6 y 7).

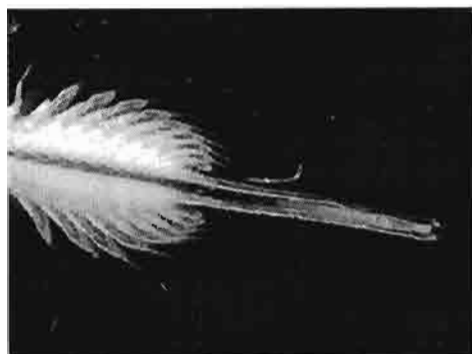


Figura 6.- Tracto digestivo de *Artemia*, tras la incorporación de bacterias después de 10 min. de inoculación

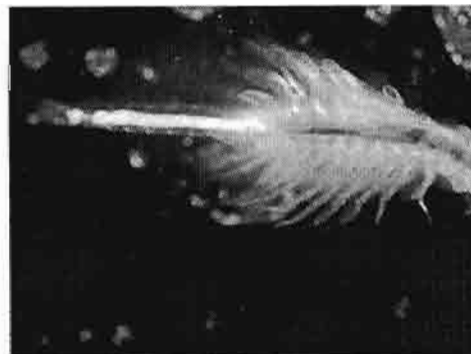


Figura 7.- Tracto digestivo de *Artemia* completamente lleno con la cepa La1 30 min. después de la inoculación.

7.3.2 Sobrevivencia y crecimiento de *P. scalare*

La sobrevivencia de los peces alimentados con las cepas probióticas fue del 100%, en comparación con una sobrevivencia del 80% en los peces alimentados sin probiótico.

7.3.3 Longitud total

El análisis de varianza para la longitud total indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($F=15.656$, $gl=4$ y $P<0.001$). Al efectuar la comparación de medias múltiples por la prueba de Tukey, se pudo establecer que el tratamiento de los peces alimentados con *B. sp* La3 permitió alcanzar la mayor longitud total (4.5 cm), mientras que los peces del grupo testigo sólo obtuvieron una longitud de 3 cm (Figura 8).

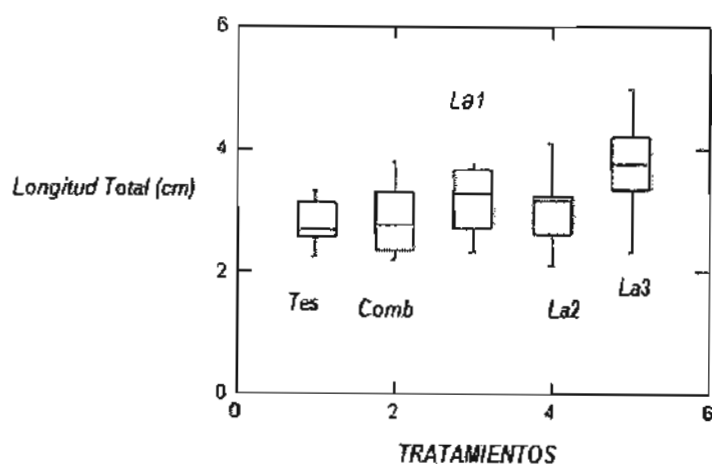


Figura 8.- Comparación la Longitud Total de los peces entre los tratamientos.

*Tes= Testigo, Com= Combinación-

7.3.4 Altura

Con respecto a la altura que obtuvieron los peces al final de experimento, el análisis de varianza indicó que también existen diferencias significativas ($F= 5.913$,

gl= 4 $P < 0.001$). Al efectuar la comparación de medias múltiples por el método de Tukey, se observa que el tratamiento testigo presenta diferencias significativas, obteniéndose en este grupo una altura promedio de 2.9 cm, en comparación con la de los demás tratamientos, donde oscilaron entre 2.3 y 2.5 cm (Figura 9).

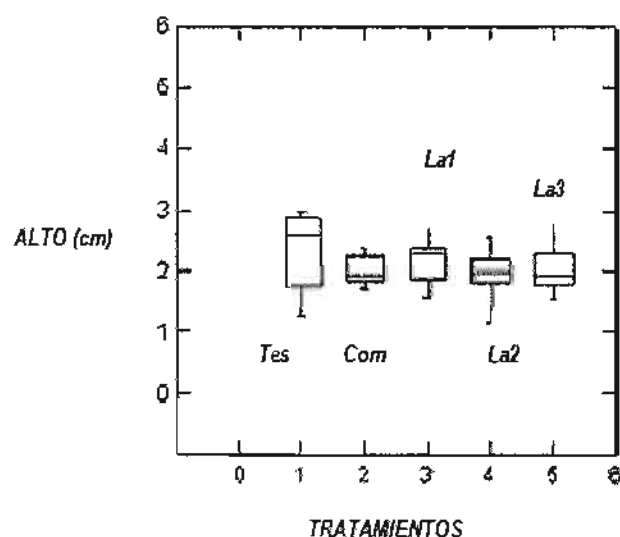


Figura 9.- Comparación de la variación de la altura de los peces entre los tratamientos.

*Tes.= Testigo, Com= Combinación

7.3.5 Anchura

Los peces que presentaron menor crecimiento en cuanto al ancho fueron los peces del lote testigo, obteniéndose en este caso un promedio de 0.63 cm de ancho, mientras que en los tratamientos con las cepas probióticas este parámetro osciló entre 1.10 y 1.25 cm (Figura 10).

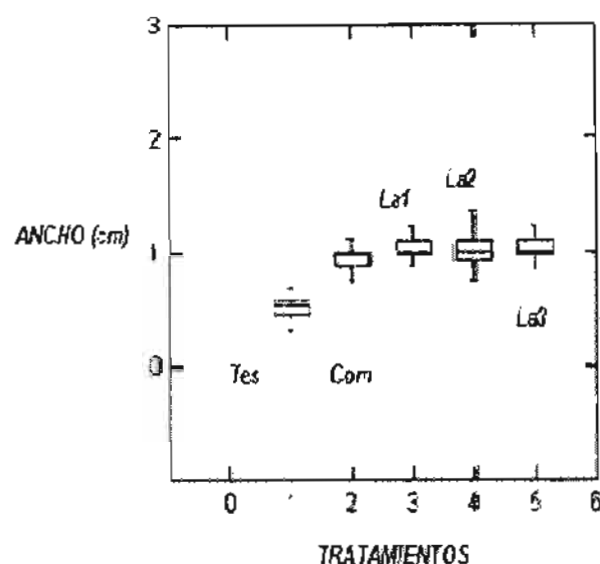


Figura 10.- Comparación del ancho de los peces entre los tratamientos.

*Tes.= Testigo, Com= Combinación

7.3.6 Peso

Con relación al peso, si se observa el análisis de varianza puede decirse que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($F=17.394$, $gl= 4$, $P < 0.001$). Al efectuarse el análisis de medias por el método de Tukey se observa que el tratamiento que proporciona mayor peso es *B. sp* La3, con un peso promedio de 1.90 g, en tanto que la combinación y el grupo testigo proporcionaron pesos por debajo de 1 g (Figura 11).

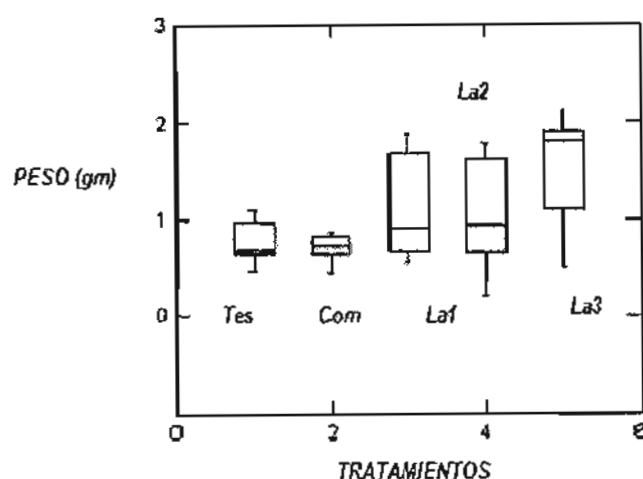


Figura 11.- Comparación de la variación del peso de los peces con los diferentes tratamientos.

*Tes.= Testigo, Com= Combinación

AUA
 SERVICIOS DE INFORMACION
 ARCHIVO HISTORICO

7.3.7 Factor de Condición

Los resultados del Factor de Condición indican que los peces alimentados con las cepas La2, La3 y la combinación, obtienen una mejor relación peso longitud ya que se obtienen valores muy por encima de la Km inicial en comparación con los peces alimentados con la cepa La1 y el testigo, que siempre se mantuvieron por debajo de la Km inicial (Figura 12).

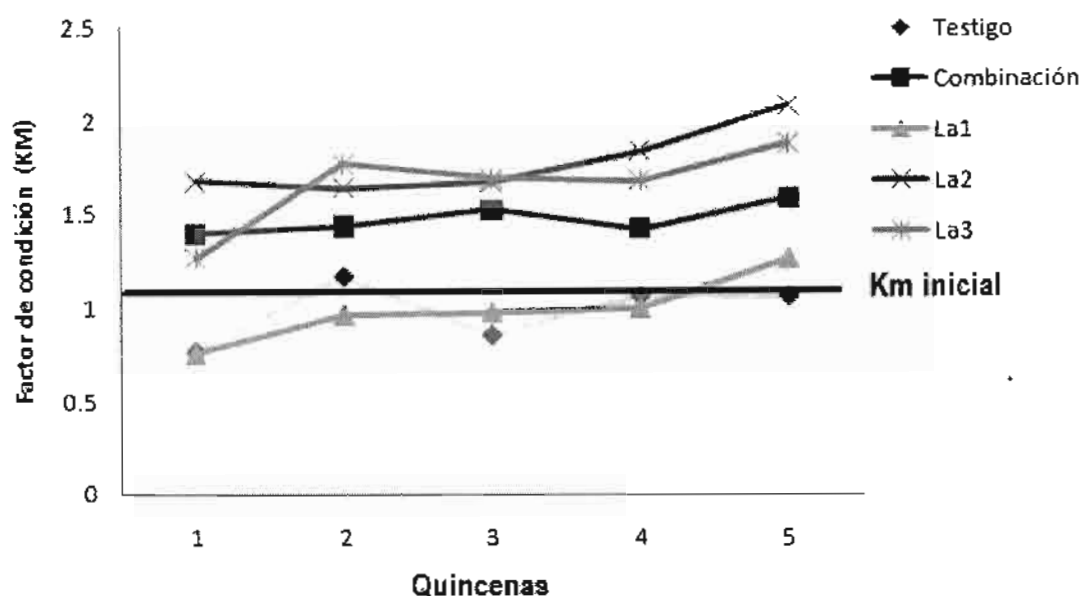


Figura 12. Factor de Condición de los peces alimentados con las diferentes cepas probióticas

7.4 Ubicación de las bacterias probióticas en el tracto digestivo de *P. scalare*

7.4.1 Análisis Bacteriológico

El análisis bacteriológico del tracto digestivo de los peces durante la administración de las diferentes cepas de *Bacillus* indicó que las tres cepas administradas lograron colonizar el tracto digestivo de *P. scalare*, pues pudieron aislarse los morfotipos característicos de las bacterias administradas en medios BHI y MRS. Se estableció que la cepa La2 fue la que presentó mayores valores promedio de ufc/mL a medida que transcurrió el periodo experimental (Figura 13).

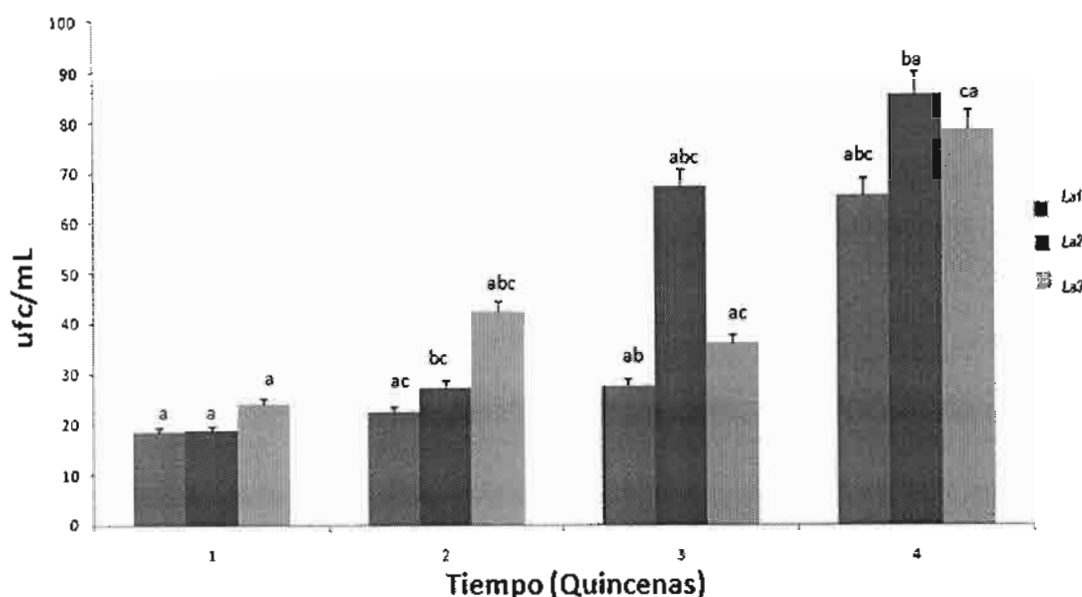


Figura 13.- Conteos de ufc/mL de las bacterias probióticas en el tracto digestivo de *P.*

*Letras diferentes muestran diferencias significativas de los datos ($p < 0.05$)

7.4.2 Análisis bacteriológico de las heces

En cuanto al análisis bacteriológico de las heces, se pudo establecer que la cepa La3 presentó un alto grado de colonización y competencia dentro del tracto digestivo de *P. scalare*, ya que se obtuvieron conteos promedio por arriba de 120 ufc/mL hasta la sexta semana. Después de haber dejado de administrar las bacterias en el alimento, se observó su presencia en las heces hasta la décima semana. En comparación, con las cepas La1 y La2 se obtuvieron conteos de ufc/ mL con promedios de 70 y 30, respectivamente, en la sexta semana; y a partir de la octava semana no se obtuvieron colonias características de estas dos cepas, aunque sí se observó crecimiento bacteriano, de diferente morfotipo (Figura 14).

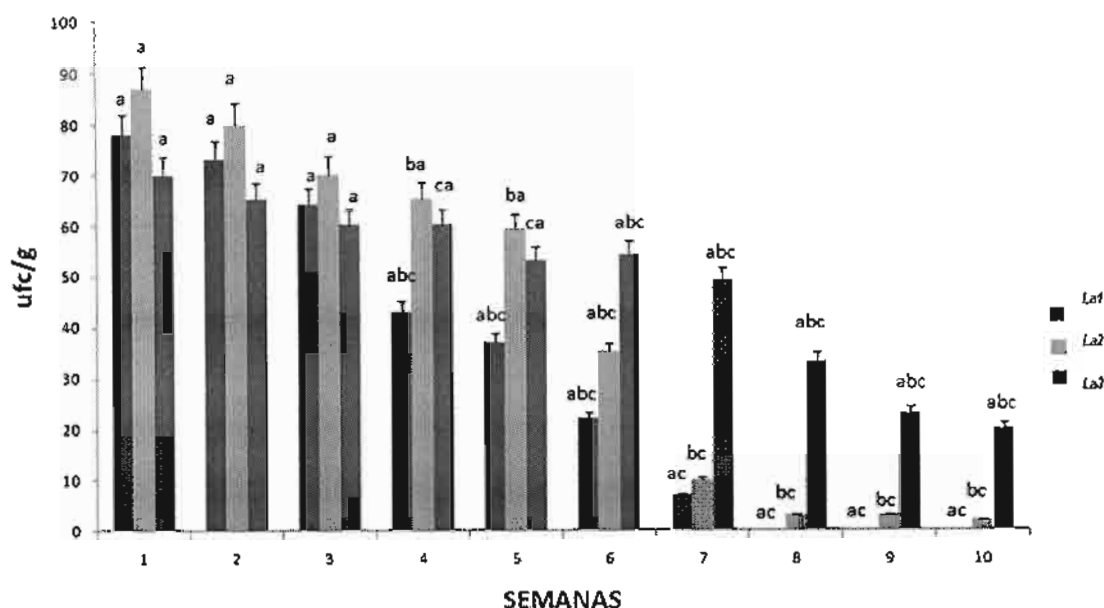


Figura 14.- Conteos de las ufc/g de las muestras de heces de *P. scalare* durante 10 semanas desde la suspensión de la alimentación con las cepas probióticas.

*Letras diferentes muestran diferencias significativas de los datos ($p < 0.05$)

7.4.3 Análisis inmunohistoquímico

Los cortes histológicos efectuados a la parte anterior del intestino de pez ángel mostraron un diámetro aproximado de la luz intestinal de 100 μm y una longitud superior a las 24 μm en las vellosidades intestinales. Además, se observó claramente un revestimiento epitelial cilíndrico monoestratificado, ciliado y con pliegues conformados por una mucosa y una submucosa espiral; se observaron también abundantes células caliciformes y las criptas de Lieberkühn en todas las vellosidades (Figuras 15 a, b y c).

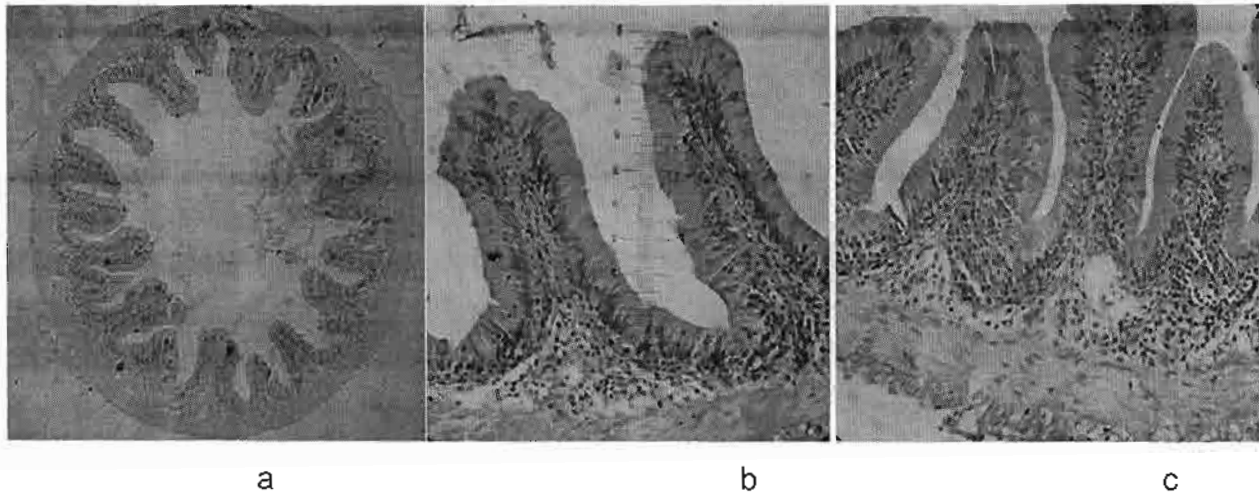


Figura 15.- a) corte transversal del intestino de *P. scalare* de 100 μm ; b) vellosidades intestinales (24 μm); c) células caliciformes y criptas de Lieberkühn.

En las figuras 16 a y b, se observan, en cortes transversales del intestino del pez ángel, un marcaje positivo para la bacteria *Bacillus sp.* en el lumen del tubo intestinal, así como también, en el borde de las microvellosidades intestinales.

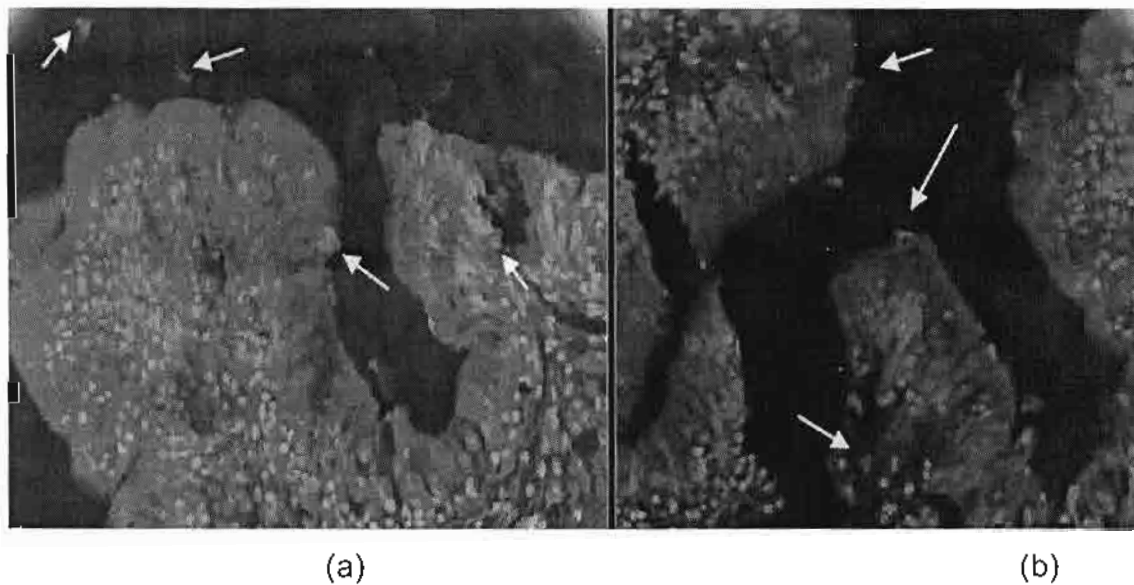


Figura 16 a y b. Se observa la presencia de los probióticos administrados al pez en los cortes histológicos marcados con anticuerpos para *Bacillus*

7.5 Inhibición de *A. hydrophila* por las cepas La1, La2 y La3 en el cultivo de pez ángel

7.5.1 Caracterización del cuadro clínico presentado por los peces

El proceso infeccioso se observó después de las 24 h de administración del patógeno en los diferentes tratamientos. Los signos y lesiones característicos de la enfermedad, se detallan en la tabla 6.

Tabla 6.- Signos y lesiones observados en los peces infectados con *A. hydrophila* (10^7 ufc/mL)

Organos afectados	Signos y lesiones observados
Piel	Ulcerada, decolorada, con moco
Escamas	Erosionadas, descamación
Aletas y cola	Hemorrágicas, deshilachadas
Boca	Abierta
Branquias	Hemorrágicas
Ojos	Hemorrágicos, exoftalmia
Cuerpo	*
Apetito	Anorexia
Comportamiento	Pasivo
Nado	Errático
Tubo digestivo	Inflamado
Riñón	Hemorrágico
Hígado	*
Vesícula	*
Vejiga natatoria	Reventada
Corazón	*
Gónadas	*

* No se observó daño

Al efectuarse el análisis estadístico con base en la función canónica discriminante (estandarizada con la varianza), se consideró que los signos de infección que más se desarrollaron por la administración del patógeno fueron: branquias y ojos hemorrágicos, nado irregular y lesiones en la piel (figura 17,18 y 19). Sin embargo, esto sólo sucedió en el tratamiento donde los peces fueron alimentados con *Artemia* sin probiótico y con *A. hydrophila*, a diferencia de lo ocurrido con los peces alimentados con las cepas probióticas, en los cuales no se desarrollaron signos ni lesiones de enfermedad y se mantuvieron sanos hasta la finalización del experimento.

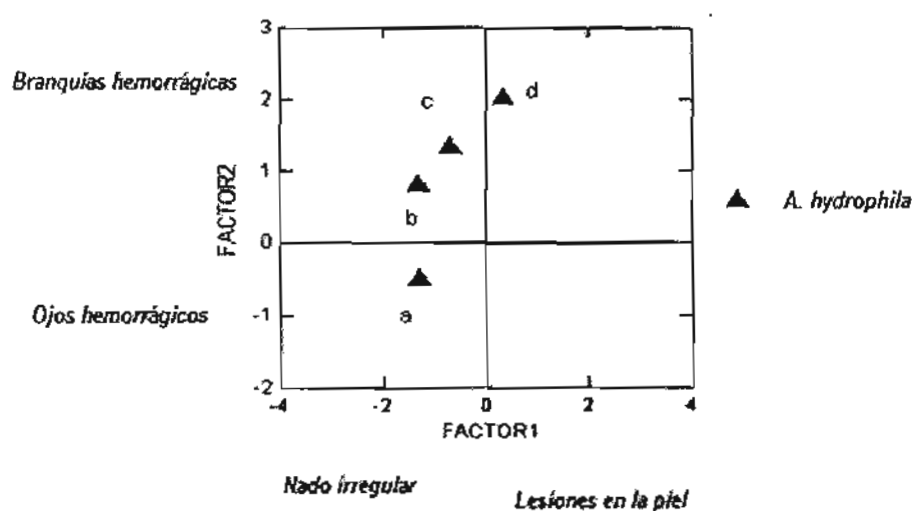


Figura 17. Análisis discriminante del cuadro clínico presentado por *P. scalare*.

* a: Tratamiento de peces no alimentados con probióticos y donde se administro *A. hydrophila*

10^7 ufc/mL,

* b, c, y d: replicas

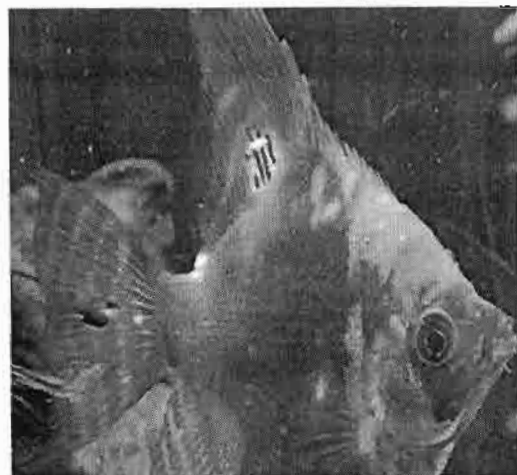


Figura18 y 19.- Peces con signos y lesiones de enfermedad después de la inoculación de *Aeromonas hydrophila*

7.5.2. Sobrevivencia

La inoculación de *A. hydrophila* en los peces ocasionó una mortalidad de más del 90% de los organismos alimentados sólo con *Artemia* sin probiótico. Los peces alimentados con las diferentes cepas probióticas obtuvieron mayor resistencia a la inoculación del patógeno (Figura 20).

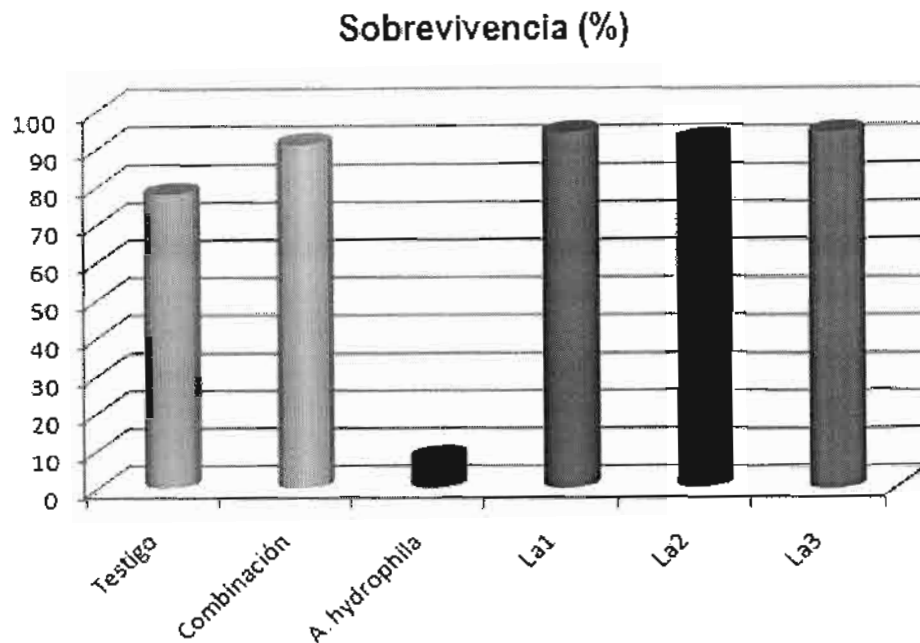


Figura 20. Sobrevivencia de *P. scalare* a la infección con *Aeromonas hydrophila* utilizando cepas probióticas

7.5.3. Recuperación del patógeno

La presencia de *A. hydrophila* se identificó en un 100% de las muestras tomadas en las lesiones producidas durante la infección. La identificación se realizó mediante PCR, donde se obtuvo un fragmento amplificado de 400 pb, el cual correspondió con el control positivo, confirmando así la presencia del patógeno administrado y su relación con el proceso infeccioso presentado por los peces que no fueron alimentados con las cepas probióticas (Figuras 21 y 22).

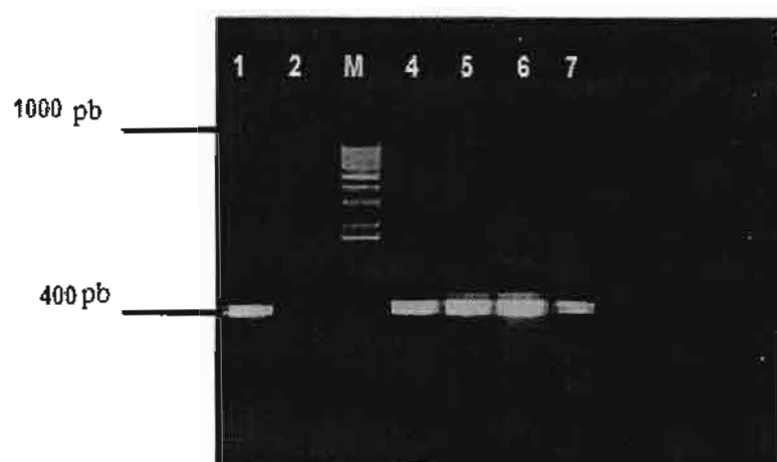


Figura 21.- Identificación de *A. hydrophila* por PCR. 1) control positivo, 2) control negativo, 3) marcador de peso molecular, 4-6) fragmentos amplificados del ADN de *A. hydrophila* aislada de riñón y de la piel.

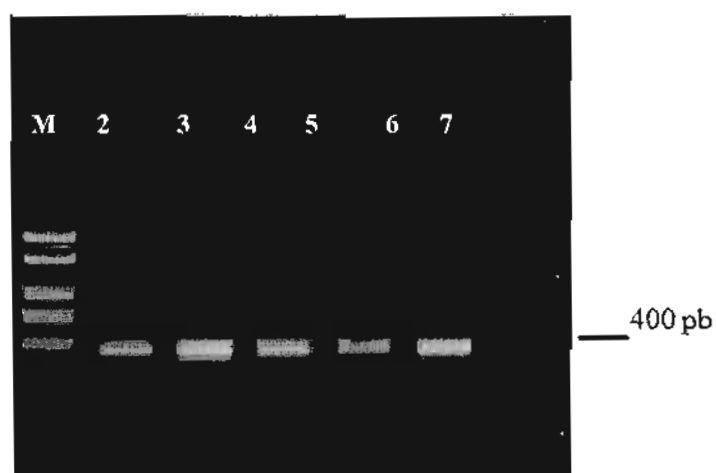


Figura 22.- Identificación de *A. hydrophila* 1) marcador de peso molecular, 2) control positivo, 3y 4) muestras de lesiones de las branquias, 5) muestra de tracto digestivo, 6) muestra de riñón, 7) control negativo

7.6. Identificación molecular de las cepas probióticas aisladas de *P. scalare*

Al comparar las bandas resultantes de la electroforesis de los productos de PCR de las cepas La1, La2 y La3 utilizando los primers 9F y E939R con un marcador molecular de 100 pb se puede observar que el ADN amplificado resultó tener un tamaño aproximado de 850 y 1000 pb en cada cepa (Figura 23).

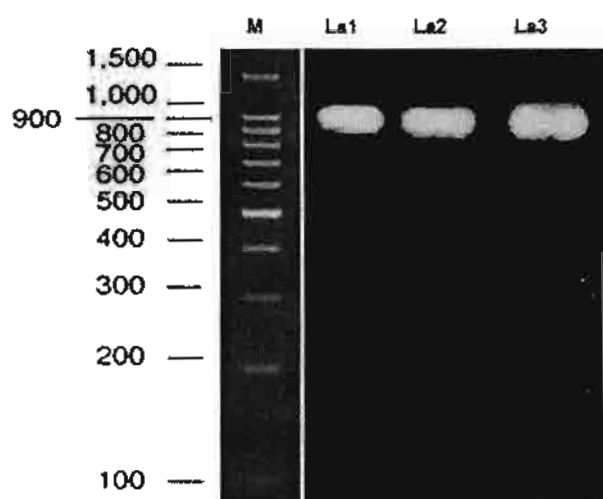


Figura 23.- Comparación de bandas de productos de PCR con los primers universales 9F y E939F de las cepas La1, La2 y La3 con el marcador molecular de 100 pb de Promega™ (M).

La secuencia obtenida del ADN de la cepa La1 constó de 885 pb y resultó tener coincidencia con 22 tipos de *Bacillus sp.* y un tipo de *Acetobacter pasteurianus*, todas con una similitud de 99%. Para La2 la secuencia obtenida de 1051 pb, coincidió con 51 tipos de *Bacillus sp.*, un tipo de *B. anthracis* y de *Acetobacter pasteurianus*, con 99% de similitud en los tres casos. La secuencia de La3 de 1015pb, resultó tener una coincidencia de similitud del 100% con la construcción sintética del clon de *B. anthracis* del gen BA1990 y una coincidencia *B. weihenstephanensis* con 84% (Tabla 7).

Tabla 7. Número de tipos y porcentaje de similitud de las secuencias de nucleótidos de las cepas La1, La2 y La3 con otras especies

Especie	La1	La2	La3
<i>B. thuringiensis</i>	12 tipos 99%	18 tipos 99%	2 tipos 94%-98%
<i>B. cereus</i>	12 tipos 99%	22 tipos 99%	9 tipos 92%-97%
<i>B. anthracis</i>	1 tipo 99%	1 tipo 99%	6 tipos 95%
<i>B. anthracis</i> clon sintético del gen BA1990	-	-	1 tipo 100%
<i>Bacillus sp.</i>	22 tipos 99%	51 tipos 99%	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	-	-	1 tipo 84%
<i>Bacillaceae bacterium</i>	16 98%-99%	-	-

Las relaciones filogenéticas obtenidas mediante la secuencia de La1 la ubican dentro del grupo de los *firmicutes*, entre dos cadenas de *B. cereus* (Figura 24). Por otra parte, las relaciones filogenéticas de La2 la ubican entre una variedad de *B. thuringiensis* y los *firmicutes* (Figura 25). Finalmente La3 se encontra dentro de los *firmicutes*, entre una cadena de *B. anthracis* y más apartada de *B. cereus* (Figura 26).

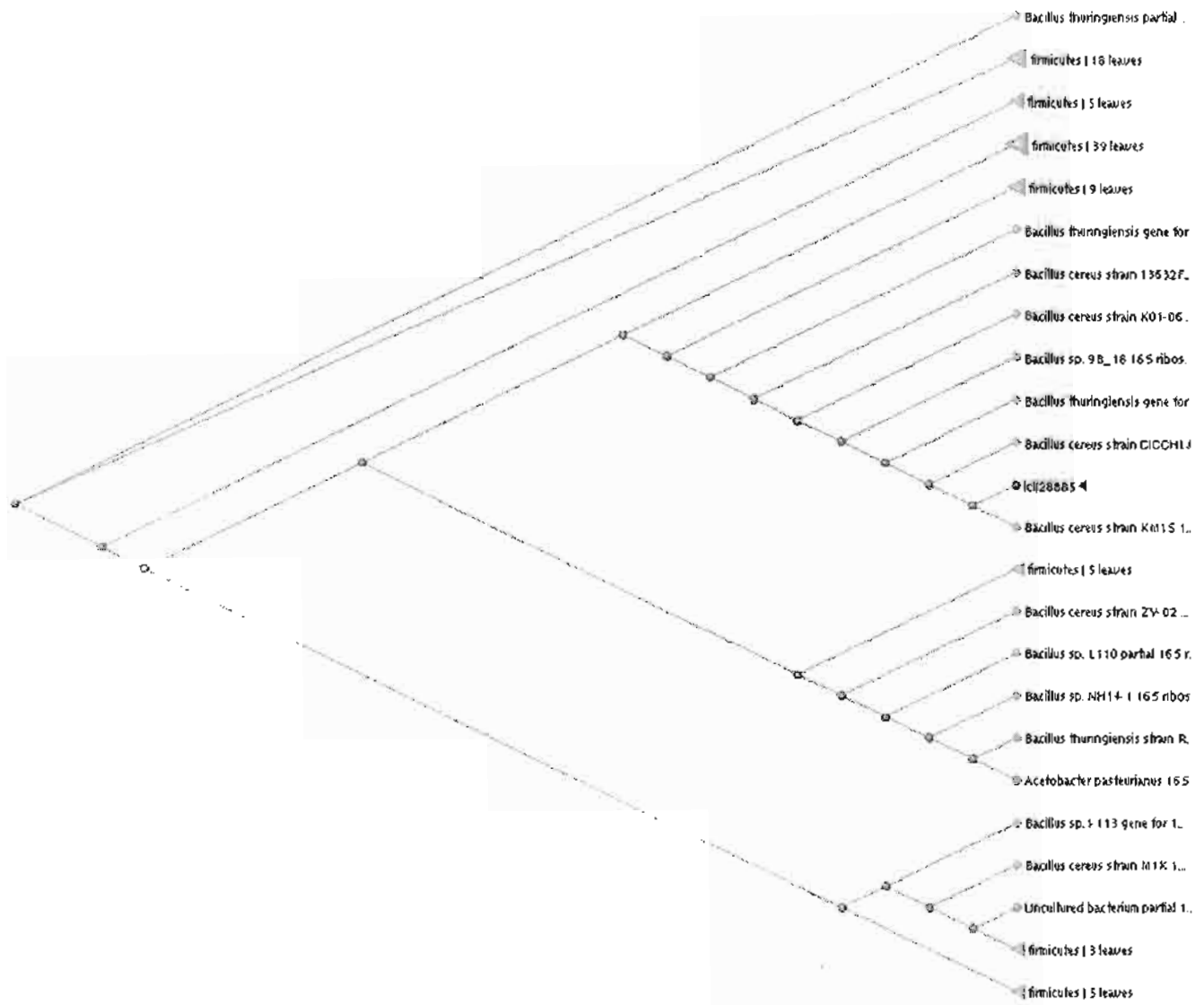


Figura 24.- Árbol filogenético de la cepa La1

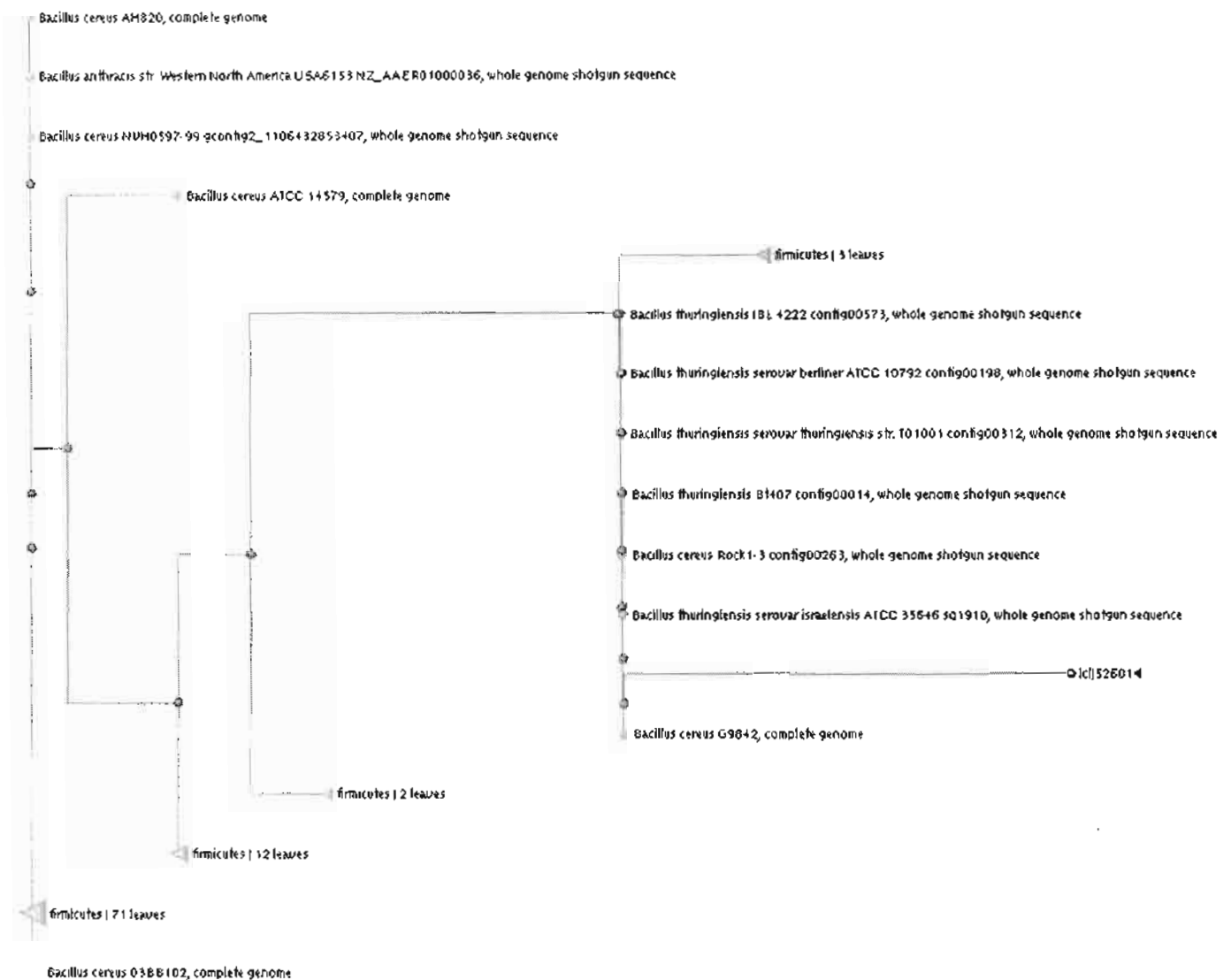


Figura 25. Árbol filogenético de La2

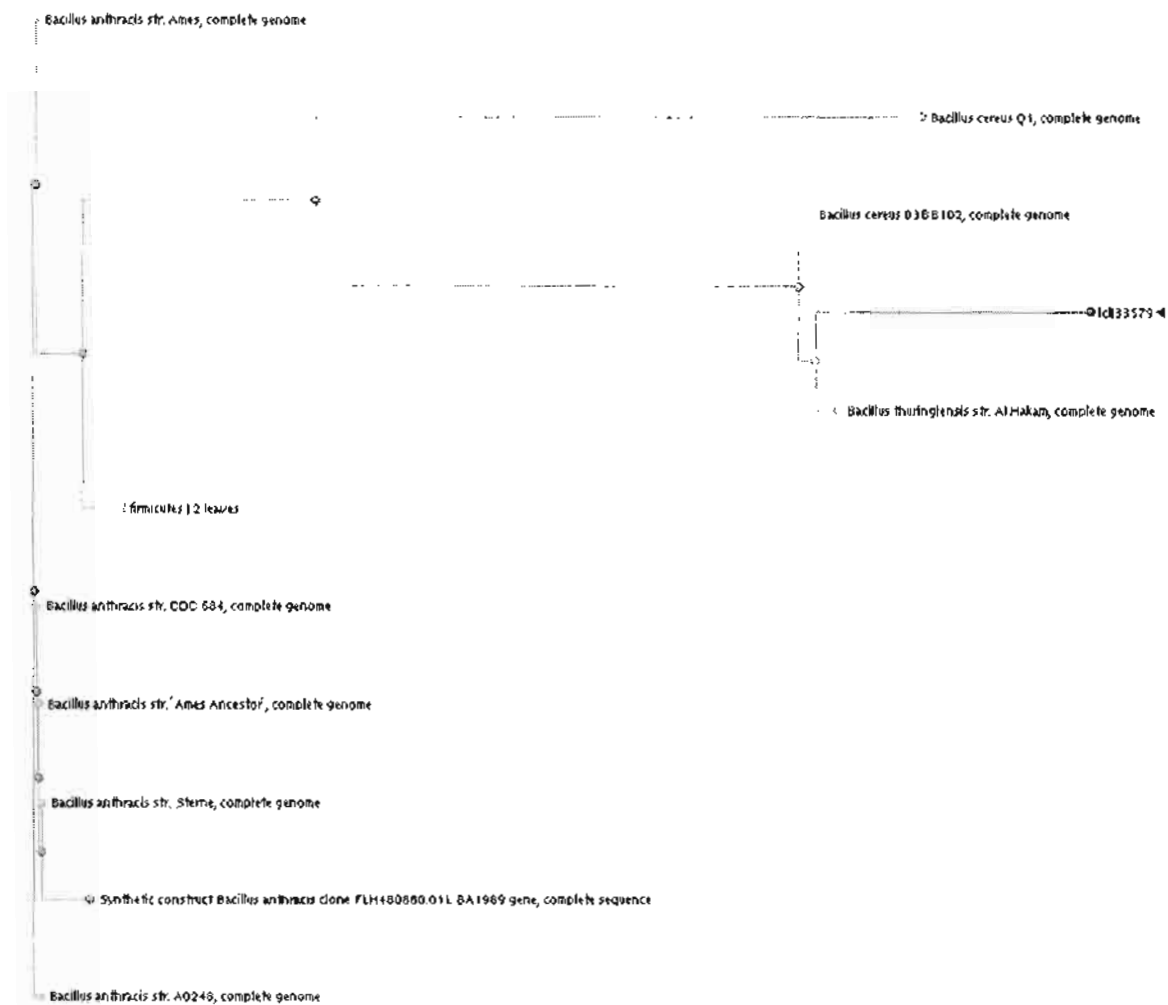


Figura 26. Árbol filogenético de La3

8. DISCUSIÓN

El uso de probióticos en acuicultura se ha intensificado en los últimos años, el aspecto más estudiado ha sido el mejoramiento de la salud de los animales por la inclusión de bacterias benéficas, ya sea en el alimento o en el agua. Sin embargo, uno de los aspectos en lo que aún queda mucho por investigar es la obtención y selección de bacterias probióticas aisladas del propio hospedero, con el fin de minimizar los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos (Gatesoupe, 1999; Duwat *et al.*, 2000; Verschuere *et al.* 2000).

En esta investigación se aislaron 108 cepas bacterianas del tracto digestivo de *P. scalare*, de las cuales el 75% corresponden a bacilos Gram +. Asimismo, se pudo establecer que 20 de las bacterias aisladas crecieron a pH ácido y en presencia de sales biliares, aunque sólo tres cepas de *Bacillus* presentaron una alta colonización del epitelio intestinal y la capacidad de inhibir a *Aeromonas hydrophila*. Estos resultados difieren de otros estudios, como el de Ramirez y Dixon (2003), quienes establecieron la presencia de especies identificadas como *Clostridium* y *Porphyromonas*, sin embargo, el potencial probiótico no fue evaluado. Por otra parte, Lara *et al.* (2006) señalaron que en los peces de agua dulce los grupos dominantes en el tracto gastrointestinal pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pleisomonas* y al grupo de las *Enterobacteriaceae*, aunque también indicaron que existe una gran variación de microorganismos que colonizan el tracto digestivo de los peces, debido a las condiciones ambientales en las que viven y a sus hábitos alimenticios.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el crecimiento de los peces alimentados con las bacterias probióticas aisladas en este estudio, se observó que el aprovechamiento del alimento fue mayor en los peces con los tratamientos en los cuales se les adicionaron las cepas probióticas, sobre todo en el caso de la cepa La3, en el que los peces obtuvieron mayor crecimiento tanto en longitud total, peso y ancho (con casi un 50% de incremento en comparación con el lote testigo y la combinación de cepas probióticas). Estos resultados concuerdan con el estudio de Ghosh *et al.*, (2008), en el cual se reportan diferencias significativas en el crecimiento de peces de ornato de las especies *Poecilia reticulata*, *Poecilia sphenops*, *Xiphophorus maculatus* y *Xiphophorus hellieri*, después de ser alimentados con piensos enriquecido con *Bacillus sp* durante un período de 60 días, en comparación con un tratamiento control sin probiótico.

Una de las características que debe poseer un microorganismo para ser considerado como probiótico es su capacidad para adherirse a la superficie intestinal. En este estudio se pudo establecer mediante el análisis bacteriológico que los tres probióticos suministrados son capaces de colonizar el tracto digestivo de *P. scalare*, aunque hay diferencias en el número de células que se adhieren, lo que se manifiesta claramente a partir del día 30 del experimento, en donde los conteos de la cepa La3 son superiores. A los 45 días y hasta el final del experimento, la cepa La2 es la que obtiene conteos mayores, siendo en promedio de 65 ufc/mL; esto demuestra que la cepa La2 coloniza mejor el tracto digestivo del pez y que va a prevalecer mientras se continúe administrando este probiótico. Otros trabajos realizados con organismos acuáticos han mostrado también que al suministrar

diferentes cepas de probióticos, siempre habrá alguna cepa que domine ó varíe su cantidad de células a través del tiempo, aunque todas ellas tengan la capacidad de colonizar el hospedero (Gildberg *et al.*, 1997; Ringo y Vadstein,1998; Ringo y Olsen,1999; Rengpipat *et al.*,2000; Nikoskelainen *et al.*,2003; Gullian *et al.*, 2004; Macey y Coyne 2006).

En cuanto a la persistencia de los probióticos en el tracto digestivo del pez, después de haberse suspendido el suministro del alimento con los probióticos se observó que la cepa La3 permaneció con mayor cantidad de células hasta la décima semana. La presencia de los probióticos en las heces después de 10 semanas de haber suspendido su administración, manifiesta su alto poder de colonización. En comparación con estudios efectuados en otros organismos acuáticos, como el molusco abulón, se observó un descenso muy marcado de células probióticas al primer y segundo día después de haber cesado el aporte de probióticos en el alimento, mostrando en sus heces a los 15 días cantidades muy bajas de estas células (Macey y Coyne 2006).Posiblemente este descenso de células probióticas en el abulón se deba a que es un organismo filtrador.

Diversos estudios han demostrado la capacidad de diferentes microorganismos para mejorar la sobrevivencia en el cultivo de los peces (Gatesoupe, 1994; Gullian *et al.*, 2004; Venkant *et al.*, 2004; Bagheri *et al.*, 2008). De acuerdo con el presente trabajo, el uso de las cepas probióticas La1, La2 y La3, utilizadas de forma individual o de forma combinada, mejoran notablemente la sobrevivencia de este cíclido, aun cuando se inocule con *A. hydrophila*, mostrando el pez en estos casos una mayor resistencia a la presencia del patógeno (sobrevivencia del 100% en los tratamientos

que se utilizaron las cepas probióticas en comparación con el grupo testigo, que mostro una sobrevivencia del 8%). Estos resultados son mejores que los obtenidos por Martinez *et al.* (2008) quienes infectaron tilapias con diferentes patógenos, estableciendo que después del desafío con bacterias patógenas, la mayor sobrevivencia se obtuvo en los tratamientos en los que se suministró el suplemento de *Bacillus sp.* y *Lactobacillus casei* (86.67 %), seguidos por los tratamientos con *Bacillus pumilus* (80 %) y *Lactobacillus acidophilus* (73.33 %). En este caso, la sobrevivencia registrada en el tratamiento al que no se suministraron las bacterias, fue del 53.33 %. Los autores concluyeron que las cuatro bacterias estudiadas poseían alto potencial para su uso como probióticos en el cultivo de Tilapia (*Oreochromis niloticus*), debido a su capacidad para mejorar la sobrevivencia durante infecciones bacterianas, lo que podría asociarse posiblemente al incremento en los niveles de defensa innatos de la tilapia. En investigaciones sobre uso de probioticos para la exclusión de patógenos en acuicultura, Aly *et al.*, 2008, reportaron la exclusión de *Aeromonas hydrophila* por *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus acidophilus* en tilapia nilotica.

Pocos estudios, se han hecho respecto al uso de cepas probióticas específicas para peces de ornato. Esta investigación presenta avances significativos sobre el empleo de bacterias, con capacidades probioticas, aisladas del tracto digestivo de *P. scalare*; el cual es de gran importancia comercial y que se ha visto afectado por procesos infecciosos en los que frecuentemente se han aislado *A. hydrophila*, la cual es habitante común en cultivos en agua dulce (Cipriano *et al.* 1984; Dixon e Issvoran, 1993, Baez *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos de la identificación molecular, ubican a las cepas bacterianas La1, La2 y La3 dentro del género *Bacillus*. Si bien existen trabajos del uso de bacterias de este género como probióticos, no se tienen reportes de su aislamiento del tracto digestivo de peces, salvo el trabajo de Gullian *et al.*, (2004) donde se menciona la presencia de este género en el camarón (*Penaeus vannamei*). Por otra parte, el uso de primers universales como el caso de 9F y E939R del gen ADNr 16s demostró ser adecuado para la amplificación de un segmento del ADNr 16s de las cepas desconocidas. Estos resultados concuerdan con los de Heyndrickx *et al.* (2004) y Rodicio y Mendoza (2004). El análisis de la secuencia de los ADNr 16s de distintos grupos filogenéticos revela la presencia de una o más secuencias características, que se denominan oligonucleótidos firma, secuencias cortas y específicas que aparecen en todos (o en la mayor parte) de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (u ocasionalmente) están presentes en otros grupos (incluidos los más próximos). Sin embargo; a pesar de que las tres cepas fueron ubicadas con certeza dentro del género *Bacillus* no se pudo identificar a ninguna, a nivel de especie, debido a las variaciones que se encontraron en las secuencias de las tres cepas con respecto a secuencias de especies conocidas. Esto concuerda con lo reportado por Woo *et al.* (2008), quienes explican que esto puede ocurrir como una limitante del aislamiento del ADNr 16s, ya que cuando dos diferentes especies bacterianas comparten casi toda la secuencia de ADNr 16s, esta técnica no es muy útil para distinguir entre las dos y se obtiene con certeza sólo el género.

Una forma de obtener mayor especificidad en la identificación de las cepas La1, La2 y La3 sería secuenciar el gen completo, esperando que con dichos resultados sea posible la construcción de la filogenia de estas cepas. Mientras tanto, sólo se puede afirmar que las cepas La1, La2 y La3 corresponden al género *Bacillus*, debido a las variaciones que se encontraron en las secuencias de las tres cepas con respecto a secuencias de especies conocidas hasta la fecha. Estos resultados hacen suponer la posibilidad de que se trate de especies no identificadas con anterioridad, ya que no existe información de su aislamiento en muestras del tracto digestivo de los peces.

La secuencia genética obtenida de las cepas probióticas aisladas de *P. scalare*, sólo nos permitió ubicar a estas bacterias dentro del género *Bacillus*, ya que no se pudo identificar a ninguna a nivel de especie debido a las variaciones que se encontraron en las secuencias de las tres cepas con respecto a secuencias de las especies conocidas hasta la fecha. La cepa La1 resultó tener coincidencia con *Bacillus* sp.; La2 coincidió con *Bacillus subtilis* con 99% de similitud; La3 resultó tener una similitud del 100% con la construcción sintética de un clon del gen BA1990 de *B. anthracis*. Estos resultados hacen suponer la posibilidad de que se trate de especies no identificadas con anterioridad.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente

- Las tres cepas de *Bacillus* (La1, La2 y La3) presentaron alta colonización en el epitelio intestinal y capacidad de inhibir a *Aeromonas hydrophila*
- El aprovechamiento del alimento fue mayor en los peces con los tratamientos en los cuales se les adicionaron las cepas probióticas
- La cepa La3, promovió que los peces obtuvieron mayor crecimiento tanto en longitud total, peso y ancho (con casi un 50% de incremento en comparación con el lote testigo y la combinación de cepas probióticas
- La cepa La2, coloniza mejor el tracto digestivo del pez y va a prevalecer mientras se continúe su administración
- La cepa La3, permaneció con mayor cantidad hasta la décima semana después de haberse suspendido el suministro del probiótico.
- Los probióticos colonizaron la parte anterior del tracto digestivo del pez.
- Aunque en otros estudios se manifiesta que la combinación de probióticos proporciona mejores resultados en el bienestar de los organismos, en este trabajo se observó que la combinación no mostró resultados mejores que los obtenidos con las cepas utilizadas de manera individual.

- El uso de las cepas probióticas La1, La2 y La3, utilizadas de forma individual o combinada, mejoran notablemente la sobrevivencia de *P.scalare*, aun cuando se inocule con *A. hydrophila*
- La identificación molecular, ubica a las cepas bacterianas La1, La2 y La3 dentro del género *Bacillus*

10. Recomendaciones

- Aunque el análisis molecular ubicó a las tres cepas dentro del género *Bacillus*, es recomendable secuenciar el gen completo para especificar la identificación hasta nivel de especie.
- Si bien los resultados mostraron que las cepas La1, La2 y La3, tienen efectos probióticos es recomendable realizar estudios para identificar las bacteriocinas o biocinas que les proporcionan la capacidad antibiótica.
- De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda que las bacterias utilizadas como probióticos, en la acuicultura sean aisladas de la especie de interés ya que provee mejores beneficios que el utilizar probióticos aislados del ser humano o de otros mamíferos

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aly, M.S., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., Mohamed, F. M. 2008.** Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shells Immunology 25, 128-136.
2. **APHA, 1992.** Standard methods for examination of water and waste-water. 17th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 1011 pp.
3. **APPOEM. 2000.** Asociación productora de peces de ornato del Estado de Morelos. Curso sobre sanidad acuícola en las granjas de peces de ornato del Edo. de Morelos. Agosto del 2000. Morelos. México.
4. **Argudelo, G. D. A. A. 2005.** Establecimiento de un centro reproductor de *Pterophyllum scalare* (pez ángel o escalar). Revista Lasallista de Investigación. 2 (2). Colombia. 26-30 pp.
5. **Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., Griffith, D. R. W. 1995.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases 18: 93-96.

6. **Baez, H. R., Magi, G. E., Balboa, S., Barja, J. L., Romalde, L. 2008.** Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *ftA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology* 128: 3386-3394.
7. **Bagheri, T., Aliakbar, S. H., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, Ali. 2008.** Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8: 43-48.
8. **Balcázar, J. L. 2002.** Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, CIVA 2002.
9. **Balcázar, J., Blas, I., Ruiz- Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J. 2006.** The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173-186.
10. **Barja, J. L., Estévez, T. 1998.** Enfermedades bacterianas de peces. Departamento de microbiología y parasitología. Universidad de Santiago. 475-477pp.
11. **Beleneva, A, 2008.** Distribution and characteristics of *Bacillus* bacteria associated with hydrobionts and the waters of the Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Microbiology* 77:497-503.

12. **Bravo, F.L., Cabrera, R. L. E., Rodríguez, M.M., Hernández, L.A., Verdecia, P. J., Borrego, G., Fernández, A. A. 2007.** Resistencia antimicrobiana en cepas de *Aeromonas spp.* Aisladas de pacientes con bacteriemia. Revista Biomédica 2007.18:176-181.
13. **Briones, F. P., Lozano, A. E. 2003.** Factors affecting growth of the spiny lobster *Palinurus gracilis* and *Palinurus inflatus* (Decapoda: Palinuridae) in Guerrero, México. Revista de Biología Tropical 51: 165-174.
14. **Burr, G., Gatlin, D. 2005.** Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finfish Aquaculture. Journal of the Aquaculture Society. 36(4): 425-435.
15. **Cabello, F.C. 2004.** Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. Revista Médica de Chile. 132: 1001-1006.
16. **Campaña, T. A., Virrareal, C., Civera, C., Martínez, C. L. R. 2003.** Efecto del nivel proteico de la dieta sobre el desarrollo de juveniles de la langosta australiana *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). Revista Biología Tropical 51: 749-752.
17. **Casas, I., Dobrogosz W.J. 2000.** Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus casei* confers broad spectrum protection against disease in humans and animal. Microbial Ecology of Health Disease 12: 47-285

18. **Castro, M. G., Castro, M. J., Castro, B. T., Estrada, Z. A. y García, C. V. 2005.** Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. Revista ContactoS. Núm. 58:49-53.
19. **Cházaro, F., Niembro 2001.** Informe del programa de pesca y acuicultura 1995-2000. Instituto Nacional de la Pesca. México, D. F. 322 p
20. **Cipriano, R. C., Bullock, L., Pyle, S. W. 1984.** *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemia of U.S. Fish and Wildish Service, Fish Diseases Leaflet 68, 215-234.
21. **Cipriano, R.C. 2001.** *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. U.S. Geological Survey, Leetown Science Center, National Fish Health Research Laboratory 11700 Leetown Road, Kearneysville, West Virginia 25430. 43 pp.
22. **Decamp O, D. Moriarty, 2006.** Aquaculture species profit from probiotics. Feed Mix 15: 20-23.

23. **Dixon, B. A., Issvoran, G. 1993.** Antibacterial drug resistance in *Aeromonas spp.* isolated from domestic golds and Koi from California. Journal World Aquaculture Society 24, 102-104.
24. **Duwat, P., Cesselin., B. Sourrice, S., Gruss, A. 2000.** *Lactococcus lactis* a bacteria model for stress response and survival, International Journal of Food Microbiology. 55: 83-86.
25. **Esteve, C., Valera, L., Gutiérrez, C., Ventosa, A. 2003.** Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *A. jandaei* Carnahan *et al.* 1992. International Journal Systematic and Evolution Microbiology 53, 1411–141.
- Fuentes, R. J. M. and H. J. A. Pérez. 1998.** Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Veterinaria Mexico. 29: 117 - 119.
26. **Fuller, R. 1997.** Probiotics 2: Applications and practical aspects. Fuller, Ed, London: Chapman & Hall.
27. **García, M., Gómez, R. H. J. 2005.** Growth of angel fish *Pterophyllum scalare* (Gunther, 1862) juveniles fed inert diets. Avances en Investigación Agropecuaria. Vol. 9, número 003. 49-59.

28. **Garriques, D., Arévalo G. 1995.** An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Pennaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C. y Hopkins, J. (Eds.), Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. pp. 53-59.
29. **Gatesoupe, F. J. 1994.** Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. Aquatic Living Resource 7: 277–282.
30. **Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165.
31. **Gatesoupe F.J. 2002.** Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. Aquaculture 212: 347-360.
32. **Gelabert, R. 2001.** *Artemia* bioencapsulation I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. Journal of Crustacean Biology. 21(2): 435-442.
33. **Ghosh, S., Sinha, A. & Sahu, C. 2008** Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. Aquaculture. Nutrition. 14, 289–299.

34. **Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringø, E. 1997** Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352, 279-285.
35. **Gómez, G. B., Roque, A. 1998.** Selection of probiotic bacteria for use in aquaculture. pag 174 in T.W. Flegel, TW editor. *Avances in Shrim Biotechnology. Proceeding to the Special Session on Shrimp Biothechnology 5th Asian Fisheries Forum* Chiangmai, Tailand.
36. **Gómez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J. F. 2000.** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
37. **Gómez, M. J. L., Peña, M. B., Salgado, U. I., Arroyo, G. 2003.** Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Percoformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, México. *Revista Biología Tropical* 51: 221-228.
38. **Gullian, M. 2001.** Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias prebióticas asociadas al cultivo de *Pennaeus vannamei*. Tesis de Magister en Ciencias, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
39. **Gullian, M., Thompson, F. y Rodríguez, J. 2004.** Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect on *Pennaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14

40. **Harikrishnan, R., Balasundaram, C. 2005.** Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with sh. Reviews in Fisheries Science 13, 281- 320.
41. **Hayes, P.R. 1993.** Microbiología e higiene de los alimentos. Acribia. Zaragoza.
42. **Heyndrickx, M., Logan, N. A., Lebbe, L., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Goris, J., Scheldeman, P., De Vos, P. 2004.** *Bacillus galactosidilyticus* sp. nov., an alkali-tolerant, β -galactosidase producer. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54, 617–621.
43. **Hong, H., Duc, L., Cutting, S. 2005.** The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews 29: 813- 835.
44. **Lara, F.M., Briones, L., Olvera, N.M. 2002.** Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: Avances en Nutrición Acuicola. V, Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola (Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G. & Simoes, N. eds), pp. 314–335. Cancun, Quintana Roo, México.
45. **Legar, P.H., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P. 1986.** The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanography. Marine Biology Annual Review. 24:521-623.

46. **Macey, B.M., Coyne, V.E. 2006.** Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed South African abalone *Haliotis midae* by the probionts *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Marine Biotechnology* 8:246–259
47. **Mañón, Z.C.S. 2008.** Reproducción del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae) Lichtenstein, 1823. XIX Congreso de Investigación CUAM. 23pp.
48. **Marks, J. 1995.** Angelfish Factory breeding freshwater angelfish for fun and profit. *Aquarium Fish Magazine*, 7 (11): 36-47.
49. **Martinez, A.D., Mora, J.L., Moller, N.O. 2008.** Diseases of *Oncorhynchus mykiss* and Immune enhancement by probiotics. *Fish and Shellsh Immunology* 16, 425-452.
50. **Martinez- Murcia, A. J., Benlloch, S., Collins, M. D. 1992.** Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16Sr DNA sequencing: Lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* .54.1511-1519.
51. **Metchnikoff, E. 1907.** In: The prolongation of life: optimistic studies, Ed. Chalmers Mitchell. London, William Heinemann.

52. **Miyamoto, Y. Nakamura, K., Takizawa, K. 1961.** Pathogenic halophiles. Proposals of a new genus "*Oceanomonas*" and of the amended species names. Japanese Journal of Microbiology. 1961. 5: 477-486.
53. **Moriarty, D. 1999.** Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. 237-243. En: Bell, C. R., M. Brylinsky y P. Johnson-Green (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
54. **Neal, T. 1995.** Angelfish here, there and everywhere. Tropical Fish Hobbyist, 6: 86-98.
55. **Nirchio, M. 2002.** *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the view from here. Microbiology and Molecular Biology Review 65 (1): 22-31.
56. **Negrete, R. P., Romero J. J. 1998.** Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícola en los estados de México y Morelos. Hidrobiológica. 8:43 – 54.
57. **Negrete, R. P., Romero. J. J. 1999.** Presencia de bacterias patógenas de peces de ornato Hidrobiológica 9:85- 94.

58. **Negrete, R. P., Romero, J. J., Valencia, J. D., Villegas, L. G. 2002.** Bacteriosis por estrés ambiental en granjas acuicola rurales del Estado de México. Sociedades Rurales Producción y Medio Ambiente.3: 49-58.
59. **Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunology. 15, 443-452.
60. **OIE. 2000.** Código Sanitario Internacional para animales acuáticos 3a Edición. Organización Internacional de Epizootias. Francia. 226pp.
61. **Ortega, S. A. A, Cortés, I. G., Bustamante, H. R. 2009.** Fecundity, growth, and survival of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichlidae) under laboratory conditions. Revista. Biología Tropical. Vol. 57 (3): 741-747.
62. **Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M. N. 1997** Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Applied and Environmental Microbiology 63,(5). 1725-1731.
63. **Ramírez, R. y Dixon, B. 2003.** Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterpphyllum scalare*) and Sounder flounder (*Paralichthys lethostigma*) Aquaculture 227: 417-426.

64. **Rengpipat, S., Rukpratanpom, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 2000.** Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus SII*). *Aquaculture* 191: 271-288.
65. **Ringø, E. and Vadstein, O. 1998** Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology* 84, 227-233.
66. **Ringø, E., Olsen, R.E., 1999.** The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology* 86, 22-28.
67. **Riquelme, C., Araya, R., Escibano, R. 2000.** Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*. 181: 25-36.
68. **Rodicio, M., Mendoza, M. 2004.** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(4):238-45
69. **Rodriguez, J. y Le Moullac, G. 2000.** Stage of the art of immunological tool and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.

70. **Ruiz, R. T., Deturnell, C. 2000.** El Análisis discriminante en estudios biológicos. Revista Biología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana Cuba. 14(1):45-54
71. **Shome, R., Shome, B. R. 1999.** A typical chronic form of *Aeromonas hydrophila* infection in Indian major carp, *Catla catla* , from Andaman. Current. Science. 76, 1188–1190.
72. **Soriano, S. M. B., Hernández, O. D. 2002.** Tasa de crecimiento del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes: cichlidae) en condiciones de laboratorio. Acta Universitaria. 12(002):28-33.
73. **Sørum, H., Holstad, G., Lunder, T., Hastein, T. 2000.** Grouping by plasmid profiles of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from fish, with special reference to salmonid fish. Diseases Aquatics Organisms. 41:159-171.
74. **Sumawidjaja, E., Eidman, M., Hardosjoworo, S., Anka, L. 2001.** Hemorrhagic disease of fish: epizootic report of the team for disease control. Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesia, 1 - 115.
75. **Todar, K. 2004.** Textbook of Microbiology. Science Magazine. 304: 421 pp.

76. **Vázquez, J. A., González, M. P., y Murado, M. A. 2005.** Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245: 149-161.
77. **Venkant, K., Sahu, P., Jai, N, K. 2004.** Effect of feeding *Lactobacillus*- based probiotic on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35: 501-507.
78. **Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents. *Microbiology. Molecular. Biology. Review.* 64: 655–671 p.
79. **Vine, G., Leukes, W., Kaiser, H. 2006.** Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews.* 30 (3) 404-427.
80. **Woo, P. C., Lau, K.H., Yip, S.K., Fung, K.T., Leung, A. M. 2008.** Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 1996-2001.
81. **Zilberg, D., Ofira, R., Rabinskib, T., Diamantc, A. 2004.** Morphological and genetic characterization of swimbladder non-inflation in angelfish *Pterophyllum scalare* (Cichlidae) *Aquaculture.* 230: 13–27.

ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS

Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas

María del Carmen Monroy Dosta¹, Talía Castro Barrera¹,
Francisco José Fernández Perrino² y Lino Mayorga Reyes³

Recibido: 12 de marzo de 2009

Aceptado: 15 de abril de 2009

Resumen

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas. Debido al creciente interés, sobre la obtención de microorganismos benéficos productores de sustancias antagonistas para su aplicación en la industria alimentaria, en la producción animal y recientemente en el campo acuícola, el objetivo de esta revisión es dar un panorama general del conocimiento que se tiene sobre las bacteriocinas, su modo de acción y aplicación.

Palabras clave: bacterias, bacteriocinas, probióticos.

Abstract

Bacteriocins are peptidic substances with antimicrobial activity, produced by different bacterial strains. Due to the growing interest on the obtaining of beneficial microorganisms producers of this antagonistic substances for the application in the alimentary industry and in the animal production, the objective of this review is to give a general view of the current knowledge on the bacteriocins, way of action, and application.

Key words: bacteria, bacterocin, probiotics.

Introducción

Durante los últimos 20 años el uso de probióticos en diferentes campos productivos y de investigación se ha generalizado, esto debido al efecto que han demostrado tener en la prevención de enfermedades tanto en el ser humano como en muchas especies

de animales, así como su uso en la conservación de alimentos, siendo una alternativa para contrarrestar el uso de químicos y antibióticos en la alimentación (Galvin *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2001).

El uso de probióticos y el efecto de manipular la microflora intestinal fue inicialmente observado por Mechnikoff (1907), quien reportó los efectos benéficos de las bacterias productoras de ácido láctico en la prevención y tratamiento de enfermedades intestinales (Guarner y Malagelada 2002).

La interacción entre la cepa probiótica y la microflora intestinal puede basarse en la competencia con bacterias patógenas por sitios de adhesión a los receptores epiteliales, por nutrientes y a la producción de sustancias específicas como son las bacteriocinas (Rodríguez y Le Moullac, 2000; Rengpipat *et al.*, 2000; Simon, 2005; Vázquez *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas producidas por diferentes bacterias probióticas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos (Fernández, 2005). Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y recientemente ha surgido un interés sobre su aprovechamiento en la producción de organismos acuáticos.

La intensificación de la actividad acuícola y la falta de control del comercio internacional de los organismos acuáticos vivos y de los productos derivados de éstos ha provocado la movilización de una gran cantidad de patógenos que en condiciones ambientales diferentes pueden ocasionar problemas infecciosos causando graves pérdidas económicas (Verschuere *et al.*, 2000; Quintana, 2001).

¹Laboratorio de Alimento Vivo, Depto. El Hombre y Su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960, México D. F. e-mail: monroydosta@hotmail.com.

²Depto. de Biotecnología, UAM-I, Av. San Rafael Atlixco 186 Colonia Vicentina C. P. 09340 México D. F.

³Depto. de Sistemas Biológicos, UAM-X

Para controlar las enfermedades en los cultivos se han usado compuestos químicos y antibióticos de manera indiscriminada. Esta práctica ha provocado el incremento en la presencia de plásmidos resistentes a dichos compuestos (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2004; Venkant *et al.*, 2004).

Ante esta problemática, en la actualidad las investigaciones en el campo acuícola se han encaminado hacia el uso de probióticos, como una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de microorganismos patógenos, mejorar el rendimiento en los cultivos de peces y crustáceos así como erradicar el uso de antibióticos. Sin embargo es escaso el conocimiento de los mecanismos de acción de los probióticos que se están utilizando y de las bacteriocinas que producen. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica sobre las bacteriocinas producidas por bacterias probióticas, sus principales características y el efecto de éstas en la prevención de la enfermedad, lo que indudablemente permitirá una mejor aplicación y uso de estos microorganismos en la acuicultura.

Características de las Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Papagianni, 2003; Joerger, 2003; Katikou, 2005; Motta *et al.*, 2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eijssink *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2008).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas (Ennahar *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Joerger, 2003). Se piensa que el 99 % de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Gordon y O'Brien, 2006). Las halobacterias por ejemplo, miembros del dominio Archaea, producen su propio tipo de bacteriocinas, las halocinas (Joerger, 2003). Los microorganismos invierten una gran proporción de energía para la produc-

ción y elaboración de mecanismos antimicrobianos, sin embargo aún, no se sabe mucho de cómo la diversidad de estas sustancias aumenta y cuál es la función que desempeñan en las comunidades microbianas, por lo que estas moléculas han servido como modelo para tratar de responder algunas preguntas evolutivas y ecológicas (Gordon y O'Brien, 2006).

La primera descripción de actividades relacionadas con las bacteriocinas se publicó hace más de ochenta años, cuando se descubrió un antagonismo entre cepas de *Escherichia coli*. Originalmente, estas sustancias fueron llamadas colicinas (Riley y Wertz, 2002). En el caso de las bacterias ácido-lácticas las primeras observaciones comenzaron en 1928, cuando se describió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibidor del crecimiento de otras BAL y potencialmente podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso (Cotter *et al.*, 2005). En 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que posteriormente se denominó nisina (Riley y Wertz, 2002). La nisina es por tanto la bacteriocina que tiene un historial más largo de uso seguro en alimentación y la que ha sido más estudiada. En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Unión Europea; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana (Cotter *et al.*, 2005).

Bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas

Las bacterias ácido-lácticas ó bacterias lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de un metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos, carecen de citocromos y catalasa *sensu stricto* y poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol %. Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloio-*

coccus, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Cintas et al., 2001; Rojas y Vargas, 2008). Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en habitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas et al., 2000). Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales (Cintas et al., 2000).

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población (Joerger, 2002; Ogunbanwo et al., 2003) (Driender et al., 2006; Millete et al., 2008).

Es importante mencionar que las bacterias ácido-lácticas son también los microorganismos más utilizados como probióticos no sólo en el ser humano sino en mamíferos y muy recientemente en los peces y crustáceos (Garriques y Arévalo, 1995; Gómez-Gil et al., 2000; Briones y Lozano, 2003; Campaña et al., 2003). Los estudios efectuados con BAL han reportado efectos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y eliminación de patógenos de los organismos acuáticos: sin embargo, la gran diversidad de compuestos inhibidores producidos por las bacterias ácido-lácticas, como las bacteriocinas, requieren de rigurosos estudios sobre el modo de acción de estos compuestos sobre otros microorganismos en condiciones ambientales diferentes a las de su origen, ya que en la mayoría de los casos se han utilizado cepas aisladas del ser humano o de mamíferos y están siendo comercializadas y utilizadas en acuicultura y, a la fecha, no se cuenta con reportes sobre el tipo y efecto de estos compuestos en acuicultura (O'Sullivan et al., 2002).

Tabla 1. Algunos ejemplos de BAL y bacteriocinas que producen (Castellano et al., 2008)

Microorganismo productor	Bacteriocina
<i>L. lactis</i> WNC20	Nisina Z Ia
<i>L. sakei</i> 148	Lactocina S
<i>L. sakei</i> L45	Lactocina S
<i>L. sakei</i> LTH673	Sakacina K,
<i>L. sakei</i> 1151	Sakacina P
<i>L. sakei</i> Lb706	Sakacina A
<i>L. sakei</i> CTC494	Sakacina K
<i>L. brevis</i> SB27	Brevicina 27
<i>L. curvatus</i> LTH1174	Curvacina A
<i>L. curvatus</i> FS47	Curvaticina FS47
<i>L. curvatus</i> L442	Curvaticina L442
<i>L. plantarum</i> CTC305	Plantaricina A
<i>L. carnosum</i> TA11a	Leucocina a
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocina PA
<i>P. acidilactici</i> L50	Pediocina L50
<i>P. pentosaceus</i> Z102	Pediocina PA-1
<i>C. piscicola</i> LV17B	Carnobacteriocina B2*
<i>C. piscicola</i> V1	Piscicocina v1a *
<i>C. piscicola</i> LV17A	Carnobacteriocina *
<i>C. piscicola</i> JG126	Piscicolina 126 l *
<i>C. piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocina B1/B2*
<i>C. divergens</i> 750	Divergicina 750
<i>C. divergens</i> LV13	Divergicina A

* Microorganismo aislado del tracto digestivo de peces

Clasificación de las bacteriocinas

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman et al., (2003).

Clase I: Lantibióticos - Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos poli cíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

Clase I A: Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lan-

tibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

Clase II: No lantibióticos.- bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases.

Clase II a: Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase II b: Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

Clase II c: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofiliquina A y lactacinas A y B.

Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).

Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gaseicina A.

Bacteriocinas representativas

Nisina

La nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con

la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Maldonado y Llanas, 2007).

La nisina es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones postraduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z (Sangronis y García, 2007).

La nisina es ácida por naturaleza por lo que es estable en condiciones ácidas; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH. Se demostró que la nisina es rápidamente inactivada en el intestino por las enzimas digestivas y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga (Simova *et al.*, 2006).

Pediocina

Es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidolactic* es utilizada como conservador en productos vegetales cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria*. Dada su alta actividad contra especies de *Listeria* esta bacteriocina tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos (Fernández, 2005; Wirawan *et al.*, 2007).

Plantaricinas E/F y J/K

Son bacteriocinas del grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes, existen un sin número de reportes que asocian a la existencia de plásmidos para la producción de esta bacteriocina. (Mourad, 2007).

Divergicina A

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un

Tabla 2. Principales Bacteriocinas y microorganismos productores utilizados en la industria (Mess, 2003).

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> 9B4
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

péptido señal. Con un peso molecular de 4.6 kDa, la divergicina A es un péptido pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable. A diferencia de las bacteriocinas de la clase II que tienen un sitio de rompimiento característico Gli-Gli, esta bacteriocina posee en su extremo N-terminal un sitio de rompimiento Ala-Ser-Ala y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula (Maldonado y Llanas, 2007).

Helveticina J

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados. La bacteriocina presenta actividad antibacterial contra especies relacionadas. Es una proteína de 37 kDa termolábil (30 min a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el DNA cromosomal. Poco se conoce de las características bioquímicas de la bacteriocina y de su modo de acción (Cintas et al. 2001).

Modo de acción de las bacteriocinas

La acción de las bacteriocinas está determinada por composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Recientemente se considera también la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria (Cintas et al., 2001; Heerklotz et al., 2004).

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bac-

teriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la nisina, extremo N-terminal de la pediocina); después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal (Moll et al., 1999) y en el caso de la pediocina, a través de su α -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar et al., 2000). De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Muy probablemente debido a vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula (Bizani et al., 2005). Otro aspecto importante es la inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular, como un mecanismo secundario de estos péptidos antimicrobianos (Brötz y Sahl 2000).

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos va a tener distintos comportamientos, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros, son resistentes a la acción de estos compuestos, incluso una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina. De estos mismos microorganismos algunos pueden ser sensibles a una y resistentes a otra, las mismas bacterias productoras de compuestos antimicrobianos pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina y por últi-

mo, células de esporas que presentan resistencia a estas sustancias, pueden volverse sensibles después de la esporulación (Cintas *et al.*, 2001; Grande *et al.*, 2006). El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos: a) bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; b) bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-Positivas; y c) bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram-Positivas (Cintas *et al.*, 2001).

Producción y purificación de bacteriocinas

La detección de cepas productoras de bacteriocinas es muy importante porque permitirá hacer estudios posteriores que puedan establecer su potencial en el manejo y control de los procesos infecciosos en muchas especies de animales así como su uso en la industria alimenticia. Sin embargo esto no es nada fácil y se requieren de varios pasos metodológicos para identificar, producir y purificar dichas sustancias.

- Es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos antes de iniciar la purificación. La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo las condiciones de incubación, como son la temperatura y el pH (Wescombe y Tagg, 2003; Svetoslav, *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). Por lo que las condiciones de producción deben ser específicas para cada organismo productor (Pascual *et al.*, 2008).
- La composición del medio de crecimiento también afecta a la producción de estas sustancias (Wescombe y Tagg, 2003; Zalán *et al.*, 2005). En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas (Kemperman, 2003; Kawai, 2003).

Es importante elegir un medio de crecimiento correcto ya que este puede interferir o aumentar la producción y purificación de bacteriocinas, por ejemplo, se ha reportado que el Tween 80, interfiere en la purificación de estas sustancias además de que disminuye la actividad antimicrobiana de peptidocina A y lactocina S.

- Una vez conseguida la producción necesaria de la cepa de interés, se remueven las células por centrifugación y se precipita la proteína con la adición de sulfato de amonio, seguido de varios pasos de cromatografía (Cintas *et al.*, 2001). Se han desarrollado otros métodos con separaciones por cromatografía y de acuerdo al pH del medio donde logran una total liberación o absorción de las bacteriocinas dentro de la célula. El método más común utilizado es la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Svetoslav *et al.*, 2004).
- Para comprobar las características bioquímicas del antibiótico producido se tratan las muestras obtenidas con diferentes proteasas (a-quimiotripsina, tripsina, proteinasa K, y pronasa E), o con otras enzimas (a-amilasa, lipasa A, lisozima, aminopeptidasa, mutanolisina, DNasa, y RNasa); después se determina el tamaño del compuesto producido mediante ultrafiltración o detectar la actividad en geles desnaturantes de poliacrilamida al 15 % (Tiwari y Srivastava, 2008).
- Posteriormente se determina el campo de acción inhibitorio de la bacteriocina haciendo diferentes pruebas de inhibición *in vitro*. Moreno *et al.* (2008), describen dos técnicas ampliamente utilizadas: antagonismo directo e indirecto. La primera consiste en hacer crecer la cepa productora de la sustancia inhibidora junto a una cepa indicadora o sensible y, observar, luego de la incubación la formación de halos de inhibición. La segunda tipo de antagonismo consiste en hacer crecer en primer lugar la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere la sustancia y solo entonces se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagónico.

Técnicas de identificación, detección y cuantificación

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos (Martínez, 2000):

Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar y los métodos turbidimétricos, basados en la inhibición del

desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora (Cintas *et al.*, 2000).

La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando "unidades arbitrarias" (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, ó "unidades de bacteriocina" (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidimétrica. Ambos parámetros se definen como la recíproca de la dilución más alta de una muestra que produce en el agar inhibición del indicador (UA) o que inhibe en las placas microtituladoras un 50% el crecimiento del indicador (UB). No obstante, a pesar de su utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan inconvenientes que las convierten en poco reproducibles y fiables. La cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora y son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana.

Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación DNA-DNA, (*Southern blotting*) son pruebas genéticas de uso rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar una determinada bacteriocina (Martínez, 2000). Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad y son de utilidad para determinar la presencia del gen estructural de una bacteriocina conocida en un gran número de cepas. Sin embargo, la detección del gen estructural de una bacteriocina en un organismo hospedador no implica conocer y cuantificar su producción.

Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas constituyen métodos útiles para la detección y cuantificación de bacteriocinas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte para que, una vez fijado a la superficie, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico; el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección y cuantificación de estas sustancias en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran.

En función del tipo de muestra utilizada para detectar el antígeno, en este caso la bacteriocina, las técnicas

inmunoenzimáticas pueden dividirse en dos grandes grupos:

(a) Ensayos de transferencia de células y su posterior reconocimiento inmunológico, como la prueba de "*Colony immunoblotting*".

(b) Ensayos basados en la transferencia de bacteriocinas semipurificadas. Dentro de este grupo, existen distintas técnicas, según la transferencia y superficie inerte utilizada para la fijación de los antígenos, como por ejemplo: "*Western blotting*", basada en la transferencia electrolítica de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; el "*Spot immunoblotting*", que es la transferencia directa de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; y la técnica ELISA, que se lleva al cabo mediante la transferencia directa a placas de poliestireno. Hasta ahora, las técnicas inmunológicas más utilizadas han sido las basadas en la detección y cuantificación directa de las bacteriocinas.

Conclusiones

El empleo de productos biológicos como las bacteriocinas para inhibir o destruir a microorganismos patógenos, es un método de gran interés en la industria alimentaria que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor. Las bacterias ácido lácticas (BAL) por su origen alimentario son consideradas como GRAS y por lo tanto son ideales para su uso como biopreservantes o biocontroladores microbianos. De especial importancia su uso en alimentos de gran valor económico como por ejemplo el caso del Salmón, en el cual se han aislado patógenos como *L. monocytogenes*, y se ha podido eliminar mediante el uso de bacteriocinas aisladas de lactobacilos. Actualmente se está desarrollando un fuerte interés por la identificación, purificación y producción de bacteriocinas para su aplicación en el campo de la producción animal. Sin embargo, se requieren de más estudios sobre la identificación de bacteriocinas de cepas utilizadas como probióticos; como caso particular es de señalar la acuicultura, que a nivel mundial se ha desarrollado como una actividad económica importante, la cual se ha visto afectada por un gran número de procesos infecciosos que ponen en riesgo la producción, por lo que el uso de cepas probióticas productoras de bacteriocinas resulta una estrategia interesante para restringir o reducir el uso de antibióticos, debido a que estos han provocado marcadas resistencias bacterianas, destrucción de los ecosistemas y elevados costos de producción en

acuicultura.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de la Tesis doctoral del primer autor. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Financiamiento CONACYT-México

Bibliografía

1. Bizani, D., Motta, A., Morrissy, A., Terra, R., Souto, A. & Brandelli, A., Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*, *Intern. Microbiol.*, 8,125-131, 2005.
2. Briones, F. P. y Lozano, A. E., Factors affecting growth of the spiny lobster *Palinurus gracilis* and *Palinurus inflatus* (Decapoda: Palinuridae) in Guerrero, México, *Rev. de Biol. Trop.*, 51, 165-174, 2003.
3. Brötz, H., Sahl, H. G., New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target, *J. Antimicrob. Chemother.*, 46,1-6, 2000.
4. Campaña, T. A., Virrreal, C., Civera, C. y Martínez, C. L. R., Efecto del nivel proteico de la dieta sobre el desarrollo de juveniles de la langosta australiana *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae), *Rev. Biol. Trop.*, 51,749-752, 2003.
5. Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G., A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina, *Meat Science*, 79, 483-499, 2008.
6. Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. & Hernández, P. E., Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *F. Sci. Tech. Inter.*, 74, 281- 305, 2001.
7. Cintas, L. M., Casaus, P. y Hernández, P. E., Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas, *Alimentaria*, 38, 61-70, 2000.
8. Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P., Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788, 2005.
9. Chang, J. Y., Lee, H. J. and Chang, H. C., Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7, *J. of Appl. Microbiol.*, 103, 2504-2515, 2007
10. Drider, D., Finland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., Prevost, H., The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 564-582, 2006
11. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto K. and Ishizaki, A., Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiol., Rev.*, 24:85-106, 2000.
12. Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. and Ness, I. F., Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3275-328, 1998.
13. Fernández, D. A., Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina, Tesis Doctoral, 2005.
14. Galvin, M., C. Hill, y Ross, R. P., Lactacin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays, *Int. Lett. Appl. Microbiol.*, 28,355-358, 1999.
15. Garriques, D. y Arévalo, G., An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Pennacus vannamei* postlarvac in Ecuador. In: Browdy, C. y Hopkins, J. (Eds.), *Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 1995, pp. 53-59.
16. Gómez-Gil, B., Roque, A. y Turubull, J. F., The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms, *Aquaculture*, 191, 259-270, 2000.
17. Gordon, M. D. and O'Brien, L. C., Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 2006, 152, 3239-3244.
18. Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. Ben., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. & Martínez-Cañamero, A., Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48, *Inter. J. of Food Microbiol.*, 106, 185-194, 2006.
19. Guarner, F. & Malagelada, J. R., Ecología Intestinal: Modulación mediante probióticos. En *Alimentos Funcionales. Probióticos*. [RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L Serra] Ed. Médica Panamericana. 2002. Cap 4.
20. Gullian, M., Thompson, F. y Rodríguez, J., Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Pennacus vannamei*,

- Aquaculture*, 233, 1-14, 2004.
21. Heerklotz H., Wicprecht, T., Seelig, J., Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR, *J. Phys. Chem.*, 108, 4909-4915, 2004.
 22. Joerger, R. D., Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, *Poult. Sci.*, 82, 640-647, 2003.
 23. Katikou P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S. A., Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef, *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1303-1313, 2005.
 24. Kawai, Y., Arakawa, K., Itoh, A., Saitoh, B., Ishii, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H., Itoh, T. & Saito, T., Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii* LA39, *Anim. Sci. J.*, 74, 45-51, 2003.
 25. Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. & Kok, J., Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1589-1597, 2003.
 26. Lindgren, S. E. & Dobrogosz, W. J., Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 149-164, 1990.
 27. Maldonado, R. y Llanas, L., Efecto de la incorporación de uisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano, *Rev. Fac. Agron.*, 33, 147-163, 2007.
 28. Martínez, J. M., Producción y empleos de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su coexpresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2000.
 29. Mechnikoff, E., Prolongation of Life, *Putnam and Sons*, New York, NY, 1907.
 30. Mess, P., Guerrieri, E., Bondi, M., Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates, *FEMS Microbiology Letters*, 220, 121-125, 2003.
 31. Millette, C., Dupont, F., Shareck, M. T., Ruiz, D., Archambault, and Lacroix, M., Purification and identification of the pediocin produced by *Pedococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain, *J. of Appl. Microbiol.*, 104, 269-275, 2008.
 32. Moll, G. N., Konings, N. and Driessen, A. J., Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 185-198, 1999.
 33. Moreno, M. R., Baert, B., Denaye, S., Cornelis, P., De Vuyst, L., Characterization of the amylovorin locus of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, producer of a bacteriocin active against *Pseudomonas aeruginosa*, in combination with colistin and pyocins, *FEMS Microbiol. Lett.*, 286(2), 199-206, 2008.
 34. Motta, S. A., & Brandelli, Adriano., Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 641-646, 2008.
 35. Mourad, K., Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15), *Grasas y Aceites*, 58 (2), 2007.
 36. Ogunbanwo, S., Sanni, A. & Onilude, A., Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1, *African J. of Biotech.*, 2 (7), 179-184, 2003.
 37. O'Sullivan, L., Ross, R. P., Hill, C., Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, *Brochimae*, 84, 593-604, 2002.
 38. Papagianni, M., Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications, *Biotechnol. Adv.*, 21, 465-499, 2003.
 39. Pascual, L. M., Daniele, M. B., Giordano, C., Pájaro, M., Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23, *Curr. Microbiol.*, 56, 397-402, 2008.
 40. Rengpipat, S., Rukpratanpon, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* SII), *Aquaculture*, 191, 271-288, 2000.
 41. Riley, M. A. y Wertz, J. E., Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 117-137, 2002.
 42. Rodriguez, J. & Le Moullac, G., Stage of the art of immunological tool and health control of penaeid shrimp, *Aquaculture*, 191, 109-119, 2000.
 43. Rojas, C., Vargas, P., Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria

- taria, *Tecnología en Marcha*, 21(2) 9-16, 2008.
44. Quintana, A. A., Riesgo sanitario asociado al comercio de animales acuáticos. *Revista Aquatic*, 14 (1), 36-41, 2001.
 45. Sangronis, E., García, J., Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". *An. Venez. de Nutrición*, 20 (1), 12-16, 2007.
 46. Simon, O. 2005., Microorganisms as feed additives Probiotics, *Adv. Pork. Production*, 16, 161-167.
 47. Simova, E., Beshkova, D., Najdenski H., Frenkova, G., Simov Z., Tsvetkova, I., Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian milk products: Inhibitory properties and in situ bacteriocinogenic activity, 685. In: *Proceedings of the IUFST, 13th World Congress Food Sci Technol "Food is life"*, 17-21 September, Nantes, France, 2006, 907-908.
 48. Stiles, M. E., Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345 Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. & Gibbs, P. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 157-160. 1996.
 49. Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. & Gibbs, P., Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31, *Brazilian J. of Microbiol.*, 35, 157-160, 2004.
 50. Svetoich, E. A., Eruslanov, B., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, P. I., Borzenkov, V., Levchuk, N. V., P.Svetoich, O. E., Kovalev, Y. N., Stepanshin, Y. G., Siragusa, N. G., Bruce, R. S., Norman, J. S., Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin., *J. Agric. Food Chem.* 56, 1942-1948., 2008.
 51. Tiwari y Srivastava, S., Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14, *Appl. Microbiol. and Biotech.*, 79, (5), 759-767, 2008.
 52. Turner, D. G., Welch, G., Graham, M., Characteristics of the variable star pcygni determined from cluster membership. *JAAVSO*, 29, 73, 2001.
 53. Vázquez, J. A., González, M. P., y Murado, M. A., Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish, *Aquaculture* 245, 149-161, 2005.
 54. Venkant, H. K., Sahu, N. P. & Jai N, K. K., Effect of feeding *Lactobacillus*- based probiotic on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), *Aquaculture Research*, 35, 501-507. 2004
 55. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos & Verstraete, W., Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture, *Micro. And Mole. Biol. Rev.*, 64 (4) 655-671, 2000.
 56. Wescombe, P. A. & Tagg, J. R., Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2737-2747, 2003.
 57. Wirawan, R. E., Swanson, M. K. Kleffmann, T. Jack, W. R. and Tagg, J. R., Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis* Yousef AE, JB Luchansky, AJ Degnan and MP Doyle, 1991, Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1461-1467. 2007.
 58. Zalan, Z., Neemeth, E., Barath, A., Halasz, A., Influence of growth medium in hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains, *Food. Technol. Biotechnol.*, 43, 219-225. 2005.



INHIBITION OF *Aeromonas hydrophila* BY PROBIOTIC STRAINS
ISOLATED FROM THE DIGESTIVE TRACT OF *Pterophyllum scalare*

INHIBICIÓN DE *Aeromonas hydrophila* POR CEPAS PROBIÓTICAS
AISLADAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE *Pterophyllum scalare*

M.C. Monroy-Dosta^{1*}, T. Castro-Barrera¹, F.J. Fernández-Perrino² and L. Mayorga-Reyes³

¹Laboratorio de Alimento Vivo, Departamento El Hombre y Su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960, México, D. F.

²Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Av. San Rafael Atlixco 186 Colonia Vicentina. C. P. 09340 México D. F.

³Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco,
Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960, México, D. F.

Received 1 of October 2009; Accepted 22 of December 2010

Abstract

The effect of three different probiotic strains of *Bacillus* (B1, B2 and B3) isolated from the digestive tract of *Pterophyllum scalare* against *Aeromonas hydrophila* was evaluated. All the fish that were fed with the different probiotic strains obtained higher resistance to the pathogen inoculation since they did not developed any signs of illness nor lesions and they stayed healthy until the end of the experiment, with an observed survival of 100 %. On the other hand, the fish where the probiotic bacteria were not administrated developed the infectious process caused by *Aeromonas hydrophila* with signs of illness and lesions in the gills and hemorrhagic eyes, irregular swim, and injuries on the skin. The survival in these treatments was barely up to 8 %.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp, Probiotics, *Pterophyllum scalare*.

Resumen

El efecto antagonista de tres diferentes cepas probióticas de *Bacillus* (B1, B2 y B3) aisladas del tracto digestivo de *Pterophyllum scalare* frente a *Aeromonas hydrophila* fue evaluado. Todos los peces que fueron alimentados con las diferentes cepas probióticas obtuvieron alta resistencia a la inoculación del patógeno y no mostraron signos de lesiones o enfermedad y permanecieron saludables hasta el final del experimento con una sobrevivencia del 100 %. Los peces que no fueron alimentados con probióticos desarrollaron el proceso infeccioso observándose signos y lesiones de enfermedad como branquias y ojos hemorrágicos, nado irregular y lesiones en la piel. La sobrevivencia en estos tratamientos fue escasamente del 8 %.

Palabras clave: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp, probióticos, *Pterophyllum scalare*.

1. Introduction

During the last few years, several papers have been directed to the use of probiotic microorganisms with the objective of reducing the amount of diseases during the culture of ornamental fish and restrict or reduce

the use of antibiotics, as these compounds have provoked bacterial resilience, destruction of ecosystems, and high cost of production (Westerdahl *et al.*, 1991; Maeda 1994; Abraham *et al.* 2001; Nikoskelainen *et al.*, 2003). The probiotics are microorganisms that adhere to the gastroin-

*Corresponding author. E-mail: monroydosta@hotmail.com
Tel. (52) 55-5483-7151 Fax (52) 55-5483-7469

testinal tract forming a thin biofilm and have beneficial effects on the host, including improvements on digestion, immunity, and resistance against diseases as they produce substances like bacteriocins, acetic acid and lactic acid that inhibit the proliferation of pathogenic bacteria (Rengpipat et al., 2000; Irianto and Austin, 2002; Vine et al., 2004; Gullian et al., 2004; Balcazar et al., 2006).

Amongst the most studied probiotic strains, we find: the lactic bacteria, bifidobacteria, and yeasts (Abraham et al., 2001; Singh et al., 2001; Jameson, 2003). However, one of the problems on the use of probiotics is the method to select them, according to Gómez and Roque (1998) in most of the cases this process is based only on empiric observations and with limited scientific evidence as the bacteria used on fish culture are isolated from the digestive tract of humans or other mammals. Thus, the use of strains isolated from fishes might be an interesting possibility to obtain better results. The objective of the present work was to evaluate the response of *Pterophyllum scalare* fed with three strains of *Bacillus* (isolated from fish) against *Aeromonas hydrophila*, a common bacteria found on infectious processes in aquatic organisms.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

The three strains that were used in this study were previously isolated from the digestive tract of health fish *P. scalare* in the laboratory. It is noteworthy that the molecular evidence to date indicates that these are three different strains of *Bacillus*, so to ease the handling during the experiment they were assigned with the nomenclature B1, B2 and B3.

2.2. Isolation and identification of *A. hydrophila* obtained from the fish's kidney.

The strain of *A. hydrophila* was isolated from an ornamental fish farm during an infectious process. Samples of kidney and injuries on the skin, gills, fins, and eyes were collected and were placed in Petri dishes with TBCS agar. Colonies were purified by successive re-seeding in BHI agar until a homogeneous cellular morphology was obtained. Gram staining and some confirmative biochemical test were performed (motility, citochrome C, glucose oxide fermentation, NaCl tolerance, catalase and resistance against the vibrostatic agent

0/129).

The molecular identification of *A. hydrophila* was done by DNA isolation (16s rDNA) with the DNA-EASY kit (Qiagen) by following the manufacturer's instruction. To establish the presence of *A. hydrophila* in the samples, PCR technique was performed by using the sequence oligo Acr8-5'-TGCTGGCTGTGACGTTACTCGCAG-3' and Aer9-5'-TTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATC-3' (Martinez-Murcia et al., 1992). Amplification reactions were done on a thermocycler (Amplifon II Thermolyne Barnstead International) under the following conditions: pre-incubation: 95 °C during 10 min; denaturalization: 30 cycles at 95 °C for 1 min; aligning: 68 °C for 1 min; extension: 72 °C for 30 seconds and pause of 4 °C. The PCR products were analyzed on 1 % agarose gel with a photodocumentator GelDoc 2000 (Bio-Rad, Hercules, California). A DNA sample of the strain *A. hydrophila* ATCC35654A was used as positive control.

2.3. Probiotic preparation

A sample of each *Bacillus* was added to 500 mL of TSA broth, incubating them at 30 °C for 48 hrs until achieving a 10^7 CFU/mL concentration. To measure the required bacterial concentration, a JENWAY 6400® spectrometer was used using a 620nm wave length. Also an CFU/mL count was done. The relationship between the obtained value by spectrometry and the CFU/mL was done according to Gullian et al., (2004).

2.4. Enrichment *Artemia franciscana* adults

In a 200 mL beaker previously sterilized, 50 adults of *A. franciscana* were placed and 10mL of the different probiotic strains were added at a concentration of 10^7 CFU/mL. Enrichment was performed during 30 min with continuous aeration and after this period, the adults of *Artemia* were observed on a stereoscopic microscope to ensure that digestive tract was full with the bacteria, and then *Artemia* was washed with tap water and fed to the fish. Same procedure was followed to enrich the *Artemia* adults with the rest of the probiotic bacteria and the pathogen *Aeromonas hydrophila*.

Treatments

150 healthy juvenile fish (that not presented signs of infection or lesions) of the species *Pterophyllum scalare* were used. After a period of acclimatization of 30 days the experimental phase began. In

12 aquariums, each with a 40L capacity, 10 juvenile fish were distributed, on each of the aquariums at temperature of 28°C, pH 7, and 5 mg/L of dissolved oxygen and afterwards the following treatments were carried out:

Treatment 1 (control): Fish fed with *Artemia* adults (without any probiotics and *A. hydrophila*) during 30 days.

Treatment 2: Fish fed with *Artemia* adults inoculated with *A. hydrophila*.

Treatment 3: Fish fed with the combination of the probiotic bacteria (B1, B2y B3) during 7 days, on the eighth day *A. hydrophila* was inoculated in the *Artemia* and then fed to the fish.

For treatments 4, 5, and 6, the fish were fed with *Artemia* adults enriched with the different probiotic bacteria and *A. hydrophila* was administered in the same way that in the previous treatment.

2.5. Characterization of the signs of injuries observed on the fish

24 hrs after the administration of the pathogen, mortality, changes in behavior, and signs of injuries on the skin were observed carefully, with the objective of developing a clinic history.

2.6. Pathogen recovery

To ensure that *A. hydrophila* was the actual agent that produced the infection and/or the fish's death, samples were taken from the injuries and kidneys of the diseased animals. Samples were placed on a TCBS medium and were isolated afterwards on BHI medium. The presence of *A. hydrophila* was confirmed on samples using the PCR technique described previously.

2.7. Statistical analysis

To determine which organ of the fish were the most affected by the inoculation of *A. hydrophila* a discriminate analysis was performed. The following variables were considered: coloration, skin, scales, fins and tail, mouth, gills, eyes, body, swimming, behavior, digestive tube, kidney, liver, swimming bladder, bile vesicle, heart, gonads and the grade of injuries: 0 when no damage or injuries were observed, 1 was associated with minor damage, 2 with major damage and 3 with severe damage.

Table1. Signs and lesions observed in fish fed *Artemia* inoculated with *A. hydrophila* (10^7 ufc/mL) and not probiotics administered

Affected organs	Signs and lesions
**Skin	Ulcerated, discolored, with mucus
Scales	Eroded, desquamation
Fins and tail	Hemorrhagic
Mouth	Open
**Branchia	Hemorrhagic
**Eyes	Haemorrhagic exophthalmia
Body	*
Appetite	Anorexia
Behavior	Immobilized
**Swimming	Erectic
Digestive tract	Inflamed
Kidney	Hemorrhagic
Liver	*
Gallbladder	*
Bladder	Destroyed
Heart	*

* No signs were shown

** The most common signs of infection

3. Results

3.1. Signs and lesions presented by the fish

24h after the pathogen administration, the infectious process began in the treatments where no probiotic was administered. Characteristic signs of lesions and illness that were observed are shown on Table 1. When making the statistical analysis using the Canonical discriminant functions (standardized by within variances), it was considered that the infection signs that developed the most after the pathogen administration were: hemorrhagic gills and eyes, irregular swim and skin lesions.

3.2. Survival

The inoculation of *A. hydrophila* in the fish that were not fed with the probiotics caused a mortality of more than 90% of the organisms, while the fish tried with the different *Bacillus* strains resisted the pathogen administration better with a survival between 88 and 100% (Fig. 1).

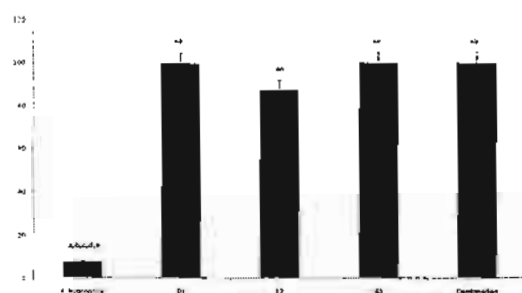


Fig. 1: Survival of *P. scalare* fed probiotic strains and inoculated with *A. hydrophila*.

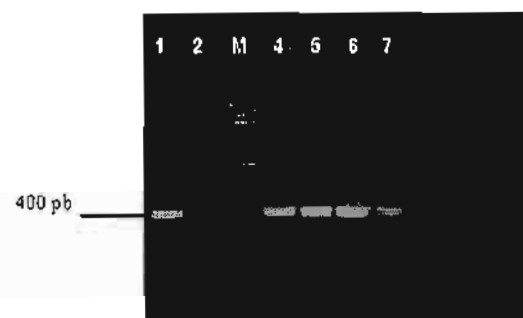


Fig. 2: PCR for the detection of *Aeromonas hydrophila* 1) positive control, 2) negative control, 3) molecular weight marker, 4-6) amplified DNA fragments of *A. hydrophila* isolated from kidney fish.

3.3. Pathogen recovery

A. hydrophila was found in every sample gathered from the infected lesions. This microorganism was identified by PCR by amplifying a 400-bp fragment that corresponded to an *A. hydrophila* positive control, thereby confirming the presence of the pathogen and its relationship with the infectious process in the fish not fed the probiotic strains (Figs. 2 and 3).

4. Discussion

Different studies have demonstrated the capacity of different microorganisms to improve the fish survival during their culture (Gatesoupe, 1994; Gulian et al., 2004; Venkant et al., 2000; Bagheri et al., 2008). In agreement with the present work the use of the probiotic strains B1, B2, and B3, isolated from the digestive tract of *P. scalare*, used in an individual way or in a combined way they remarkably improved the survival of this cichlid, showing higher resilience to the inoculation of *A. hydrophila*. The survival rate was of 100% in the treatments B1, B2, and the combination of the three bacteria. These results improved those obtained by Martínez et al (2008) who infected tilapias with different pathogens, after the challenge with the pathogenic bacteria, the highest survival was obtained in those treatments that the supplement *Bacillus* sp. and *Lacto Bacillus casei* in comparison the treatment that was not given any bacteria (control). Gatesoupe (1994), improved the survival of *Scophthalmus maximus* larvae when gave them acid lactic bacteria; Lara (1999) carried out an investigation on the effect of three different probiotics fed to *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) subjected to different stress conditions, obtaining the best results in growth and survival with the addition of *Saccharomyces cerevisiae*.

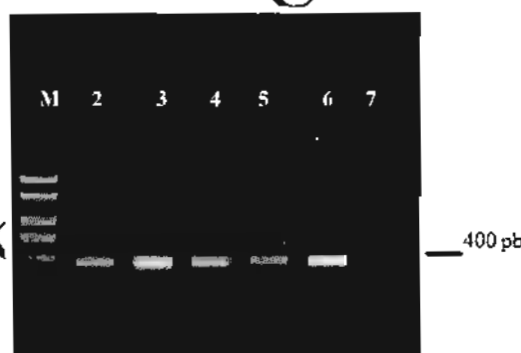


Fig. 3. Identification of *Aeromonas hydrophila* 1) molecular weight marker, 2) positive control, 3 and 4) samples of branchia lesions, 5) sample of digestive tract, 6) sample of kidney, 7) Negative control.

On investigations on the use of probiotics for the pathogens exclusion in aquaculture Aly et al., (2008), mention the exclusion of *Aeromonas hydrophila* with *Bacillus subtilis* and *Lacto Bacillus acidophilus* in *Tilapia nilotica*. However concerning to the use of specific probiotic strains for ornamental fish few studies have been made. This investigation reports the first advances on the use of bacteria isolated from the digestive tract of *P. scalare* with probiotic capacities; ornamental fish of great commercial importance that has been affected by infectious processes in those that frequently has been isolated bacteria like *A. hydrophila* (Cipriano et al., 1984; Dixon and Issvorian, 1993; Bacz et al., 2008). The results obtained in this work are very encouraging because they demonstrate the live antagonistic effect of the three strains of *Bacillus* sp. setting them as specific pro-

biotics for *P. scalare* due to the fact that they do not allow the development of the infection process in the treatments where this bacteria was administrated, also, after concluding the experiment their presence was verified inside the digestive tract of the fish which confirms their capacity to adhere to the digestive tract and their antagonistic potential. Therefore it is recommended the use of this strains that where isolated to battle against illnesses like hemorrhagic septicemia caused by *A. hydrophila* which occupies a highlighted place due to the economical losses of those that produce species that are specially important such as salmon, flounders, basses or sea basses, amongst some other and a great number of ornamental species (Sumawidjaja et al., 2001; Rodríguez, 2002; Harikrishnan and Balasundaram, 2005).

Acknowledgements

This work is part of the doctoral thesis of first author, inscribed in the Ph.D. program in Biological Sciences from the Universidad Autónoma Metropolitana and funded by the National Science and Technology of Mexico(CONACyT) Record: 200491.

References

Abraham, J. T., Shanmugham, S.A., Uma, A., Palaniappan, R., Dhevendaran, K., (2001). Biocontrol of shrimp bacterial pathogens using penaeid larvae associated bacterium, *Aeromonas* sp. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 16, 11-22.

Aly, M.S., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., Moahmed, R. M., (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lacto Bacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 128 -136.

Bacz, H. R., Magi, G. E., Balboa, S., Barja, J. L., Romalde, L. (2008). Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *ftsA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology* 128, 3386-394.

Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173-186.

Bagheri, T., Aliakbar, S., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, Ali. (2008). Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8, 43-48

Cipriano, R. C., Bullock, L., Pyle, S. W. (1984). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemia of fish. U.S. Fish and Wildlife Service, *Fish Diseases Leaflet* 66, 215-234.

Dixon, B. A., Issvorian, G. (1995). Antibacterial drug resistance in *Aeromonas* spp. isolated from domestic goldfish and Koi from California. *Journal World Aquaculture Society* 24, 102-104.

Gatesoupe, F. J. (1994). Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquatic Living Resource* 7, 277-282.

García, M., Thompson, F., Rodríguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Pennaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.

Gómez, G. B., Roque, A. (1998). Selection of probiotic bacteria for use in aquaculture. pag 174 in T.W. Flegel, editor. *Avances in Shrimp Biotechnology*. Proceeding to the special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiangmai, Thailand.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. (2005). Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Reviews in Fisheries Science* 13, 281- 320.

Irianto, A., Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal Fish Diseases* 25, 333-342.

Jameson, J.D. (2003). Role of probiotics in aquaculture practices. *Fishing Chimes* 23. 9.

Lara, M. (1999). Efecto de la utilización de probióticos en la alimentación de la *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*) sometida a diferentes condiciones de estrés. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Mérida, Mérida Yucatán, México, 67 pp.

Maeda, M. (1994). Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. *Bulletin of the*

- 353 National Research Institute of Aquaculture 403
354 1, 71-74. 404 grown in fish intestinal mucus. *FEMS Micro-*
biology Letters 231, 145-152.
- 355 Martínez, A.D., Mora, J.L., Moller, N.O. (2008). Dis- 405
356 eases of *Oncorhynchus mykiss* and Immune 406
357 enhancement by probiotics. *Fish and Shell-* 407
358 *fish Immunology* 16, 425-452. 408
- 359 Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S., Collins, M. 409
360 D. (1992). Phylogenetic interrelationships of 410
361 members of the genera *Aeromonas* and *Ple-*
362 *siomonas* as determined by 16S ribosomal
363 DNA sequencing: lack of congruence with
364 results of DNA-DNA hybridizations. *Inter-*
365 *national Journal of Systematic Bacteriology*
366 42, 142- 421.
- 367 Nikoskelainen, S. A., Ouwehand, G., Bylund, S.,
368 Salminen, S., Lilius, E. M. (2003). Immune
369 enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus*
370 *mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lac-*
371 *to Bacillus rhamnosus*). *Fish Selfish Immunol-*
372 *ogy* 15, 443- 452.
- 373 Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitavo-
374 rakul, S., Menasaveta, P. (2000). Immunity
375 enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus*
376 *monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus*
377 *S11*). *Aquaculture* 191, 271-288.
- 378 Rodríguez, M. C. (2002). Frecuencia de aislamiento
379 to de *Aeromonas hydrophila* a partir de tracto
380 digestivo de *Oreochromis aureus* (tilapia)
381 en cultivo y del agua en que viven. I Cong-
382 reso Iberoamericano Virtual de Acuicultura
383 CIVA 2002, pp. 947- 957.
- 384 Singh, I.S.B., Jayaprakash, N. S., Somnath, P.
385 (2001). Antagonistic bacteria as gut probi-
386 otics. IP 24. p. 56-59. *National Workshop on*
387 *Aquaculture Medicine*, January 18- 20. 2001.
388 Abstracts. CDDM, SES, CUSAT, India.
- 389 Sunawidjaja, E., Eidman, M., Hardosjoworo, S.,
390 Anka, L. (2001). Hemorrhagic disease of fish:
391 epizootic report of the team for disease con-
392 trol. *Bogor Agricultural University*, Bogor.
393 Indonesia, 1 - 115.
- 394 Venkat, H. K., Sahu, N. P., Jai N, K. K. (2004).
395 Effect of feeding *Lacto Bacillus*- based pro-
396 biotic on the gut microflora, growth and sur-
397 vival of postlarvae of *Macrobrachium rosen-*
398 *bergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35,
399 501-507.
- 400 Vinc, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. (2004). In
401 vitro growth characteristics of five candidate
402 aquaculture probiotics and two fish pathogens

Manuscript Number: MS 09-708

Title: Location of probiotic bacteria in the digestive tract of *Pterophyllum scalare*

Short Title: Location of probiotic bacteria

Article Type: Regular paper

Keywords: *Artemia*, *Bacillus*, probiotic, *Pterophyllum scalare*, Immunohistochemistry.

Corresponding Author: Msr María Del Carmen Monroy Dosta, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidad Autónoma Metropolitana

First Author: María Del Carmen Monroy Dosta, Ph.D

Order of Authors: María Del Carmen Monroy Dosta, Ph.D; Talía Castro Barrera, Doctor; Héctor Herrera Gutierrez, M.; Saúl Cortes Suárez, Magister

Abstract: The objectives of this work were to test the ability of *Bacillus* strains (B1, B2 and B3) to colonise the digestive tract of the angelfish *Pterophyllum scalare* and to determine the sites of colonisation in the epithelium of the digestive tract. Using immunohistochemical techniques and bacteriological analysis, we observed the presence and permanence of these probiotics after the initial feeding period. The crustacean *Artemia franciscana* in the adult stage was used as a vector for the delivery of *Bacillus* strains. Four treatments with three replicates each were performed over 60 days. The bacteriological analysis of the digestive tract showed that the B2 strain presented greater average CFU/mL values throughout the experiment. Bacteriological analysis of the faeces demonstrated that the B3 strain has a high degree of colonisation and competition within the digestive tract of *P. scalare*, as this strain produced 120 CFU/mL up to the sixth week. After the initial feeding period, this strain remained detectable until the 10th week.

Histological analyses of transverse sections of the foregut of angelfish indicated a gut lumen diameter of approximately 110 μm and microvilli with an average length of 24 μm . Immunodetection confirmed the presence and location of the *Bacillus* strains that were administered in the fish food, with positive staining in the microvilli and in the lumen of the foregut. These results demonstrate that the three strains are able to colonise the digestive tract of angelfish. Strain B2 has a higher capacity for gut colonisation when given daily through the food, while the B3 strain remains longer in the digestive tract after the cessation of administration through feeding. These data suggest that the use of mixed B2 and B3 strains should produce the best results for cultivation of this fish and optimise the time between administrations of the food supplements.

**Location of probiotic bacteria in the digestive tract of *Pterophyllum*
*scalare***

M. C. Monroy,¹ T. Castro¹, H. Herrera,² S. Cortés²

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, ¹Departamento El
Hombre y su Ambiente, ²Departamento Producción Agrícola y Animal.
Calzada del Hueso No.1100, Col. Villa Quietud, México, 04960, D. F.

The objectives of this work were to test the ability of *Bacillus* strains (B1,
B2 and B3) to colonise the digestive tract of the angelfish *Pterophyllum scalare*
and to determine the sites of colonisation in the epithelium of the digestive tract.
Using immunohistochemical techniques and bacteriological analysis, we
observed the presence and permanence of these probiotics after the initial
feeding period. The crustacean *Artemia franciscana* in the adult stage was used
as a vector for the delivery of *Bacillus* strains. Four treatments with three
replicates each were performed over 60 days.

The bacteriological analysis of the digestive tract showed that the B2 strain
presented greater average CFU/mL values throughout the experiment.
Bacteriological analysis of the faeces demonstrated that the B3 strain has a
high degree of colonisation and competition within the digestive tract of *P.*
scalare, as this strain produced 120 CFU/mL up to the sixth week. After the
initial feeding period, this strain remained detectable until the 10th week.

Histological analyses of transverse sections of the foregut of angelfish indicated a gut lumen diameter of approximately 110 μm and microvilli with an average length of 24 μm . Immunodetection confirmed the presence and location of the *Bacillus* strains that were administered in the fish food, with positive staining in the microvilli and in the lumen of the foregut. These results demonstrate that the three strains are able to colonise the digestive tract of angelfish. Strain B2 has a higher capacity for gut colonisation when given daily through the food, while the B3 strain remains longer in the digestive tract after the cessation of administration through feeding. These data suggest that the use of mixed B2 and B3 strains should produce the best results for cultivation of this fish and optimise the time between administrations of the food supplements.

Keywords:

Artemia, *Bacillus*, *probiotic*, *Pterophyllum scalare*,
Immunohistochemistry.

Author correspondence: Tel: 52 5554837151; fax: 52 55 54837469;
e-mail: cabt7515@correo.xoc.uam.mx

INTRODUCTION

In recent years, aquaculture has advanced significantly in the production of a wide variety of aquatic organisms for both human consumption and ornamental use. In Mexico, approximately 9.5 million ornamental fish are produced each year (APPOEM, 2007). One of the most successful ornamental species is the angelfish, *Pterophyllum scalare*, a cichlid native to the Amazon. This species has become popular throughout the world, has great economic potential, and is currently among the species with the highest demand in the market (Campos *et al.*, 2001; Soriano and Hernandez, 2002; Zilberga *et al.*, 2004; Agudelo, 2005; Pieza *et al.*, 2006).

The intensification of fish production and the lack of control of the international trade of live aquatic organisms and products derived from these animals have resulted in the mobilisation of a large number of organisms, and as a result the transport of pathogens that can have catastrophic effects under different environmental conditions. These include the development of serious animal diseases, zoonoses, environmental impacts and economic losses (Verschuere *et al.*, 2000). This has prompted the search for alternative methods for the control of disease in fish. Bacteriological control strategies based on the employment of probiotics to competitively exclude pathogenic microorganisms and to stimulate the immune system are interesting alternatives to the use of antibiotics and chemotherapy and have produced promising initial results (Gullian *et al.*, 2004). Probiotics are microorganisms that promote the well-being of the host upon entry and remain alive within the host for a long period of time. The duration of colonisation is subject to various factors such as the ability to

adhere to the surface of the intestinal epithelium and the production of substances that antagonise pathogenic microorganisms. Adhesion to the epithelial cells of the intestine is an important prerequisite for the colonisation of probiotic strains in the gastrointestinal tract. Fixation onto epithelial surfaces is determined by a series of surface structures or molecules known as adhesins and is achieved by a slow flow of the probiotic through the digestive tract. The ability of epithelial cells to group together with probiotics allows for the formation of a barrier that prevents the colonisation of the digestive tract by pathogenic microorganisms (Reid *et al.*, 1988; Boris *et al.*, 1997; Del Re *et al.*, 2000; Balcazar, 2002).

The difficulty of studying bacterial colonisation *in vivo* has led to the development of different *in vitro* techniques such as microscopy and molecular analysis (PCR, FISH and DAPI). In this work, the objectives were to determine the colonisation sites of *Bacillus* strain probiotics in the epithelium of the digestive tract of the angelfish *P. scalare* using immunohistochemical techniques and to determine the presence and permanence of probiotics after the initial feeding period using bacteriological analyses.

MATERIALS AND METHODS

MICROORGANISMS

The three strains used in this study were previously isolated from the digestive tract of *P. scalare*. Note that molecular testing indicated that these

probiotics are three different *Bacillus* strains; therefore, we assigned them the names B1, B2 and B3 to facilitate handling during experimental procedures.

PREPARATION OF THE PROBIOTIC

Using sterile technique, a sample of each *Bacillus* was inoculated into 500 mL of culture in soy broth medium tripticaseina (TSA) and incubated at 30 °C for 48 hours or until the culture reached a density of 10^7 CFU/mL. A JENWAY 6400® spectrophotometer was used to measure the absorbance of cultures at 620 nm, and measurements of CFU/mL were performed. The relationship between the optical density of the culture and the CFU/mL value was in accordance with Gullian (2001).

INCORPORATION OF THE PROBIOTIC INTO ARTEMIA FRANCISCANA ADULTS

In this experiment, the adult crustaceans of the species *Artemia franciscana* were used as a vector. In a glass containing 200 mL of previously sterilised water, 50 *Artemia* adults were inoculated with 10 mL of the probiotic at a concentration of 10^7 CFU/mL for 30 minutes. After this time, the digestive tract of *Artemia* adults was completely full of bacteria, as determined microscopically with an Olympus-zx12. Subsequently, *Artemia* was filtered through a light 2.0-mm mesh and fed to the fish.

FEEDING PROGRAM

In this study, 150 juveniles from the angelfish species *Pterophyllum scalare* lacking signs of infection or injuries were used. The experiment was initiated after an initial acclimatisation period of 30 days. Ten fish were distributed into each of 12 40 L-tanks, and these tanks were maintained at 28 °C, pH 7, 5 mg/L dissolved oxygen and 0.3 ppm of nitrites using the HACH system (Model DR/850 colorimeter 2000). The faeces and food waste were extracted daily to maintain the quality of the water.

Treatments: four treatments were performed with three replicates of each treatment over 60 days.

Treatment 1 batch control: fish fed with *Artemia*, without probiotics

Treatment 2: Fish fed with *Artemia* enriched with B1

Treatment 3: Fish fed with *Artemia* enriched with B2

Treatment 4: fish fed with *Artemia* enriched with B3

COLONISATION OF THE FISH INTESTINAL TRACT BY THE PROBIOTICS B1, B2 AND B3

To determine the location and viability of the three probiotics in the digestive tract of *P. scalare*, we performed a bacteriological analysis using the methodology of Riquelme *et al.* (2000). Every 15 days 5 fish from each treatment group were taken at random and were maintained in fasting for 24 h; after this time, the fish were anaesthetised with tricaine methane sulfonate (0.1 g/L) for one minute. An incision was made with a scalpel, cutting on top of the lateral line from the operculum to the base of the caudal fin. The digestive tract

was extracted, washed several times with distilled water to eliminate faecal waste and then was placed in a straight glass tube with 9 mL of sterile distilled water and homogenised for 5 minutes. With this homogenate, serial 1:10 dilutions of 0.1 mL were inoculated onto boxes with agar and selective media (MRS and TSA). The boxes were incubated at 35 °C for 72 h.

ANALYSIS OF THE FAECES SAMPLES

After the feeding period with the different probiotic strains, a bacteriological analysis of the fish faeces was performed to establish the survival time of bacteria in the digestive tract after the cessation of feeding. To quantify the levels of probiotics, 10 to 50 mg of the faeces from each aquarium were collected each week and filtered through a sterile filter paper (Millipore) in order to remove excess water. These samples were then homogenised in 10 ml of phosphate buffered solution (PBS) and a ten-fold dilution series was inoculated onto plates of TSA agar and incubated at 20 °C for 24 hours (Thitaram *et al.*, 2005). After this incubation the colonies were counted (CFU) and the morphological characteristics and Gram reaction sensitivity of each bacterial group was determined. All determinations made in duplicate and the counts were performed over 10 weeks.

ADHESION OF PROBIOTICS TO FISH FOREGUT

The adhesion test was performed using immunohistochemical techniques. The samples were fixed in 10% phosphate buffered formaldehyde solution

(PBS). The slides were pre-treated with 3% 3 aminopropyltriethoxysilane (Sigma laboratories). Subsequently the samples were processed using routine histological techniques and embedded in paraffin. Serial sections of 5 μ m were cut, and the slides were heated to 60 °C for 10 minutes. After removal of the paraffin, the following washes were performed: 3 washes with xylene for 5 minutes each, two washes with 10% alcohol, two washes with 70% alcohol and a final wash with distilled water for five minutes. Immunostaining was performed using the ImmunoCruz Staining System kit following the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology, USA). The primary antibody used was anti-*Bacillus SP* (HRP) diluted 1:20 (Affinity bioreagentes, USA) and Gill haematoxylin was applied for five seconds as a contrast reagent.

RESULTS

BACTERIOLOGICAL ANALYSIS OF THE DIGESTIVE TRACT OF *P. SCALARE*

Bacteriological analysis indicated that the three strains of *Bacillus* colonise the digestive tract of the angelfish *P. scalare*, when TSA medium was used to insure the morphotype characteristics of the bacterial supply. The strain B2 produced higher average values of CFU/mL throughout the experiment (Figure 1).

BACTERIOLOGICAL ANALYSIS OF THE FAECES

The bacteriological analysis of the faeces established that the B3 strain has a high degree of colonisation and competition within the digestive tract of *P. scalare*, and average counts above 120 CFU/mL were obtained up to the sixth

week; after the end of the feeding period, its presence was detectable until the tenth week. The B1 and B2 strains produced averages of 70 and 30 CFU/mL, respectively, in the sixth week. From the eighth week on these strains no longer produced colonies and bacteria of different morphotypes grew (Figure 2).

ADHESION OF PROBIOTICS TO FISH FOREGUT

The histological sections of the angelfish foregut were examined. The gut lumen was 110 μ m in diameter (Figure 3a) and the intestinal villi were 24 μ m in length on average (Figure 3b). A cylindrical epithelial lining of monostratified ciliated cells with folds conformed by a mucous and one submucous spiral was also observed. These sections show that there are abundant caliciform cells and Crypts of Lieberkühn in all the villi (Figure 3c).

Figures 4a and 4b shows a positive staining of *Bacillus* in the lumen of the intestinal tract and on the intestinal microvilli.

DISCUSSION

Numerous bacterial strains used as probiotics have the ability to adhere to the epithelial cells and the intestinal mucus of fish, and this property has made probiotics significant in aquaculture. This adhesion is a complex process that involves the membrane of the bacterial cell and its interaction with surfaces. Several authors have investigated the composition, structure and interactions related to the adhesion of probiotics to the intestinal epithelium (Green and

Klaenhammer 1994; Pelletier *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 1998; Del Re *et al.*, 2000; Kos *et al.*, 2003). Furthermore, it has been shown that bacterial strains not only adhere, but remain in the gastrointestinal tract for several days, as demonstrated by the analysis of the faeces. This study focused on the capacity of *Bacillus* bacterial strains B1, B2 and B3, isolated from the digestive tract of *P. scalare*, to colonise the intestinal tract and maintain a significant presence there 10 weeks after the administration of probiotic cells.

The bacteriological analysis showed that the three probiotics were capable of colonising the intestinal tract. There are differences, however, in the number of cells from each strain over time. On the 30th day of the experiment, the number of cells from the B3 strain was higher than the others, while 45 days later the B2 strain had more cells. At this point, the B2 strain produced 65 CFU/ml and remained dominant over the other two strains until the end of the experiment, demonstrating that B2 strain better colonised the digestive tract of the fish ($p > 0.001$) and would dominate while the fish were provided the probiotic supplement continuously. Some previous studies using probiotics with aquatic organisms have shown that even when different probiotic strains that can all colonise the intestinal tract are provided, there will always be some strain that dominates and produces more cells over the inoculation time course (Gildberg *et al.*, 1997; Ringo and Vadstein, 1998; Ringo, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Gullian *et al.*, 2004; Macey and Coyne, 2006). Regarding the persistence of probiotics in the digestive tract of the fish after cessation of the administration of probiotics in the food, the B3 strain was observed to produce the most cells until the 10th week. The presence of these probiotics in the faeces manifested their high potential for colonisation of the

digestive tract of the fish *P. scalare*. This is not the case for other aquatic organisms, such as the Abalone, a mollusc that show a very marked decrease of probiotic cells in the first and second day after cessation of the administration of food with probiotics, showing very low amounts of these cells in their faeces ($p<0.05$) at 15 days (Macey and Coyne, 2006).

Immunodetection tests confirmed the presence and location of the *Bacillus* administered through *Artemia*, with positive staining in the microvilli and in the foregut lumen of the angelfish; Makridis *et al.* (2001) also used immunohistochemical techniques to demonstrate the presence of *Vibrio* in the lumen and microvilli of the intestinal tube of *Hippoglossus hippoglossus* (sea bass) larvae 10 days after supplementation of the bacteria, which were also bioencapsulated in *Artemia*, was stopped.

The results of this work show that the three strains used in this study are able to colonise the digestive tract of the angelfish, but that strain B2 has higher capacity for colonisation while being given daily through food, while strain B3 remains longer after its administration to the fish has ceased. From these results we suggest that using a mixture of the B2 and B3 strains could provide better results for the cultivation of this fish and optimise the time between administrations of the food supplement.

References

- ARGUDELO, G. D, A. A. (2005). Establecimiento de un centro reproductor de *Pterophyllum scalare* (pez ángel o escalar). *Revista Lasallista de Investigación*. 2 (2). Colombia.26-30pp

273 APPOEM. Asociación Productora de Peces de ornato del Estado de Morelos.
 274 (2008). 4° Aquaculture Internacional Forum. Guadalajara. México.
 275

276 BALCÁZAR, J. L. (2006) Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In:
 277 de Blas, I. (Ed.), Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual
 278 de Acuicultura, Zaragoza, Spain, pp. 877– 881.
 279

280 BORIS, S., SUAREZ, J.E. AND BARBES, C. (1997) Characterization of the
 281 aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal
 282 isolate. *Journal of Applied Microbiology*. **83**, 413–420.
 283

284 DEL RE, B., SGORBATI, B., MIGLIOLI, M. AND PALENZONA, D. (2000)
 285 Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of
 286 *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 438–442.
 287

288 GREEN, J.D. AND KLAENHAMMER, T.R. (1994) Factors involved in
 289 adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. *Applied and*
 290 *Environmental Microbiology*. **60**, 4487–4494.
 291

292 GULLIAN, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias
 293 prebióticas asociadas al cultivo de *Pennaeus vannamei*. Tesis de
 294 Magister en Ciencias, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y
 295 Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
 296

- GULLIAN, M., THOMPSON, F. y RODRÍGUEZ, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Pennaeus vannamei*. *Aquaculture* **233**: 1-14.
- NIKOSKELAINEN, S., OUWEHAND, A., BYLUND, G., SALMINEN, S., LILIUS, E.M.(2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunology*. **15**, 443–452.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. AND BELLON-FONTAINE, M.N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1725–1731.
- PÉREZ, P.F., MINNAARD, Y., DISALVO, E.A. AND DE ANTONI, G.L. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 21–26.
- RENGPIPAT, S., RUKPRATANPOM, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASAVETA, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Pennaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* **191**: 271-288.

- REID, G., MCGROARTY, J.A., ANGOTTI, R. AND COOK, R.L. (1988)
Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and
coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of
Microbiology* **34**, 344–351.
- RIQUELME C, ARAYA R, VERGORA N, ROJAS A, GUAITA M & CONDIA M
(2000) Potential probiotic strains in the culture of Chilean scallop
Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819). *Aquaculture* **154**: 17–26.
- SORIANO, S. M. B. y HERNÁNDEZ, O. D. (2002).Tasa de crecimiento del pez
ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes:cichidae) en condiciones de
laboratorio. *Acta Universitaria*. Vol. **12**. Núm : 002.28-33.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS AND VERSTRAETE, W.
(2000): Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture.
Microbiology and Molecular. Biology Review **64** (4): 655-671.
- ZILBERGA, D. OFIRA , R. RABINSKIB, T. DIAMANTC, A. (2004).Morphological
and genetic characterization of swimbladder non-inflation in angelfish
Pterophyllum scalare (Cichlidae) *Aquaculture* **230**,13–27

Ethics questionnaire for JFB

This questionnaire relates to the Editorial published in JFB 68, 1-2, which you have been asked to read. Please note that submitted manuscripts will only be considered if the experimental methods employed are ethically justified. PLEASE SUBMIT THE COMPLETED QUESTIONNAIRE WITH YOUR MANUSCRIPT ONLINE THROUGH EDITORIAL MANAGER.

Corresponding author's name: Maria del Carmen Monroy Dosta

Question 1: If the fishes have been collected as part of faunal surveys, have the fishes, where feasible, been killed rapidly or returned to the wild after being held in aquaria?

Yes ☐

No ☒

Question 2: What method was used if they were killed?

The fishes we used were purchase in a pet shop. After the experiment we continued the cultivation. The fishes that were killed for the immunohistochemical techniques had a rapid death

Question 3: If you have undertaken experimental work, has the care and use of experimental animals complied with local and or national animal welfare laws, guidelines and policies?

Yes ☐

No ☒

If 'Yes', state these and provide suitable evidence (e.g. for the U.K. a Home Office PPL number is sufficient) that protocols have undergone an ethical review process by an institutional animal care and use (or similar) committee, a local ethics committee, or by appropriately qualified scientific and lay colleagues.

Please read the exceptions below (Questions 4 to 7). If any of these exceptions apply to your study, complete the appropriate section. Otherwise leave blank.

If 'No', because these laws do not exist in your country, please state this.

Even if there are many laws in México, there is not any specific for fishes in the laboratory

Please read the exceptions below (Questions 4 to 7). If any of these exceptions apply to your study, complete the appropriate section. Otherwise leave blank.

Question 4: Did you use experimental conditions that severely distressed the animals?

Yes ☐

No ☒

If 'Yes', state the conditions and how they can be justified.

Question 5: Did you use humane endpoints that minimized adverse effects?

Yes ☐

No ☒

Question 6: Have you performed surgical procedures?

Yes ☐

No ☒

If 'Yes', have you suitably described these in your manuscript?

Question 7: If the procedures caused more than slight pain or distress, did you use appropriate sedation, analgesia and anaesthesia, with appropriate post-operative care?

Yes ☒

No ☐

If 'Yes', outline these.

Before killing the fishes anaesthesia (Xilocaine 20%) was used

If 'No', did any of your procedures involve sentient, un-anaesthetized animals paralysed by chemical agents such as muscle relaxants?

Yes ☐

No ☐

If 'Yes', provide details. Normally these procedures will be considered unacceptable by JFB.

The Xilocaine at 20% was used as sedative

If 'No', did any of the procedures, particularly those that involve lethal endpoints, cause adverse effects or lasting harm to a sentient animal?

Yes ☐

No ☐

If 'Yes', provide details. Normally these procedures will be considered unacceptable by JFB unless any harm caused can be justified against the benefit gained.

To prevent any suffering to the fishes we used the xilocaine

Figures

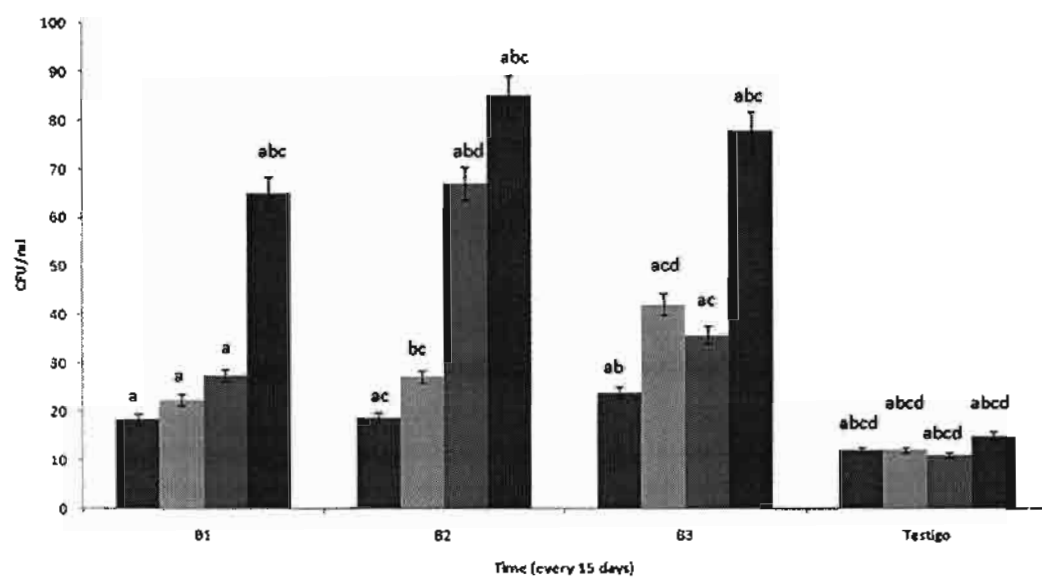


Figure 1. Counts CFU / mL of probiotic bacteria in the digestive tract of *P. scalare* for 60 days.

* Different letters show significant differences between groups at each time ($p < 0.05$).

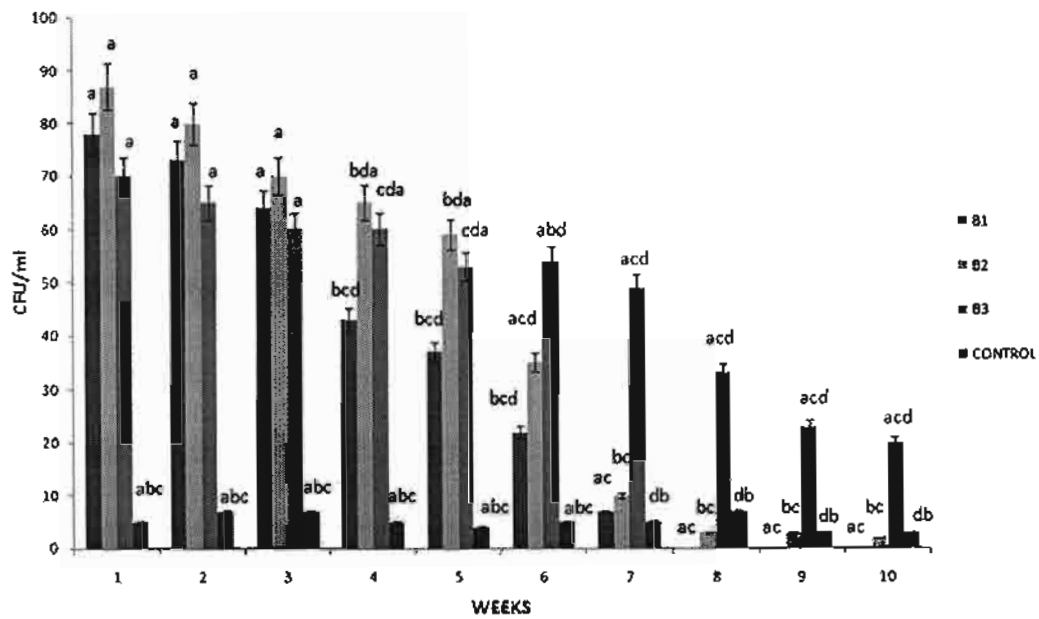


Figure 2. CFU / mL of feces of *P. scalare*. Counts of ten weeks after discontinuing the feeding of fish

* Different letters show significant differences between groups for each time ($p < 0.05$)

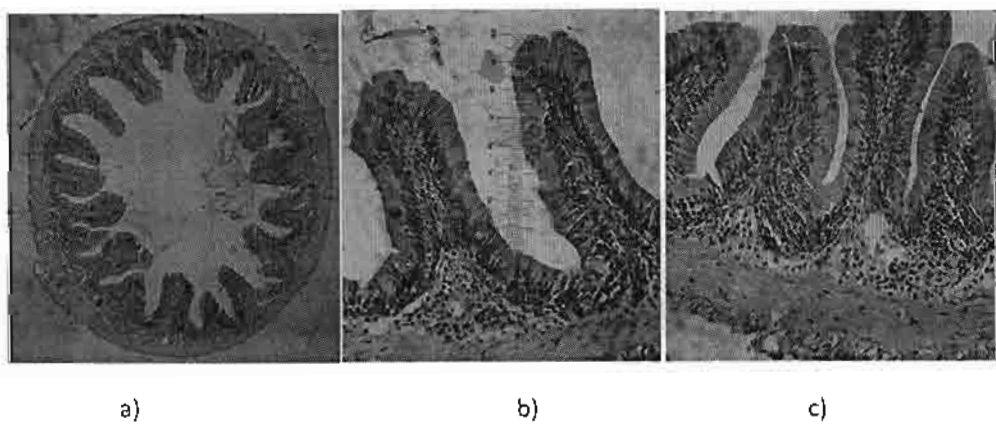
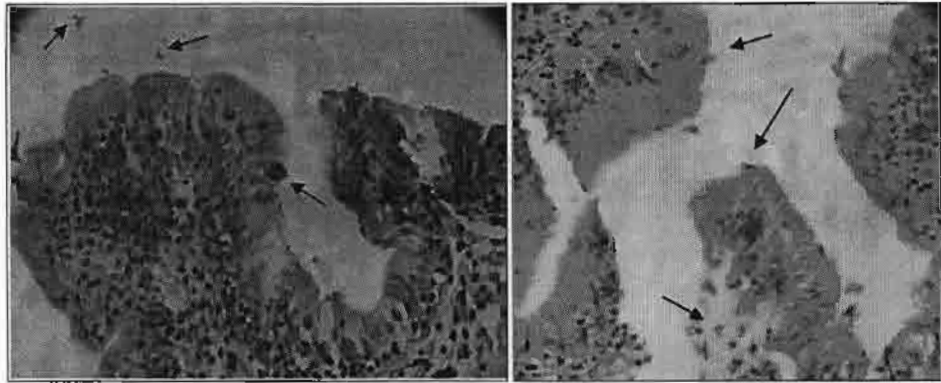


Figure 3 .- a) Transverse section of the intestine of *P. scalare*, with a diameter of approximately 110 μm ; b) microvilli with an average length of 24 μm ; c) intestinal villi where there is caliciform cells and crypts Lieberkühn.



a)

b)

Figure 4 a and 4b. Location of probiotics in transverse sections of digestive tract marked with antibodies to *Bacillus*, in the microvilli and in the gut lumen.

* The arrow indicates the Immunostaining positive