



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES BACTERIANAS EN *Pterophyllum scalare*

TESIS

(Idónea Comunicación de Resultados)

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

Q.F.B. Julio César Meneses Márquez

COMITÉ TUTORAL:

Directora:

Dra. Aida Hamdan Partida

Codirectora:

Dra. María del Carmen Monroy Dosta

Asesor:

Dr. Jorge Castro Mejía

Ciudad de México, a 28 de noviembre de 2018

El Q.F.B. Julio César Meneses Márquez, del programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, agradece el apoyo económico otorgado como beca por el CONACYT con el No. de CVU: 794857 durante el periodo comprendido entre Septiembre de 2016 a Agosto de 2018.

Agradecimientos:

Agradezco a la vida por tener la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de posgrado, a la UAM Xochimilco, al posgrado en Ciencias Agropecuarias y a CONACYT por todo el apoyo brindado durante este tiempo.

A mi mamá por ser el motor de mi vida y por siempre motivarme a superarme. A mi papá y hermanos por estar siempre a mi lado en todos los momentos y su apoyo incondicional

A la Dra. Aida y Dr. Jaime por abrirme las puertas de su laboratorio, por creer en este proyecto y por brindarme su apoyo en aspectos académicos y personales.

A la Dra. Carmen, por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la acuicultura y por todo su apoyo incondicional durante mis estudios, de igual manera al Dr. Jorge por su colaboración y apoyo para mejorar este proyecto.

A la Dra. Miss Sarai, Luisito, Clausi Lola, Dianita y Normis, por brindarme su amistad, por su apoyo en este proceso, por los gratos momentos y las ricas comidas en el G-008.

A Katy, Luz y Eve por su apoyo y paciencia en enseñarme a manejar los peces y por su amistad.

A José Chuy, Rubius y la nena, por apoyarme en la decisión de entrar a este posgrado y seguir al pendiente de mi progreso y gracias por su amistad.

A Bicha, Ñoño, Diosa Yemapolaya y Kiki por ser mis amigos incondicionales desde la licenciatura y siempre contar con su apoyo.

A mis comadritas Rafa y Marisa por siempre estar siempre a mi lado y por apoyarme en muchos momentos de mi vida.

A Pertsby, Stefi, Thanie y Mandy por ser mis lindos amiguitos y siempre contar con ustedes.

A Ava, Chio, Jess, Ñoñis, Chio, Rosy, Omar, Victor, Ara, Jerry y Ush, por formar parte de mi vida desde hace años y estar presentes en esta nueva etapa.

A Peshe Posh que desde tierras inglesas siempre ha estado al pendiente de mí, como igual a Depa bobis, gracias por todo.

A mi vecini que siempre está conmigo y apoyar mis locuras.

A Jaime, gracias por ser mi compañero de locuras y apoyarme incondicionalmente en todo.

Resumen:

La nanotecnología ha tenido un avance significativo debido a sus múltiples aplicaciones; una de ellas es su uso como agente antimicrobiano en cultivos acuícolas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (AgNPs) contra *Vibrio fluvialis* en el cultivo de *Ptephyllum scalare*. Las AgNPs fueron sintetizadas en diferentes concentraciones (90 y 180ppm). A través de la espectroscopia UV-Vis se confirmó la formación de AgNPs con absorbancia máxima de 427 y 422 nm, la distribución de tamaño de la población de las AgNPs fue entre 60.7 y 155.8 nm a 90 ppm y entre 63.3 y 170.8 a 180 ppm. El resultado de SEM indica que el tamaño de partícula de 13-20 y 4-15 nm, con formas cubicas y circulares. En las pruebas para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* se obtuvo una CMI de 45 ppm y halos de inhibición de 14.3 ± 1.15 mm a 180 ppm y 8.66 ± 0.57 mm a 90 ppm. En la cinética de *V. fluvialis* al contacto con las concentraciones de AgNPs, se observó que a partir de las 6 horas de exposición se inicia el proceso de inhibición del crecimiento bacteriano. La prueba de toxicidad, las AgNPs demostró que uno hubo evidencia de daño en los ojos, aletas, escamas y órganos internos, teniendo el 100% de supervivencia. En la prueba *in vivo* se observó una supervivencia de 88 y 93% para los tratamientos con nanopartículas en comparación con el tratamiento control, donde solo se inoculó el patógeno ya que los peces no sobrevivieron las 48 horas de la infección experimental. En este estudio concluye que las AgNPs tuvieron una actividad antimicrobiana contra *V. fluvialis*, dando una nueva alternativa para controlar las enfermedades microbianas en cultivo de *P. scalare*. Sin embargo, se debe de continuar investigando del efecto de AgNPs en otros microorganismos patógenos y en otras especies de peces ornamentales.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, enfermedades de peces, *Vibrio fluvialis*, efecto antimicrobiano

Abstract:

Nanotechnology has taken a significant step forward because of its multiple applications; one of them is the use of nanoparticles in fish medicine. The objective of this work was to determine the antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) against *Vibrio fluvialis* in the cultivation of *Ptephyllum Scalare*. The AgNPs were synthesized in different concentrations (90 and 180 ppm). Through the UV-Vis spectroscopy confirmed the formation of AgNPs with absorbance maximum of 427 and 422 nm, the distribution of population size of the AgNPs was between 60.7 and 155.8 nm to 90 ppm and between 63.3 and 170.8 to 180 ppm. The result of SEM indicates that the particle size of 13-20 and 4-15 nm, with cubic forms and circulars. In the tests to determine the antimicrobial activity *in vitro*, obtained a MIC 45 ppm and the inhibition zone was 14.3 ± 1.15 mm to 180 ppm and 8.66 ± 0.57 mm to 90 ppm. In the kinetics of *V. fluvialis* to contact with the concentrations

of AgNPs, it was noted that from 6 hours of exposure starts the process of inhibition of bacterial growth. In toxicity test, the AgNPs showed that one there was no evidence of harm in the eyes, fins, scales and internal organs, obtaining the 100% survival. *In vivo* test, there was a survival of 88% and 93 for treatments with AgNPS in comparison with the control treatment, where only the pathogen inoculum as the fish did not survive the 48 hours of experimental infection. This study concludes that the AgNPs had a significant antimicrobial activity against *V. fluvialis*, giving a new alternative to control microbial diseases in cultivation of *P. scalare*. However, it must be to continue to investigate the effect of AgNPs in other pathogenic micro-organisms and other species of ornamental fish.

Keys words: Silver nanoparticles, fish disease, *Vibrio fluvialis*, antimicrobial effect

Índice	Página
1. Introducción	8
2. Planteamiento del Problema	10
3. Hipótesis	10
4. Objetivos	10
4.1 Objetivo General	19
4.2 Objetivos Particulares	10
5. Marco de Referencia	11
5.1 Producción Acuícola	11
5.2 Producción Acuícola Ornamental en México	13
5.3 Enfermedades bacterianas en peces de ornato	14
5.3.1. Estudios sobre <i>Vibrio fluvialis</i> en el cultivo de <i>P. scalare</i>	15
5.4 Control sanitario y manejo de medicamentos para el control de enfermedades bacterianas en acuicultura.	15
5.5 Nanotecnología y nanopartículas de metal en el control de enfermedades bacterianas en la acuicultura.	17
6. Marco teórico	21
6.1 Acuicultura	21
6.2 Acuicultura ornamental en México	21
6.3 <i>Pterophyllum scalare</i>	21
6.3.1 Taxonomía	21
6.3.2 Características de cultivo de <i>P. scalare</i>	21
6.4 Triada ecológica	22
6.5 Enfermedades en <i>P. scalare</i>	23
6.5.1 Infecciones bacterianas en <i>P. scalare</i>	23
6.5.2 <i>Vibrio fluvialis</i>	24

6.5.3	Diagnóstico y tratamiento	24
6.8	Nanotecnología y Nanopartículas de plata	24
7.	Metodología	28
7.1	Área de trabajo	28
7.2.	Síntesis de AgNPs	28
7.3.	Caracterización de AgNPs	28
7.3.1.	UV-Visible	28
7.3.2	Tamaño de Partícula	28
7.3.3	Espectroscopia Infrarrojo (IR)	28
7.3.4.	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	28
7.3.5	Analizador del tamaño de Partícula	29
7.4.	Obtención de <i>V. fluvialis</i>	29
7.5.	Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de AgNPs	29
7.6.	Cinética de las AgNPs ante <i>V. fluvialis</i> .	30
7.7.	Obtención de los Peces	30
7.8.	Actividad antimicrobiana <i>in vivo</i> de las AgNPs	30
7.9	Evaluación de la actividad toxicológica de las AgNPs en <i>P. scalare</i>	31
8.	Resultados	32
8.1	Síntesis y Caracterización de AgNPs	32
8.2	Actividad <i>in vitro</i> de AgNPs en <i>V. fluvialis</i>	35
8.3	Actividad <i>in vivo</i> de AgNPs en <i>P. scalare</i> infectados con <i>V. fluvialis</i>	37
9.	Discusión	42
10.	Conclusiones	45
12.	Referencias Bibliográficas	46
13.	Anexo 1	53
14.	Anexo 2	74

1. Introducción:

La acuicultura engloba todas las actividades que tienen por objeto la producción, desarrollo y comercialización de organismos acuáticos en ecosistemas controlados como estanques o en sistemas abiertos que incluyen lagos, ríos, presas, lagunas y el mar (Guzmán y Fuentes, 2006). Dicha actividad juega un papel importante en la producción de organismos con diferentes finalidades, desde la producción de alimentos hasta la actividad ornamental y es una industria con un alto potencial económico para México (Rodríguez, 2014).

De acuerdo con CONAPESCA en 2018, la producción anual es de alrededor de 60 millones de peces de ornato, siendo el estado de Morelos como principal productor y anualmente produce 30 millones de organismos de 100 variedades dentro de las que destaca la producción de *Pterophyllum scalare* (pez ángel), especie que ha sido ampliamente comercializada debido a que tiene una llamativa estética y amplia aceptación en el mercado mundial de la acuariofilia (Jiménez *et al.*, 2012; CONAPESCA, 2017). Sin embargo; la intensificación en la producción de esta especie y la falta de control del comercio internacional de los peces, ha provocado la movilización de gran cantidad de organismos y, como consecuencia, el transporte de microorganismos patógenos que en condiciones ambientales diferentes pueden desencadenar procesos infecciosos, impacto ambiental y pérdidas económicas para los productores (Verschuere *et al.*, 2000).

Entre las enfermedades más comunes en los peces se encuentra la Vibriosis causada por bacterias Gram negativas de la especie *Vibrio fluvialis* (Savin, 2013). La enfermedad generalmente se presenta como una septicemia generalizada, en la cual se pueden observar hemorragias en la base de las aletas, ojos, branquias y en órganos internos como el hígado, bazo y riñón (Jiménez, 2006).

Para el tratamiento y la prevención de las enfermedades en los peces se utilizan una gama de compuestos químicos y antibióticos los cuales pueden tener un alto impacto en el ambiente y el personal que maneja a los peces (Cabello, 2004), ya que el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos ha propiciado resistencia bacteriana que se transmite en la progenie de estas, de forma directa a través de los genes, y de forma indirecta a través de la adquisición de plásmidos-R entre especies. Debido a ello, en la actualidad se están investigando alternativas para el control de enfermedades sin el uso de antibióticos (FAO, 2014). Una tecnología novedosa que en años recientes ha llamado la atención en el sector acuícola, es el uso de nanopartículas ya que se han reportado efectos positivos en el desarrollo de vacunas para la protección de la carpa asiática usando complejos nanoencapsulados contra la bacteria *Listonella anguillarume*, de igual manera se han utilizado en el control del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarones (Handy, 2011).

Las nanopartículas son compuestos, generalmente de forma esférica, con dimensiones entre 1 y 100 nm, que pueden ser sintetizadas a partir de metales nobles como el oro, plata, platino, cobre y paladio (Díaz del Castillo, 2012; Dananjaya, *et al.*, 2016). Recientemente la plata (Ag), tiene especial interés debido a su efecto bactericida en su forma iónica (Ag^{+1}). Las nanopartículas permiten la liberación de los iones de Ag^{+} que se unen a las proteínas de la membrana celular causando una ruptura lo que lleva a muerte a las células bacteriana o también pueden unirse al citocromo y a los ácidos nucleicos dañándolos e inhibiendo la división celular (Huang *et al.*, 2015). Por lo anterior, esta tecnología puede ser aprovechada en el control de enfermedades en acuicultura.

2. Pregunta de investigación

¿Será efectiva la aplicación directa de las nanopartículas de plata (AgNPs) para el control de *Vibrio fluvialis*?

3. Hipótesis:

Las Nanopartículas de Plata (AgNPs) serán efectivas para el controlar la infección de *Vibrio fluvialis*, en *Pterophyllum scalare*.

4. Objetivos:

4.1. General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre *V. fluvialis* en el cultivo de *P. scalare*.

4.2. Particulares:

- Determinar las características fisicoquímicas de las AgNPs.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de las diferentes concentraciones de AgNPs sobre *V. fluvialis*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vivo* de las concentraciones de AgNPs durante la infección de *P. scalare* con *V. fluvialis*

5. Marco de Referencia

5.1. Producción acuícola

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, tanto en zonas costeras como del interior, que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. Es probablemente el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento y representa ahora casi el 50% del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial (FAO, 2012). A nivel mundial están registradas 26 mil granjas de acuicultura ornamental en Singapur, China, Taiwán, Malasia, Indonesia, República Checa y Estados Unidos, que en conjunto producen 2,500 millones de organismos con valor de 56 mil millones de dólares. En América Latina, en países como Colombia, Brasil, Perú, Argentina y Venezuela, existen alrededor de 3,532 granjas que producen 300 millones de organismos. (CONAPESCA, 2017).

En México, la acuicultura nace como una actividad complementaria de apoyo social a las comunidades rurales, con lo cual se pretendía incrementar el consumo de proteína animal y mejorar así los niveles nutricionales de la población (Juárez-Palacios, 1987). Desde sus inicios, la acuicultura ha trascendido por diferentes etapas de desarrollo, siguiendo tres vertientes principales, la acuicultura de autoconsumo destinadas al cultivo de diferentes especies de tilapia y carpa; la acuicultura realizada en embalses de mediana y gran escala para el cultivo de carpa, tilapia, bagre y lobina entre otros y los sistemas controlados principalmente de camarón, tilapia, trucha, atún, ostión y bagre practicada con fines de comercialización y el requerimiento de grandes inversiones (Ramírez-Martínez *et al.*, 2010).

La producción acuícola en nuestro país se lleva a cabo bajo tres modelos de producción, los cuales dependerán de diversos factores para su categorización de entre los que podemos mencionar la densidad de cultivo, el suministro de alimento y la tecnificación del sistema productivo (filtros, estanquera, aeración entre otros) (FAO, 2004). Estos modelos son:

Cultivo extensivo

En este tipo de cultivo la intervención humana es mínima después de la siembra. La inversión que se hace es baja y no se requiere personal calificado, pero sus rendimientos son bajos. La alimentación de los peces depende de la productividad natural del agua, ya que el manejo se limita a la siembra y cosecha de los peces, se realiza generalmente en lagunas o estanques. Los rendimientos van alrededor de 1 a 2 toneladas por hectárea (Arredondo y Lozano, 2003).

Cultivo semi-intensivo

Este cultivo puede ser en estanques, corrales y cuerpos de agua como represas, canales de riego por mencionar algunos, hay un mayor manejo en aspectos reproductivos y en la administración del alimento, se pueden mezclar subproductos agrícolas con alimento balanceado, ya que se siembra mayor número de peces por área. Los rendimientos pueden ser de cuatro a seis toneladas por hectárea (FAO, 2004).

Cultivo intensivo

En el cultivo intensivo se hace un control total de los parámetros ambientales como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, por mencionar algunos. Así mismo se cultiva una mayor cantidad de peces y la alimentación depende del uso de alimento balanceado que puede ser complementado con alimento vivo. Se realiza generalmente en tanques drenables o estanques que tienen recambio de agua y un sistema eficiente de aireación. Los rendimientos pueden ser de 10 a 40 kg/ m³ en jaulas y tanques. En estanques el rendimiento llega a ser de 15 a 40 toneladas por hectárea (FAO, 2004).

De acuerdo con el anuario estadístico de pesca de 2013, indicaron una producción de 242 771 toneladas de peces de consumo con un valor económico estimado de 7 568 180 millones de pesos. Las especies con mayor producción fueron el camarón, mojarra, ostión, carpa, entre otros (Tabla 1). Los principales estados productores en la acuicultura de peces de consumo son: Baja California, Sonora, Sinaloa y Tamaulipas (FAO, 2004).

Tabla. 1 Volumen y Valor de la producción pesquera de acuicultura, según principales especies (CONAPESCA, 2013)

Especie	Volumen (Toneladas)	Valor (Millones de pesos)
Camarón	60, 191	3, 925, 497
Mojarra	94, 575	1,766, 060
Ostión	38, 889	150,394
Carpa	26, 545	381, 960
Trucha	6, 693	398, 443
Atún	6, 238	547, 425
Brague	5, 304	186, 201
Charal	1, 634	18, 792
Lobina	430	13, 215
Langostino	53	5, 265
Otros	2, 440	174,945
Total	242, 771	7, 588, 180

Actualmente, no sólo la producción acuícola se hace en peces de consumo, también se producen peces de ornato.

5.2. Producción Acuícola Ornamental en México

La industria de peces ornamentales es un negocio con amplias perspectivas de desarrollo en nuestro país, donde operan 711 granjas y producen 66 millones de organismos al año con valor de producción de 120 millones de pesos. Los estados de la República donde están establecidas las granjas de peces ornamentales son Jalisco, México, Veracruz, Yucatán y Morelos, siendo éste último el principal productor con 30 millones de peces al año (CONAPESCA, 2017).

Los productores de Morelos se encuentran organizados en asociaciones, las principales son APPOEM (Asociación de Productores de Peces de Ornato del Estado de Morelos A. C.), La Perla de Morelos A.C. y productores libres (Fundación Produce Morelos, 2011).

La producción de peces ornamentales frecuentemente no se incluye como parte de lo que se considera acuicultura establecida; por lo que muchos países incluyendo México, no mantienen estadísticas de su producción en comparación a aquellas especies comestibles, por lo que estas especies no se incluyen en la base de datos FISHSTAT Plus de la FAO. Sin embargo, es innegable la importancia económica de esta actividad. Una dificultad en incluir los peces ornamentales en la información regular de acuicultura es el hecho de que el producto generalmente es comercializado por unidad más que por peso. Por tanto, la mejor manera de estimar la importancia es a través del valor de la producción, siendo necesario mejorar y ampliar los sistemas nacionales e internacionales de recopilación de estas estadísticas (Dawes, 2008).

Las especies con mayor producción son las variedades de japonés, mollys, guppys, carpas, ángel, barbos, plecos, betas, tetras y guramíes (Tabla 2).

Tabla 2. Principales peces ornamentales producidos en México.

Especie	Nombre común
<i>Carassius auratus</i>	Japonés
<i>Poecilia reticulata</i>	Guppy
<i>Poecilia latipinna</i>	Molly
<i>Poecilia velifera</i>	Molly
<i>Pterophyllum scalare</i>	Pez ángel
<i>Trichogaster trichopterus</i>	Gouramy de tres puntos
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy
<i>Brachydanio rerio</i>	Cebra
<i>Xiphophorus helleri</i>	Cola de espada
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Monjita

Nota: Las especies se ordenan de acuerdo al valor de su producción. Fuente: Diario Oficial de la Federación, 2012.

5.3. Enfermedades en el cultivo de peces de ornato

Uno de los principales problemas que enfrenta la acuicultura de ornato son las enfermedades infecciosas. Las patologías de los peces se reconocen cada vez más como un problema en la producción y comercialización que afecta (FAO, 2001) el desarrollo de esta industria, ya que causa pérdidas económicas importantes, debido a la mortalidad de los peces, los costos de los tratamientos y el descenso de la producción (Negrete, 2002; Barrioluengo, 2012).

La mortalidad por enfermedades infecciosas de los organismos cultivados, en países desarrollados con buenas prácticas sanitarias son de por lo menos el 10% del total que equivalen a casi 5,000 millones de dólares, si pensamos en aquellos países menos desarrollados, con prácticas sanitarias que no son tan rigurosas los valores se exceden (Barrioluengo, 2012). Según reportes de productores de *P. scalare* en la Ciudad de México, las pérdidas por infección relacionadas con estrés ambiental ascienden a 90% de la producción total, de ahí la importancia de la prevención, diagnóstico y control de las enfermedades (OIE 2003). La epidemiología de casi todas las enfermedades bacterianas, micóticas, parasitarias y virales de peces de ornato están asociadas con factores que inducen estrés, tales como los cambios bruscos de temperatura, la salinidad, el pH, disminución de los niveles de oxígeno disuelto, manipulación excesiva o incremento en los niveles de materia particulado en el agua (Quintana, 2001).

5.3.1. Estudios sobre *Vibrio fluvialis* en el cultivo de *P. scalare*

Dado los cuadros clínicos provocados por *Vibrio fluvialis*, que, si bien se considera un microorganismo oportunista por su actividad bajo las condiciones ambientales estresantes, se le ubica patológicamente como un patógeno primario por la agresividad que muestra y la alta mortalidad que ocasiona tanto en cultivo intensivo como experimentalmente en *P. scalare* (Negrete *et al.*, 2002).

Negrete, *et al.* (2002), realizaron un estudio debido a que se presentaron fallas en el suministro de energía eléctrica en las instalaciones de varias granjas acuícolas de la zona rural del Estado de México que alteró las condiciones ambientales de los estanques de cultivos, donde se registró la mortalidad de *P. scalare*, los cuales presentaron signos diversos de infección de *Vibrio fluvialis*; otro estudio de Negrete *et al.*, en 2004, evaluaron la resistencia bacteriana de 20 especies aisladas de procesos infecciosos en peces de ornato, en el cual reportan que *Vibrio fluvialis* había desarrollado resistencia a antibióticos como ciprofloxacino, amikacina, tetraciclina, kanamicina y determinaron la presencia de más de 25 plásmidos de resistencia. Por lo que es importante saber e investigar cuales son las medidas de control y prevención de enfermedades, tanto las que solicitan a nivel internacional y nacional, de igual manera el tipo de antibiótico que se puede utilizar para controlar las enfermedades bacterianas en *P. scalare*.

5.4. Control sanitario y manejo de medicamentos para el control de enfermedades bacterianas.

Debido a la necesidad de un adecuado de control sanitario y regulaciones que permitieran identificar y evitar la propagación de patógenos entre países, se creó la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), con el acuerdo internacional firmado el 25 de enero de 1924, misma que en mayo del 2003 se convirtió en la Organización Mundial de Sanidad Animal, conservando su acrónimo histórico de OIE (OIE, 2009).

Esta organización intergubernamental hace las recomendaciones a los países miembros para llevar a cabo el comercio de organismos libres de enfermedades de alto riesgo que afecten a los propios organismos o a las personas, utilizando para ello el Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático) cuyo objetivo es garantizar la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales acuáticos: anfibios, crustáceos, moluscos, peces y productos derivados de estos gracias a una descripción detallada de las medidas sanitarias que las autoridades veterinarias de los países tanto importadores como exportadores deben aplicar para evitar la transmisión de agentes patógenos a los animales o a las personas e impedir la instauración de barreras sanitarias injustificadas (Código Acuático, 2006).

En términos legislativos respecto a la acuicultura, en México encontramos que debe cumplir con lo reglamentado en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-010-PESC-1994, que establece los requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato en el territorio nacional, que están sujetos a su importación, a fin de minimizar los riesgos de introducir y dispersar algún agente causal de enfermedad. Además, esta norma se complementa con la Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1994 que regula la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de

enfermedades certificables y notificables, en la importación de organismos acuáticos vivos en cualquier fase de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en México.

En el Estado de Morelos, de las 200 Unidades Productoras Acuícolas (UPAs) que existen, sólo 11 cuentan con un certificado sanitario por parte del Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria (SENASICA), cuyo principal requisito es contar con sistemas de bioseguridad que ayuden a impedir que ingresen patógenos a las instalaciones y causen enfermedades.

Para controlar las enfermedades bacterianas, los acuicultores hacen uso de antibióticos. El uso de antibióticos en la acuicultura dependerá de las normas locales, que varían mucho entre los distintos países. Como resultado de la creciente conciencia de que los antibióticos deben usarse con más cuidado, hay una tendencia hacia más estrictas regulaciones sobre el uso de antibióticos en el sector de la acuicultura y de la presencia de residuos de antibióticos en productos de acuicultura (FAO, 2002). En la tabla 3 se muestra algunos antibióticos utilizados en acuicultura de ornato, y las dosis recomendadas.

Tabla 3. Dosis de administración de antibióticos a peces de ornato.

Antibiótico	Dosis oral (en alimento)	Baños de inmersión
Amoxicilina	1.2 - 3.6 g lb ⁻¹ en alimento por día durante 10 días	No recomendado
Ampicilina	150 mg lb ⁻¹ en alimento por día durante 10 días	No recomendado
Florfenicol (Aquaflor)	680 mg lb ⁻¹ por 10 días	No recomendado
Kanamicina	300 mg lb ⁻¹ en alimento por día durante 10 días	189-378 mg por galón cada tres días (solo tres tratamientos)
Neomicina	1.5 g lb ⁻¹ en alimento por día durante 10 días	2.5 g por cada 10 galones cada tres días (solo tres tratamientos)
Nitrofurazona	1.12 g lb ⁻¹ en alimento por día durante 10 días	189-756 mg por cada 10 galones durante una hora, repetir diario durante 10 días o 378 mg por cada 10 galones durante 6 a 12 horas: Repetir diariamente durante 10 días.
<p>Nota: Por regla general, los tratamientos orales / alimenticios son más eficaces, más eficientes, menos perjudiciales para la calidad del agua y preferibles a los tratamientos de baño. Recordar que, los tratamientos de baños de inmersión pueden dañar la filtración biológica. Además, algunos de estos fármacos están disponibles localmente en alimentos medicados premezclados. Referencia de la dosis: Carpenter <i>et al.</i> 1996; Darwish y Hobbs 2005; Darwish e Ismaiel 2003; Noga 2010; Post 1987; Stoskopf 2013; y Universidad de Florida 2005.</p>		

Debido a lo anterior, es necesario buscar nuevas alternativas para prevenir y controlar las infecciones bacterianas en los peces, dentro de las tecnologías más innovadoras en los últimos años se encuentra el uso de nanopartículas que ha probado efectos positivos en áreas de la biorremediación y calidad de agua por lo que pudiera ser una tecnología aplicable en acuicultura.

5.5. Uso de las nanopartículas de plata en acuicultura

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (por sus siglas en inglés FAO), en el 2014, la producción de organismos acuáticos se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Aunque esta actividad se considera relativamente nueva en comparación con la pesca o la ganadería, ésta se ha venido transformando constantemente para hacer frente a diversas problemáticas como las enfermedades causadas por bacterias o virus, la contaminación de efluentes por los residuos de la producción y el excesivo uso del agua recirculada (CONAPESCA, 2008). Por lo que la industria acuícola requiere adoptar tecnologías de última generación para superar las dificultades que limitan su desarrollo.

La nanotecnología es una de estas áreas que muchos expertos en acuicultura están recurriendo (Hand *et al.*, 2012). Si bien las nanopartículas pudieran ser aprovechando en diferentes áreas dentro de la acuicultura, son tres áreas principales que se han beneficiado al máximo con la nanotecnología: alimentación, filtros para el mejoramiento del agua de cultivo y efluentes y el control de enfermedades infecciosas (Tabla 2).

En un estudio de Raissy y Mahsa, del 2011, evaluaron el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata en dos patógenos de peces, *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus iniae*. Los efectos antimicrobianos del compuesto se evaluaron por el método de microdilución en caldo y se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) y concentración bactericida mínima (CMB). De acuerdo con los resultados la CMI varió de 1,12 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. garvieae* y 1,12 a 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para los aislados de *S. iniae*. El valor medio de la CIM fue de 2,59 y 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. garvieae* y *S. iniae* respectivamente. Los resultados mostraron que las cepas de *S. iniae* fueron más sensibles a las nanopartículas de plata que las cepas de *L. garvieae*.

Saleh, *et al.*, en el 2011, realizaron una investigación para evaluar el efecto antiparasitario de las AgNPs contra *Ichthyophthirius multifiliis*, un parásito causante de la enfermedad del punto blanco en peces de agua dulce. Determinaron que las AgNPs de 10 y 5 ng L^{-1} presentan un efecto antiparasitario en estudios *in vitro* e *in vivo*.

La utilización de AgNPs obtenidas a partir de síntesis de productos naturales y microorganismos están siendo aplicadas, teniendo resultados positivos en la acuicultura, algunos estudios como Vaseeharan *et al*, en 2010, utilizaron AgNPs, sintetizadas con *Camellia sinensis* para evaluar el efecto antibacteriano contra *Vibrio harveyi* en *Fenneropenaeus indicus* (Camarón de la India) infectados. En pruebas *in vivo* demostraron que la presencia de estas partículas en una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibe el crecimiento bacteriano en un 70%. Sivaramasamy, *et al*, en 2016 utilizó *Bacillus subtilis*, microorganismo no patógeno para la síntesis de las AgNPs, para evaluar el efecto antibacteriano contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, en *Litopenaeus vannamei* (Camarón patiblanco) infectados. En la infección experimental el % de supervivencia en el grupo control ($10 \pm 0.321\%$) mientras que con AgNPs fue de 90.66 ± 0.523 y 71 ± 0.577 .

Otras aplicaciones que se está utilizando para mantener la estabilidad de las AgNPs es encapsularlas en polímeros biocompatibles. Barakat, *et al*, en 2016, sintetizaron AgNPs, con quitosano-*squilla mantis* (CSQ-AgNPs), para evaluar el efecto antibacteriano contra *Vibrio anguillarum* en *Dicentrarchus labrax* (Róbalo) infectados. Este grupo de investigadores administró las CSQ-AgNPs mediante alimentos enriquecidos teniendo como resultado, que los organismos no infectados y los organismos infectados tuvieron un % de supervivencia de $74,5 \pm 1,5$ y $72,5 \pm 2,5$, respectivamente. Daniel, *et al*, en 2016 evaluaron el efecto antiparasitario y antifúngico de AgNPs encapsuladas con almidón. Utilizaron *Carassius auratus* (Pez dorado), infectados con *Ichthyophthirius multifiliis* y *Aphanomyces invadans*. Realizaron baños de inmersión con una concentración de 10 ng, sumergiendo a los peces durante 20 segundos, demostrando que los peces se recuperaban al paso de 3 días sin presentar ningún efecto tóxico que pudiera causar las AgNPs. Dananjaya *et. al* desde el 2014 han utilizado AgNPs encapsuladas con quitosano. En estudios *in vitro* exponiendo las AgNPs a *Vibrio tapetis*, demostrando que la concentración de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ demostró tener efecto antibacteriano. Uno de sus últimos estudios publicados de Dananjaya *et. al.*, en 2017 evaluaron el efecto antifúngico de las AgNPs con quitosano al ponerlas en contacto contra *Fusarium oxysporum*. En las pruebas *in vitro* descubrieron que la concentración mínima inhibitoria de las AgNPs fue de 38.69%, a una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, y en las pruebas *in vivo*, utilizaron pez cebra infectado con el hongo. Realizaron pruebas histológicas para observar el deterioro del micelio del hongo almacenado en el dorso de los peces y encontraron que el hongo se deterioró por estar en contacto con las AgNPs. En tabla 4 se enlistan estudios sobre las AgNPs como agente antimicrobiano.

Tabla 4. Estudios sobre el uso de nanopartículas de plata en el control de patógenos en la acuicultura.

Autor(es)	Características AgNPs	Microorganismo	Resultados
Dananjaya, <i>et al</i> , 2016	AgNPs con quitosano	<i>Alivivibrio salmonicida</i>	CMI, 50 µg mL ⁻¹ y MCB, 100 µg mL ⁻¹
Ravikumar, <i>et al</i> , 2012	Nanopartículas comerciales de Al ₂ O ₃ , Fe ₃ O ₄ , CeO ₂ , ZrO ₂ , MgO,	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>serratia</i> sp.	Las Nps de CeO ₂ , mostraron tener mayor efecto antibacterial en una concentración de 10 µg mL ⁻¹
Soltani, <i>et al</i> , 2009	Nanocid®	<i>Streptococcus iniae</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>S. iniae</i> Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 5 a 0.15 µg mL ⁻¹ , <i>L. garvieae</i> CMB de 10 µg mL ⁻¹ to 0.62 µg mL ⁻¹ , <i>A. hydrophila</i> CMB de 0.31 µg mL ⁻¹ a menos de 0.15 µg mL ⁻¹ , <i>Y. ruckeri</i> CMBs de 2.5 a 0.62 µg mL ⁻¹
Swain, <i>et al</i> , 2014	Nanopartículas de CuO, ZnO, Ag-TiO ₂	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Flavobacterium branchiophilum</i> , <i>Vibrio</i> spp <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Citrobacter</i> spp.	Mostraron efecto antibacteriano en las cepas experimentales
Mahanty, <i>et al</i> , 2013	Nanopartículas sintetizadas con hojas de plantas <i>Mangifera indica</i> , <i>Eucalytus tericonis</i> , <i>Carica Papaya</i> y <i>Musa paradisiaca</i>	<i>Aeromona hydrophila</i>	Las nanopartículas sintetizadas con <i>Carica papaya</i> mostraron tener una actividad antimicrobiana a una concentración de 153.6 µg mL ⁻¹
Vijay Kumara, <i>et al</i> , 2013	AgNPs sintetizadas con <i>Boerhaavia diffusa</i>	<i>A. hydrophila</i> , <i>P.fluorescens</i> y <i>F. branchiophilum</i> .	La concentración de AgNPs (50 µg mL ⁻¹) ha demostrado mayor zona de inhibición de 15 mm para <i>F. branchiophilum</i> seguida por <i>A. hydrophilla</i> (14 mm) y <i>P. fluorescen</i> (12 mm)
Saleh, <i>et al</i> , 2011	AgNPs	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Determinaron que las AgNPs de 10 y 5 ng L ⁻¹ presentan un efecto antiparasitario

Recientemente, se están desarrollando investigaciones para la generación de vacunas para la protección de la carpa asiática usando complejos nanoencapsulados contra la bacteria *Listonella anguillarum* (Rajeshkumar *et al.*, 2008) y también contra el síndrome de la mancha blanca (SMB), un virus que ataca a los camarones. Esta técnica es capaz de proporcionar a la vacuna una barrera adicional de protección para

evitar ser inactivada por la maquinaria metabólica de las especies cultivadas (Rajeshkumar, *et al.*, 2009). Rather, *et al.*, en el 2016 elaboraron AgNPs utilizando como agente reductor *Azadirachta indica* para evaluar el efecto inmunomodular en peces infectados (*Cirrhinus mrigala*) con *Aeromonas hydrophila*. Administrando una concentración de 20 μ L de AgNPs a los peces durante 20 días. La actividad funcional de los parámetros inmunológicos, como el azul de nitro-tetrazolio, actividad mieloperoxidasa, actividad fagocitaria, anti-proteasa y de la lisozima, aumentaron significativamente en peces tratados con AgNPs, teniendo un 73% de supervivencia a la infección.

6. Marco teórico

6.1 Acuicultura

La interacción de la CONAPESCA con la acuicultura ornamental está definida en las disposiciones generales de la Ley de Pesca y Acuicultura Sustentables en su última reforma de abril de 2018, en su Artículo 4° establece: “Acuicultura: Es el conjunto de actividades dirigidas a la reproducción controlada, pre-engorda y engorda de especies de la flora y fauna realizadas en instalaciones ubicadas en aguas dulces, marinas o salobres, por medio de técnicas de cría o cultivo, que sean susceptibles de explotación comercial, ornamental o recreativa”.

6.2. Acuicultura ornamental en México

Tradicionalmente en México se había desarrollado la acuicultura con fines de consumo humano y de esparcimiento, sin embargo también se hace acuicultura ornamental (Negrete *et al.*, 2002). El término “acuicultura ornamental” es un término genérico que describe a el cultivo de aquellos organismos acuáticos con propósitos de ornamento en acuarios, incluyendo peces, invertebrados como corales, crustáceos, moluscos, equinodermos, así como roca viva (EcuRed, 2013).

6.3 *Pterophyllum scalare* (Pez ángel)

6.3.1 Taxonomía

CLASE: *Actinopterygios*

ORDEN: *Perciformes*

FAMILIA: *Cichlidae*

GÉNERO: *Pterophyllum*

ESPECIE: *Pterophyllum scalare*

Sinónimos: *Zeus scalaris* (Schultze, 1823)

Nombre común: Pez ángel

6.3.2. Características de *P. scalare*

El pez *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein), conocido comúnmente como pez Ángel, es un cíclido originario del río Tapajoz, afluente del Amazonas, así como de numerosos riachuelos de la parte norte del Brasil



Figura 1. *Pterophyllum scalare*

(Soriano y Hernández, 2002), con un alto potencial económico en el mundo y se ha constituido a través de los años en uno de los peces más apreciados en el ornato, por su gran belleza, elegancia, su temperamento apacible, compatible con muchas especies y una gran adaptabilidad en cautiverio (Luna-Figueroa, 2003). Lo que lo hacen especie idónea para la comercialización (Zafra y Vela, 2015).

6.3.3. Características de Cultivo de *P. scalare*

Las condiciones ideales para su cría y reproducción en cautiverio son las siguientes: pH de 6.8 a 7.2, la dureza del agua no debe ser mayor a 100 mg L⁻¹ de carbonatos, la temperatura promedio entre 26 a 28° C, los niveles de nitratos deben estar por debajo de los 100 mg L⁻¹ (Pérez, 2002). Si bien no existen estadísticas que estimen la aportación de esta especie a la producción ornamental nacional, se sabe a través de los comercializadores que es una de las de mayor demanda y que tienen muy buen precio en el mercado ya que se venden a un precio de menudeo entre los 50 a 80 pesos mexicanos por pez, la variación en el precio depende del estadio de desarrollo. Pese a lo antes descrito, Ribeiro *et al.*, (2007), mencionan que la demanda comercial de pez ángel ha incrementado la intensificación de la producción de esta especie, lo que ha traído como consecuencia el desarrollo de procesos infecciosos que ocasiona mortalidad y graves pérdidas económicas.

6.4. Proceso salud- enfermedad (Triada ecológica)

El concepto general de salud y enfermedad ha evolucionado a un concepto de multi causalidad, explicado a través de lo que se conoce como “triada ecológica”, que toma en consideración el hospedero, el agente y el ambiente (Suzán *et al.*, 2000). Entendiendo como hospedero al organismo expuesto a los factores que gravitan sobre él, de cuyo equilibrio complejo depende su estado de salud o enfermedad. Sin embargo, una serie de factores intrínsecos del hospedero aumentan o reducen la susceptibilidad frente a la agresión externa, estos factores son el sexo, la edad, el estado nutricional, aspectos genéticos, la conducta, los antecedentes patológicos y de exposición a factores de riesgo, entre otros. El agente causal se designa como aquel capaz de producir aisladamente o asociado con otros microorganismos y producir enfermedad; e incluye diferentes factores como la patogenicidad, virulencia y dosis infectiva del microorganismo. Finalmente, cuando hablamos del ambiente se refiere al conjunto de todas las condiciones externas en donde ocurre la interacción entre agente y hospedero (Armijo, 1994; Vargas, 2004). De aquí resulta intrincado definir y concebir el estado de salud como una condición de equilibrio entre todos los factores dependientes de la triada ecológica (Armijo, 1994), por lo que el estado de salud o de enfermedad, depende del equilibrio entre hospedero, el agente causante de infección y ambiente. La modificación de uno de ellos producirá cambios

en los otros que pueden determinar la enfermedad (Vargas, 2004). En el caso particular de los organismos acuáticos en cultivo, Snieszko (1973), debate sobre las interrelaciones entre patógenos, hospederos y ambiente, proponiendo un modelo del estado de salud-enfermedad de estos organismos (Figura, 2) (Del Río, 2004).



Fig. 2 Triada ecológica

6.5. Enfermedades en *P. scalare*

Uno de los principales problemas del cultivo de peces ornamentales en general es la aparición de enfermedades de tipo infeccioso producidas por bacterias, virus, hongos y parasitarios. Algunas enfermedades de origen bacteriano y viral como pueden ser: Septicemia hemorrágica, ascitis causada por *Pseudomonas fluorescens* en los peces presentan úlceras por todo el cuerpo, enrojecimiento de la base de las aletas y pérdida de apetito y la enfermedad escalar donde el agente causante es un herpesvirus. Cursa con pérdida del equilibrio, los peces nadan cabeza abajo, presentan hemorragias superficiales y mueren (Rioja, 1998), entre otras. Estas enfermedades son consideradas de mayor riesgo y patogenicidad debido a que ocasionan hasta el 100% de mortalidad de los organismos por la falta de tratamientos adecuados (Del Río-Rodríguez, 2004; Ramaiah, 2006; Harvell *et al.*, 2007). Además, la carencia en infraestructura y capacitación técnica en la cuantificación y diagnóstico de microorganismos patógenos ocasiona graves problemas de sanidad acuícola (Lango, *et al.*, 2012).

6.5.1. Enfermedades bacterianas

Al igual que la mayoría de los peces, *P. scalare* es susceptible a las infecciones bacterianas, causadas por bacterias oportunistas, patógenas estrictas y de patología secundaria, que incluye los géneros: *Aeromonas*,

Vibrio, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Edwardsiella*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*. (Samanidou *et al.*, 2007). Cabe destacar que la mayoría de las bacterias patógenas de peces son habitantes naturales del medio acuático, ya sea de agua dulce o marina (Inglis, *et al.*, 1993), por lo que, la calidad del agua debe ser evaluada de forma rutinaria durante la investigación de los brotes de enfermedades en los peces.

Estas enfermedades son complejas en los peces y requiere la interacción de diversos factores, entre ellos el medio ambiente, el hospedero (la función del sistema inmunológico, la susceptibilidad, la salud etc.), y el agente patógeno específico. El estrés puede provocar la supresión de la inmunidad y es crítico en la patogénesis de la enfermedad bacteriana en peces con malas condiciones ambientales (Roberts, *et al.*, 2009)

6.5.2. *Vibrio fluvialis*

V. fluvialis es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilo curvado, anaerobio facultativo, con presencia de 1 a 3 flagelos. Crecen a temperaturas entre los 20°C y 30°C. En agar sangre, las colonias son grisáceas y circular, de 2-3 mm de diámetro y las colonias en agar tiosulfato citrato sales biliares (TCBS) son de color amarillo o verde. Es causante de la Vibriosis; enfermedad en los peces ornamentales, caracterizada por producir una septicemia sistémica generalizada y con una elevada tasa de mortalidad de casi el 90% entre las 24 a 48 horas, produciendo, distensión abdominal, exoftalmia, furúnculos y petequias, así como nado errático y órganos internos hemorrágicos. El periodo de incubación es de 3 a 8 días y depende de la temperatura del agua, virulencia de la cepa y grado de estrés en el que se encuentra el pez (Kinkelin *et al.*, 1985).

Dado los cuadros clínicos provocados por *V. fluvialis*, que si bien se considera oportunista por su actividad bajo las condiciones ambientales estresantes, se le ubica patológicamente como un patógeno primario por la patogenicidad y virulencia que tiene esta bacteria y la alta mortalidad que ocasiona tanto en cultivo intensivo como experimentalmente en *P. scalare* (Negrete *et al.*, 2002).

6.5.3. Diagnóstico y control de *V. fluvialis*

Se recomienda realizar el cultivo del microorganismo y pruebas de sensibilidad. El cultivo de la bacteria ayuda a determinar e identificar cuál es la bacteria que está produciendo la enfermedad y las pruebas de 'sensibilidad ayudan a definir el tratamiento de las bacterias con una serie de antibióticos para determinar cuál funciona mejor. Aunque el cultivo y las pruebas de sensibilidad suelen durar dos o tres días, son, de lejos, los mejores métodos para la selección de un antibiótico que tendrá éxito y económicamente tratar una infección. Para controlar la *Vibriosis*, los antibióticos como las fluoroquinolonas, sulfonamidas, penicilinas y

otros son ampliamente utilizando los cuales son administrados rutinariamente e incorporados en el alimento para los peces o son administrados directamente dentro de los estanques de cultivo (Yanong, 2003)

6.6. Nanotecnología y Nanopartículas de plata (AgNPs)

Cuando describimos a los conceptos de nanotecnología y nanociencias hay que hacer referencia al tamaño de partícula con el cual se trabaja que es a una escala nanométrica (entre 1 y 100 nanómetros) (Savage *et al.*, 2007). El prefijo “nano” indica una medida (la milmillonésima parte de algo), por ello la nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinar cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabaja (Waldner, 2013). El término “nanotecnología” fue usado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi, un investigador de la Universidad de Tokio, quien señalaba sobre la posibilidad de manejar materiales a nivel nanométrico, utilizando un amplio rango de herramientas, técnicas y aplicaciones, aunque algunos científicos encuentran más apropiado llamarlas nanotecnologías, y entre las disciplinas involucradas se encuentran la química, la física, la biología, la medicina y la ingeniería, entre otras (Mendoza y Rodríguez, 2007).

Lo que caracteriza a la nanotecnología como gran novedad son al menos cuatro aspectos. En primer lugar, se trata de construir de lo más pequeño (átomos y moléculas) a lo más grande (producto final) —proceso *bottom-up*—, en lugar de comenzar por la materia física tal como viene dada en la naturaleza, según sus estructuras de unión propias, y reducirla al tamaño de los objetos de uso, como se venía haciendo hasta ahora (proceso *top-down*). A pesar de que este camino ya se conocía en procesos químicos, la novedad radica en que ahora los átomos y las moléculas se pueden manipular de manera directa para construir productos (Pidgeon, *et al.*, 2004) En segundo lugar, en ese nivel atómico no hay diferencia entre la materia biótica y la abiótica, de manera que resulta potencialmente posible aplicar procedimientos biológicos a los procesos materiales, o interferir con materiales en los cuerpos vivos, adaptando estos últimos a determinados fines u ofreciendo ventajas particulares, o también crear vida artificial para desempeñar funciones específicas. En tercer lugar, cualquiera de los elementos químicos manipulados en el nivel nano despliega propiedades físicas diferentes que las correspondientes a una escala mayor. Puede que sea más resistente, ofrezca mayor conductividad eléctrica, cambie de color, etc. Por último, la nanotecnología combina varias tecnologías y ciencias, como informática, biotecnología y tecnología de materiales (Invernizzi, y Foladori 2006).

Dentro de la nanotecnología se ha estado desarrollando la producción y la utilización de partículas de tamaño nanométrico. Recientemente se han desarrollado enfoques para comprender y controlar la materia a

dimensiones nanométricas ((Pidgeon, *et al*, 2004)). En este rango de tamaño de partículas presentan propiedades físicas y químicas novedosas que pueden ser utilizadas en diferentes aplicaciones nanotecnológicas debido a sus reducidas dimensiones y a su elevado número de átomos superficiales, lo que les confiere propiedades particulares. Los nanomateriales pueden dividirse en dos grandes grupos: de tamaño nanopartículas ultrafinas que están presentes normalmente en la naturaleza y no producidos intencionalmente y nanopartículas diseñadas que se producen en una manera controlada (Oberdörster, 2010). Actualmente se han comenzado a utilizar las nanopartículas de metales (NPs), con propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas, entre muchas otras. En 1857 Michael Faraday llevo a cabo el primer estudio de NPs, donde indica la preparación y propiedades del oro coloidal (Nalwa, 2001).

Las nanopartículas metálicas de plata (Ag), oro (Au) y cobre (Cu), han sido ampliamente probadas (Mallick *et al.*, 2012). Dentro de las cuales, las nanopartículas de plata (AgNPs), son de las más estudiadas por sus propiedades particulares.

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan dispares como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. Incluso civilizaciones antiguas como los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la calidad del agua. Esto debido a que, al almacenar el agua en vasijas de plata, se mantenía limpia y sin el ingreso de microorganismos patógenos. Lo anterior, fue el punto de partida actual para el desarrollo de nanomateriales basados en plata (Monge, 2009).

Las AgNPs son de interés debido a sus propiedades únicas como son: la superficie de la partícula, la distribución del tamaño de partícula, la forma, composición, partículas de recubrimiento/nivelación, aglomeración, la tasa de disolución, reactividad de partículas en solución, eficiencia de liberación de iones, tipo de células, y el tipo de agentes reductores utilizados para la síntesis de AgNPs (Carlson, *et al*, 2008).

Para la obtención de las AgNPs se realizan síntesis por métodos químicos, físicos y biológicos. Sin embargo, métodos de síntesis química son los más comúnmente utilizados (Shalan *et al.*, 2016). Después de la síntesis, caracterización de AgNPs es necesario, porque las propiedades fisicoquímicas de una partícula podrían tener un impacto significativo en sus propiedades biológicas. Para evaluar los nanomateriales sintetizados se han utilizado técnicas analíticas, incluyendo la espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), etc. (Sapsford, *et al*, 2011).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado tener un efecto antimicrobiano contra bacterias, virus y hongos (Gong *et al.*, 2007). Se han utilizado como una medida eficaz con efecto antibacterial de amplio espectro, para bacterias Gram positivas y Gram negativas (Marambio-Jones, *et al.*, 2010). Actualmente las AgNPs se utilizan en diferentes productos como son: apósitos para heridas, los filtros de tratamiento de agua, biorremediación, catalizadores, sensores, tintas, productos farmacéuticos entre otros. (Scown *et al.*, 2010). Esta característica se ha vuelto de gran interés de los investigadores, debido a la creciente resistencia microbiana contra los antibióticos y el desarrollo de cepas resistentes (Gong, *et al.*, 2007).

La actividad antimicrobiana de las AgNPs se debe a:

- A) Tamaño: Las AgNPs de menor tamaño tienen mayor superficie de contacto. Esto se añade a la posibilidad de que AgNPs con tamaños pequeños pueden penetrar libremente en el interior de la membrana celular de las bacterias (Navarro, *et al.*, 2008).
- B) Forma: La eficacia antimicrobiana de las AgNPs se ha confirmado que es dependiente de la forma. En estudios que utilizaron en forma diferencialmente las nanopartículas, sugirió que la geometría es más eficaz que las nanopartículas de plata triangular (Morones, *et al.*, 2005).

Se han demostrado que las AgNPs pueden llegar a actuar en contra de las bacterias a través de múltiples mecanismos, y por ello pueden evadir la resistencia bacteriana, en contraste con los antibióticos que lo hacen a través de uno sólo (Knetsch y Koole, 2011). El más estudiado es la toxicidad por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son subproductos del metabolismo respiratorio de los microorganismos. La importancia de la generación de ROS es la alteración de las enzimas producidas en la cadena respiratoria a través de interacciones directas con grupos tiol en estas enzimas o la compactación de super oxidoradical de las enzimas como el superóxido dismutasas (Park *et al.* 2010). El nivel de ROS puede ser controlado por las defensas antioxidantes de las células, tal glutatión/glutatión disulfuro (relación GSH/GSSG) y el exceso de la producción de ROS pueden producir estrés oxidativo (Nel *et al.*, 2006). La generación de radicales libres adicionales pueden atacar lípidos de membrana y conducir a una ruptura de la membrana y la función mitocondrial o provocar daños en el ADN (Mendis *et al.*, 2005).

Actualmente, también se están estudiando otras aplicaciones de las nanopartículas, como en el diagnóstico de enfermedades bacterianas, micóticas y virales en peces o como utilización de vehículo para vacunas y para otros fármacos (Shalan *et al.*, 2016). Por tanto, las AgNPs proporcionan una reducción sustancial de la viabilidad de las bacterias.

7. Metodología:

7.1. Áreas de trabajo

La síntesis y caracterización de las AgNPs, así como la evaluación *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Departamento de Atención a la Salud, de la UAM-Xochimilco. El cultivo de peces y la evaluación *in vivo* se llevó a cabo en el laboratorio de Alimento Vivo y Análisis Químico del Departamento del Hombre y su Ambiente de la UAM-Xochimilco.

7.2. Síntesis de Nanopartículas:

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron preparadas utilizando el método de reducción química basados en la técnica de Lee y Meisel (1982). Se preparó soluciones de 90 y 180 ppm de AgNO_3 (EMDAR MERCK) en 1L de agua destilada, se agregaron 20 mL de citrato de sodio al 1% a la solución, se llevaron a ebullición por una hora, se enfriaron y se aforaron a volumen.

7.3 Caracterización de Nanopartículas de Plata.

7.3.1 Análisis de Espectro Ultravioleta-Visible (UV-Visible)

Se determinó la formación de las AgNPs. Se preparó una dilución de la solución de AgNPs a 1:10 y de esta solución se tomaron 3 mL y se llevará a 100 mL con agua destilada. Se utilizaron soluciones de referencia del precursor de plata (AgNO_3) y se utilizó agua destilada como blanco. Se obtuvo un barrido espectrofotométrico de la solución de las AgNPs a una longitud de onda que va de 300 nm a 700 nm en un espectrofotómetro marca Beckman Coulter DU730.

7.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para determinar la superficie morfológica de las AgNPs se realizó por SEM en un equipo marca Jeol modelo JSM-7401f). Se analizó las dos concentraciones de AgNPs y se obtuvieron imágenes tridimensionales.

7.3.3. Espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Se determinó los tipos de vibraciones que pudieran aparecer entre las nanopartículas de plata y el precursor de Ag (AgNO_3). Se realizó en un equipo IRAffinity-1S, Shimadzu®, modelo 4350. Se utilizó el aditamento ATR (Attenuated Total Reflection) para muestras líquidos. Se determinó la absorbancia en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} , empleando 40 escaneos para cada medición. Se analizó AgNO_3 , y AgNPs para hacer las comparaciones.

7.3.4. Tamaño de partículas.

La distribución del tamaño de partícula se determinó por difracción de luz láser (Horiba, Partica LA 950) equipo que mide en un intervalo de 0.01 μm hasta 3000 μm , para ello se tomaron 16 mL de muestra cada muestra de AgNPs (I.R = 1.35) y se colocaron en una celda sin realizar ninguna dilución. Los experimentos se realizaron por triplicado para obtener una distribución media de tamaño en volumen.

7.4. Obtención de *Vibrio fluvialis*

La cepa *Vibrio fluvialis* QHL19 que se utilizó en este estudio, se obtuvo previamente en el laboratorio de Alimento vivo y Análisis Químico del Departamento del Hombre y su Ambiente de UAM-Xochimilco, a partir de muestras de riñón de peces enfermos.

7.5. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las AgNPs

Se realizó la prueba de susceptibilidad por el método Kirby-Bauer de difusión en disco, de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012) (M02-A11). Se preparó un inóculo de *Vibrio fluvialis* ajustando a una concentración de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC mL^{-1}) utilizando un equipo Densimat (Biomérieux), y se sembró estriando toda la superficie de las placas con medio agar Müller-Hinton. Se prepararon las soluciones de AgNPs de las concentraciones que se probaron y se colocaron sensidiscos de 0.6 cm de diámetro previamente impregnados con la suspensión de cada concentraciones de AgNPs sintetizadas, así como los sensidiscos para la solución de referencia de AgNO_3 a las mismas concentraciones. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Se determinó el tamaño del halo de inhibición, que fue proporcional a la sensibilidad de la bacteria *Vibrio fluvialis*.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de las AgNPs se utilizó el método de macrodilución de acuerdo al Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI, 2012), (M07-A9). Se preparó un inóculo *V. fluvialis* ajustando a una concentración de 0.5 McFarland utilizando un equipo Densimat (Biomérieux). Se realizaron diluciones seriadas de las soluciones de AgNPs en 8 tubos con 1 mL de caldo Müller Hinton; posteriormente se le agregó 1 mL del inóculo de la bacteria a una dilución (1:150) a cada uno. Se dejaron incubar a 37°C por 24 h, después de la incubación, estos fueron examinados para observar el crecimiento microbiano.

7.6. Cinética de las AgNPs ante *V. fluvialis*.

Para determinar la cinética de crecimiento de *V. fluvialis* en contacto con las AgNPs, se inoculó *V. fluvialis* al medio caldo TBS (Marca Becton Dickson) y se dejó incubar durante 24 h a 37°C. Posteriormente se ajustó la concentración a 1×10^8 UFC mL⁻¹ y se adicionó 50 µl de las soluciones AgNPs de 90 y 180 ppm a los tubos. El crecimiento de la bacteria fue monitoreado por un equipo Densimat, durante 24 h.

7.7. Obtención de peces

Los peces requeridos para esta investigación se obtuvieron de un centro productor de peces ornamentales de la Ciudad de México. 150 peces juveniles de la especie *Pterophyllum scalare* se mantuvieron por un periodo de aclimatación de 15 días, bajo las siguientes condiciones en la calidad del agua: pH 7, oxígeno disuelto 5 mg mL⁻¹ y 0.3 ppm de nitratos y nitritos. Los peces fueron alimentados diariamente con una dieta comercial para la especie, tomando en consideración el 10% de su peso.

7.8. Actividad antimicrobiana *in vivo* de las AgNPs

Los peces fueron distribuidos al azar en acuarios de 40 L de capacidad (8 organismos /acuario.) El experimento contó con un tratamiento control (sin nanopartículas) un control negativo, un control positivo tratado con el antibiótico (Ciprofloxacino, Dosis 500 mg) y dos tratamientos con nanopartículas a concentraciones de 90 y 180 ppm (Dosis 50 mL/40 L). Previo al tratamiento se indujo la infección experimental en los peces inoculando la cepa *Vibrio fluvialis* a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

Tomando como referencia el cuadro clínico que se manifiesta de la enfermedad, se observaron durante las primeras 24 h posteriores a la exposición del patógeno y se tomó nota de los signos y lesiones que se pudieron observar en el experimento. En la tabla 3 se muestran los signos y lesiones que corresponden.

Cada tratamiento contó con tres réplicas y el experimento se llevó a lo largo de un periodo de 7 días. A partir del inicio del experimento se registrarán, los signos y lesiones de enfermedad presentados por los peces con el fin de caracterizar el cuadro clínico del proceso infeccioso. A cada una de las lesiones y signos observados se categorizó considerando el grado de daño causado por la bacteria, según lo reportado por Vázquez *et al* 2010 (Tabla 5)

Tabla 5. Lesiones y signos para caracterizar el cuadro clínico de los peces

Signos	Lesión
<ul style="list-style-type: none">• Nado errático,• Abdomen distendido• Anorexia	<ul style="list-style-type: none">• Hemorragias en las aletas• Hemorragias en los ojos• Aletas deshilachadas• Furúnculos• Lesiones en escamas

Fuente: Vásquez *et al.*, 2010; Fuentes y Pérez, 1998; Carnevia *et al.*, 2010.

7.9. Evaluación de la toxicidad de las AgNPs en *P. scalare*

P. scalare utilizados en el estudio se obtuvieron de un productor local de la Cd. de México. Se utilizaron 90 peces, que se mantuvieron en un periodo de aclimatación de 15 días con las mismas condiciones de calidad de agua anteriormente mencionadas. Se verificó que los peces seleccionados no presentaran ningún signo de lesión o enfermedad para este estudio. La prueba de toxicidad se realizó con 10 organismos en cada acuario con 3 réplicas aplicando las concentraciones de AgNPs de 90 y 180 ppm y los tratamientos control donde no se aplicó ningún tratamiento. Las lecturas definitivas de prueba toxicológica se monitorearon a las 24, 48, 72 y 96 de exposición, registrando los valores de mortalidad. Posterior a las 96 h se selección de manera aleatoria 3 peces para realizar una disección y revisar órganos internos de los peces (hígado, vesícula e intestino).

8. Resultados:

8.1. Síntesis de las AgNPs:

Se obtuvieron dos concentraciones de AgNPs: a 90 y 180 ppm y se observó que dependiendo de la concentración de Ag utilizada para sintetizar se tendrá una coloración diferente (Figura 3).

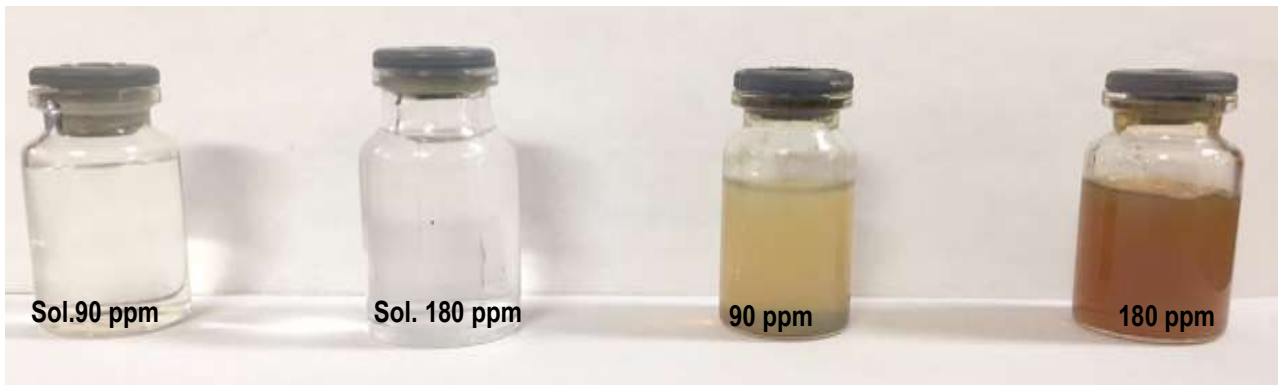


Figura 3. Imagen de AgNPs en las diferentes concentraciones.

8.2. Caracterización de AgNPs:

8.2.1. Espectro UV Visible:

Con relación a los picos de plasmón obtenidos en el espectro de UV-Visible, se observa que en el caso de las AgNPs de 90 ppm, se obtuvo un pico de plasmon de 422 nm y en las AgNPs de 180 ppm, fue a los 427 nm. Las soluciones de plata de 90 y 180 ppm, no presentan ningún pico de absorbancia, en todo el rango de luz ultravioleta y visible.(Figura 4).

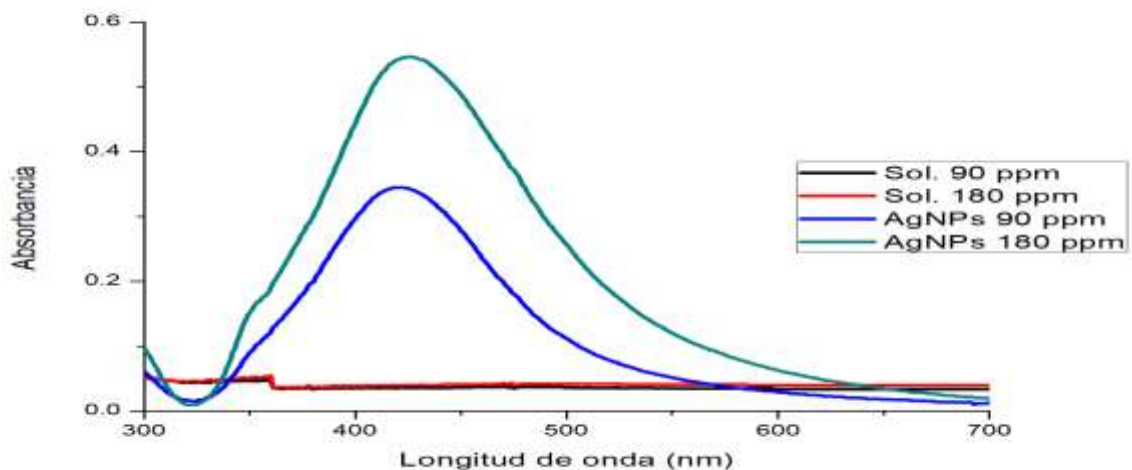


Fig. 4 Espectro UV-Visible de AgNPs

8.2.2. Distribución del tamaño de partícula

La caracterización por dispersión de luz láser indicó que la distribución de tamaño de la población de las AgNPs a una concentración de 90 ppm varía entre 60.7 y 155.8 nm y cuando la concentración es de 180 ppm varía entre 63.3 y 170.8 nm. En las figuras 5 y 6 son gráficas representativas la distribución de tamaño de partícula de las AgNPs y en la tabla 6 a y b, se compilan los deciles D_{10} , D_{50} y D_{90} .

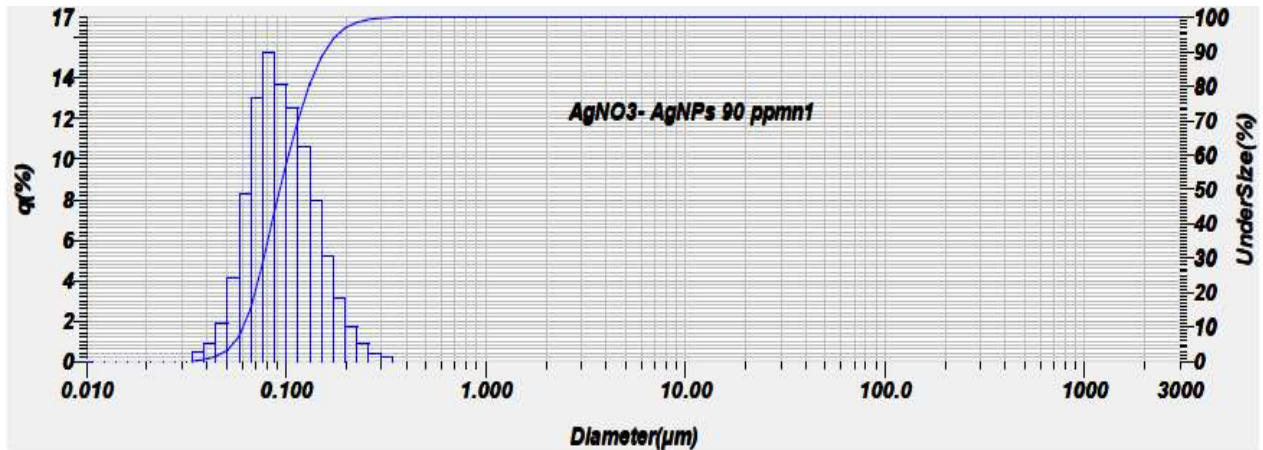


Fig. 5 Gráfica del tamaño de partícula de la población de las AgNPs a 90 ppm

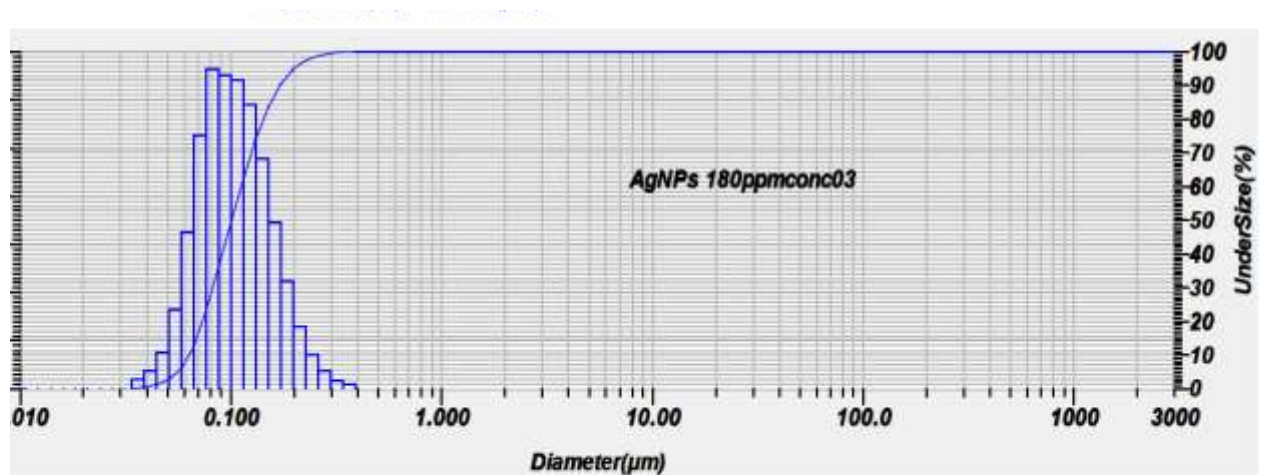


Fig. 6 Gráfica del tamaño de partícula de la población de las AgNPs a 180 ppm

Tabla 6. Distribución de tamaño de partícula AgNPs 4a) AgNPs a 90 ppm y 4b) AgNPs a 180 ppm

4a) AgNPs a 90 ppm	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	4b) AgNPs a 180 ppm	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)
1	60.7	92.8	155.8	1	63.6	101.3	171
2	60.7	92.8	155.9	2	63.2	100.6	170.4
3	60.7	92.7	155.8	3	63.2	100.8	171
Promedio	60.70	92.77	155.83	Promedio	63.3	100.9	170.8
Desviación std	0.000	0.058	0.058	Desviación std	0.188	0.294	0.282
% CV	0.000	0.062	0.037	% CV	0.002	0.002	0.001

8.2.3. Espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 7, se muestra el espectro IR de las AgNPs de cada concentración, al igual que el espectro de las soluciones de referencia y la solución de citrato de sodio. Esta prueba detecta la formación de las diferentes interacciones vibracionales que presentan los elementos de las AgNPs.

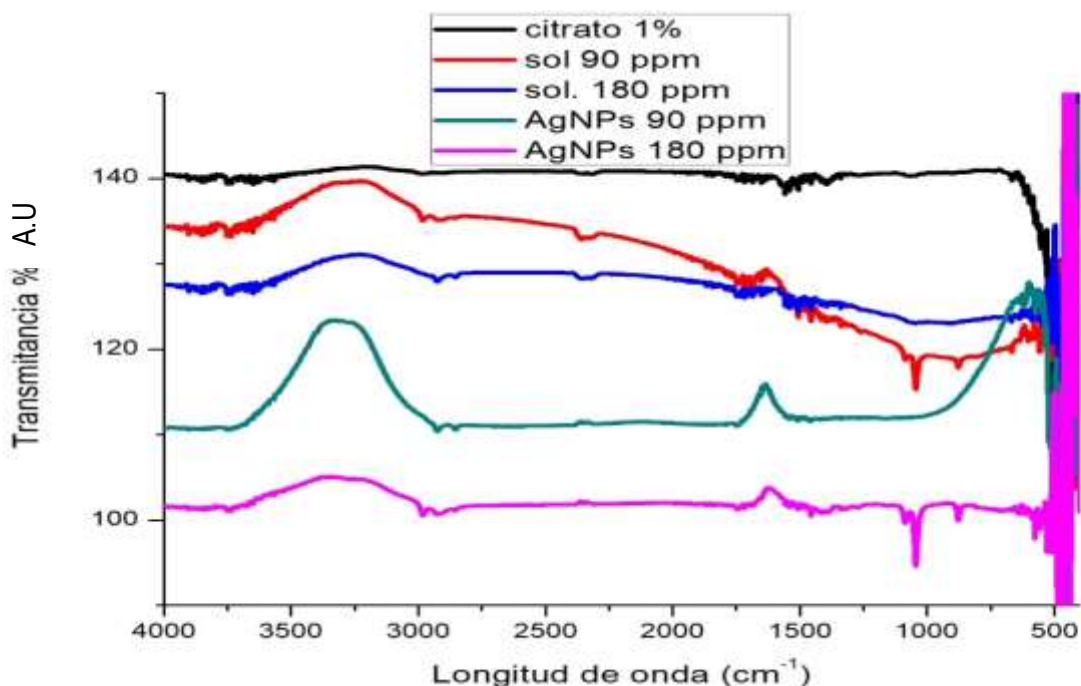


Fig. 7 Espectro IR de las soluciones de referencia, solución de citrato de sodio y AgNPs de 90 y 180 ppm.

8.2.4. Microscopia electrónica de Barrido (SEM)

Los resultados obtenidos en SEM indican que las AgNPs a una concentración de 90ppm tienen una forma mayoritariamente esférica, aunque también se observan algunas de forma cubica y la formación de conglomerados. El tamaño de las AgNPs se encuentra en un intervalo entre 4 y 15 nm. En comparación las AgNPs a una concentración de 180 ppm que presentan la forma cubica en mayor proporción, se observan algunas de forma esférica, hexagonal y alargadas, además de la formación de conglomerados. El tamaño de las AgNPs se encuentran en un intervalo entre 13 y 20 nm. (Figuras 8 y 9)

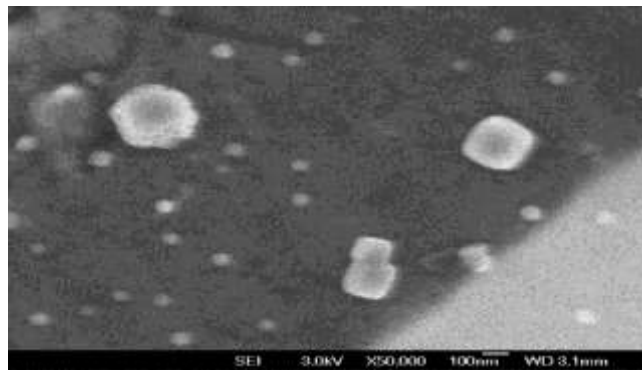


Fig. 8 Imagen de SEM de las AgNPs a 90 ppm

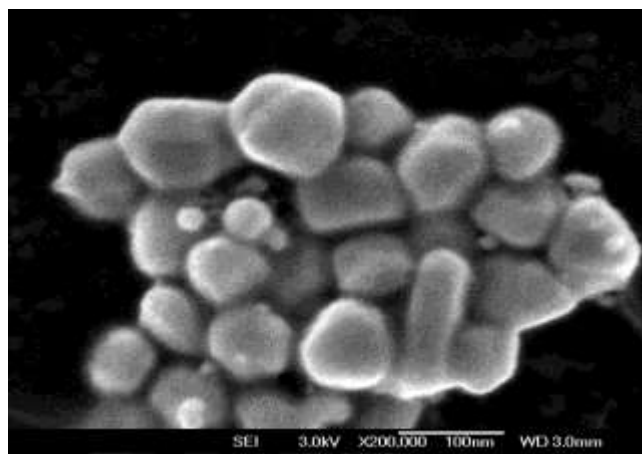


Fig. 9 Imagen de SEM de las AgNPs a 180 ppm

8.3. Actividad antimicrobiana *in vitro*:

8.3.1. Difusión en disco

En tabla 7 se muestra la actividad antimicrobiana de las dos concentraciones de AgNPs sobre *V. fluvialis*. Las AgNPs de 90 ppm de 8.66 mm y en las de 180 ppm un halo de inhibición de 14.3 mm. Las soluciones de AgNO₃ de 90 y 180 ppm no presentaron ninguna actividad.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de AgNPs sobre *V. fluvialis*, Difusión en disco

Tratamiento	Halo de inhibición
AgNPs 90 ppm	8.66±0.57 mm
AgNPs 180 ppm	14.3±1.15 mm
Sol. AgNO ₃ 90 ppm	0 mm
Sol. AgNO ₃ 180 ppm	0 mm

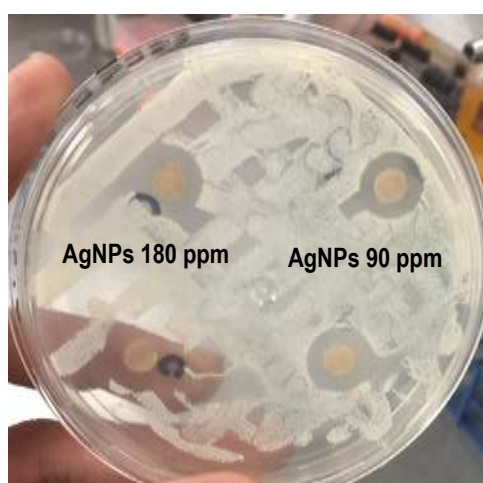


Fig. 10 Halos de inhibición de las AgNPs en contacto con *V. fluvialis*

8.3.2. Macrodilución

Se determinó la CMI de las dos concentraciones de AgNPs, obteniendo que la concentración de 45 ppm es la que mostró dicha actividad. Se determinó la CMI de las dos concentraciones de AgNPs, obteniendo que la concentración de 45 ppm es la que mostró dicha actividad.

8.3.3. Cinética de *V. fluvialis* ante AgNPs

En la figura 11 se observa el resultado de la cinética de crecimiento en contacto con las AgNPs. Se mantuvo en monitoreo el tiempo de crecimiento de *V. fluvialis* en contacto con las concentraciones de AgNPs durante 8 h continuas y un monitoreo a las 24 mostrando que ambas concentraciones a partir de la 5 h inhiben el crecimiento de *V. fluvialis*, en menos de la mitad que el crecimiento que presenta el control. Mostrando que

las AgNPs tienen un efecto bacteriostático, lo cual significa que inhiben el crecimiento de *V. fluvialis*, alrededor del 50%.

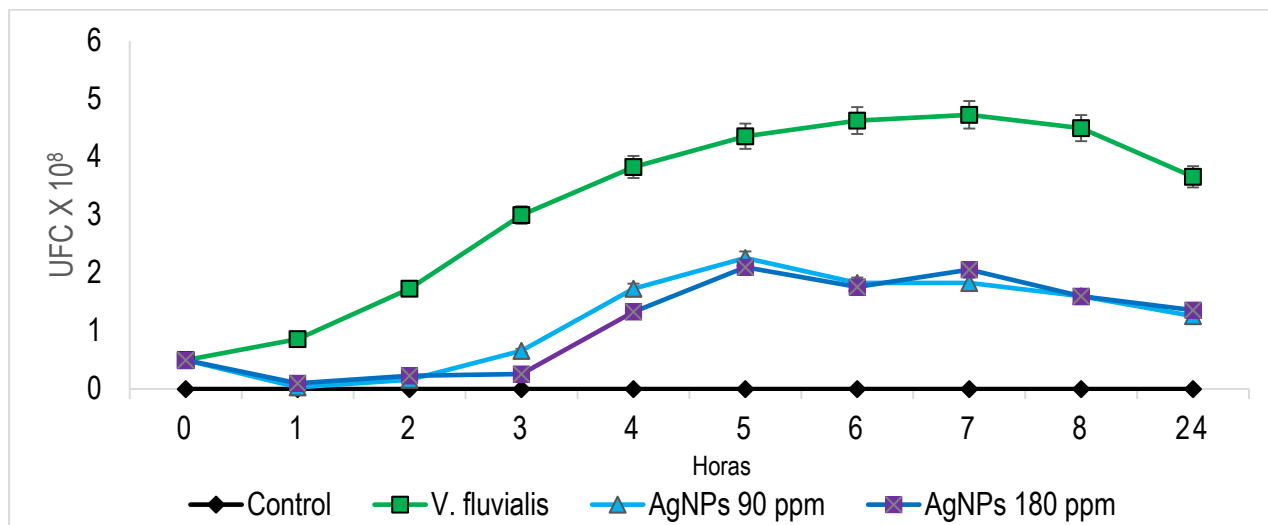


Fig. 11 Gráfica de la cinética de *V. fluvialis* en contacto con AgNPs

8.4. Actividad *in vivo*

8.4.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vivo* de las AgNPs

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición *in vivo*, mostraron que a partir de las 24 h después de la inoculación del patógeno, se observaron todos los signos y lesiones característicos de la Vibriosis en *P. scalare* (Fig. 12-16), como son nado errático, boqueo, anorexia, hemorragias en aletas y cola. Posteriormente se administraron los tratamientos con nanopartículas quedando con una concentración de las AgNPs a 90 ppm de 1.125×10^{-4} ppm y las AgNPs a 180 ppm de 2.25×10^{-4} ppm. En los acuarios donde sólo se inoculó el patógeno y no se aplicó ningún tratamiento, se observó que a las 48 h posteriores a la inoculación, el 100% de los peces murieron (Fig. 12-17), en comparación con los tratamientos con nanopartículas y con antibiótico que mostraron una mejoría a las 48 h (Fig. 12-16).

En los tratamientos con AgNPs y antibiótico pasadas las 96 h los peces ya no mostraron ningún tipo de signo ni lesión, obteniendo una supervivencia entre el 88 y el 100 % (Fig. 17).

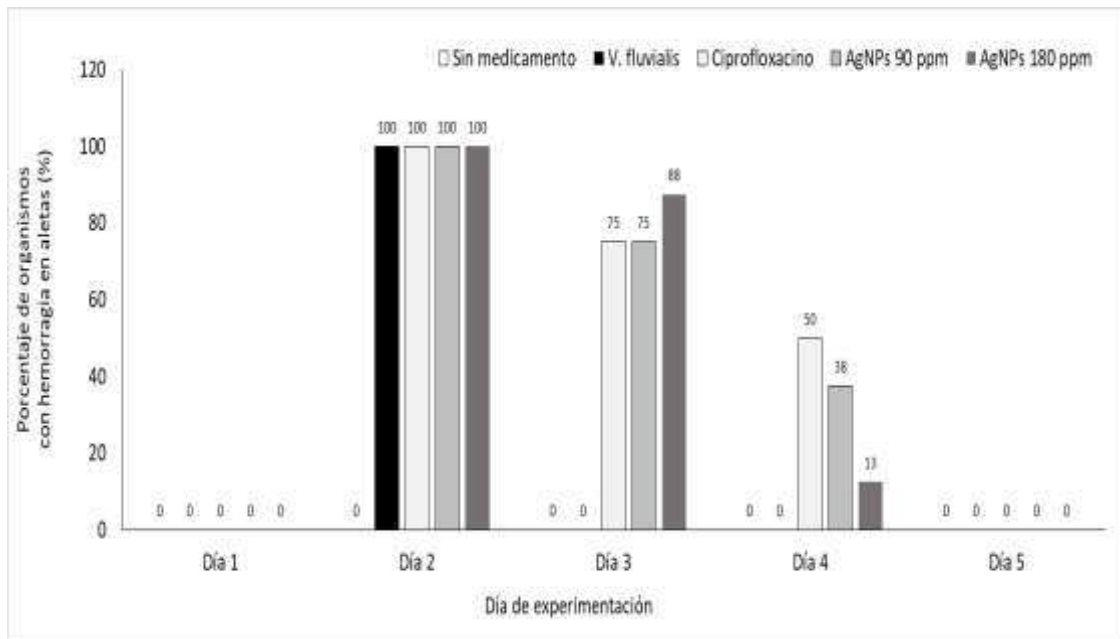


Fig. 12 Porcentaje de organismos con hemorragias en aletas

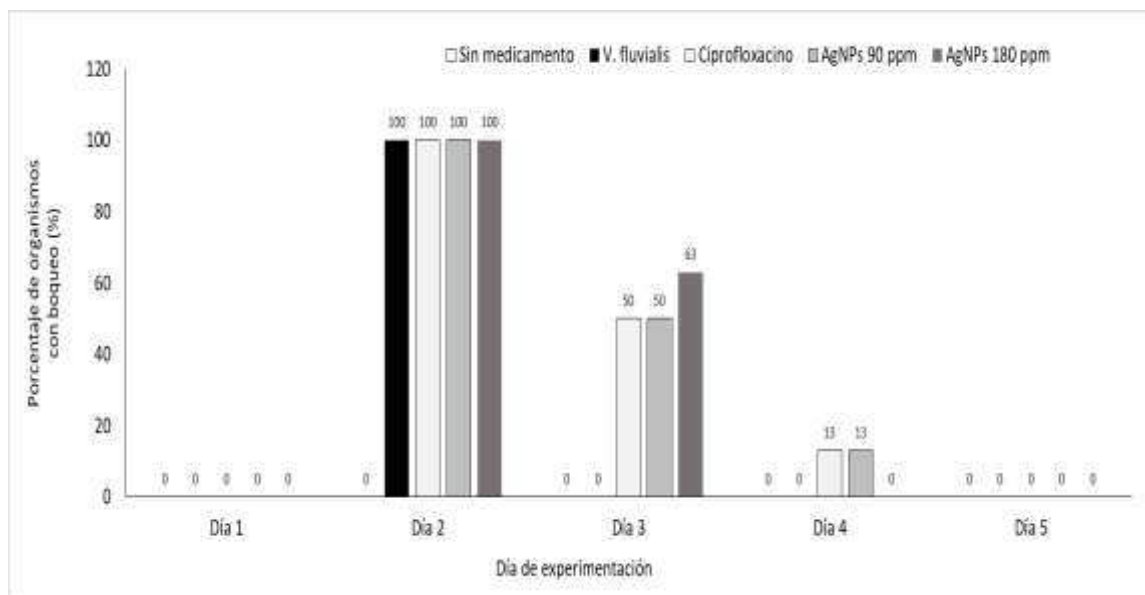


Fig. 13 Porcentaje de organismos con boqueo

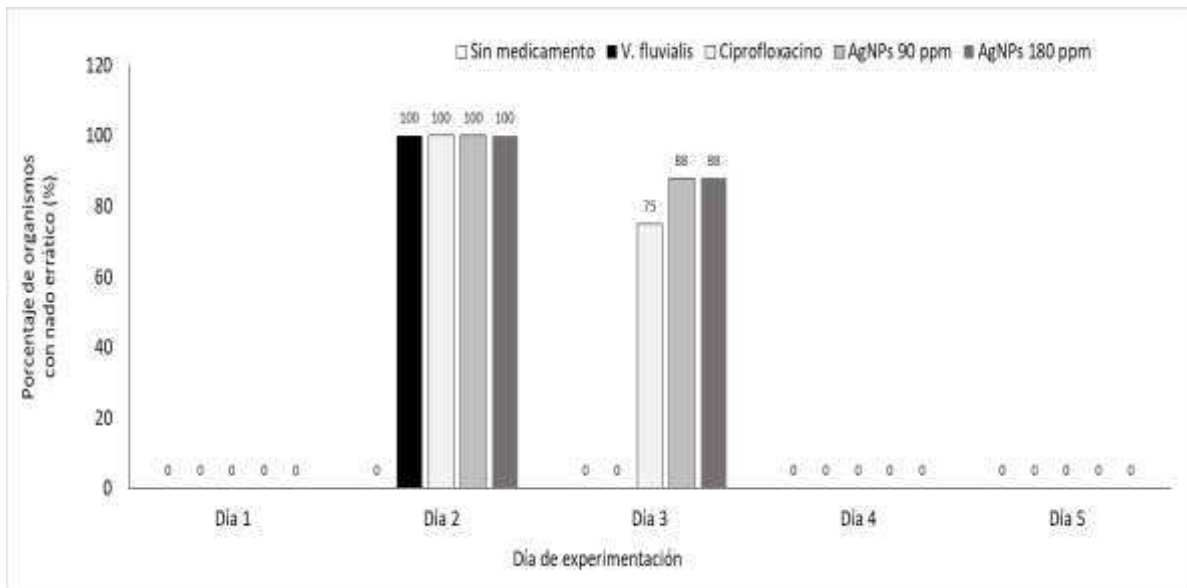


Fig. 14 Porcentaje de organismos con nado errático

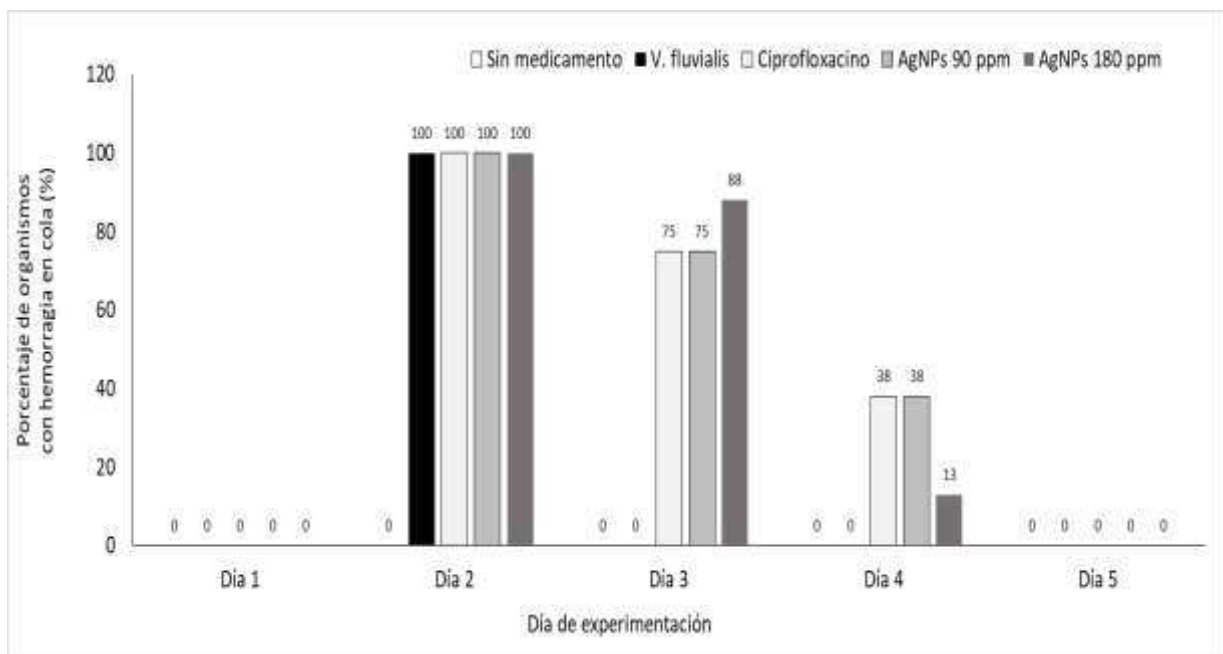


Fig. 15 Porcentaje de organismos con hemorragia en cola

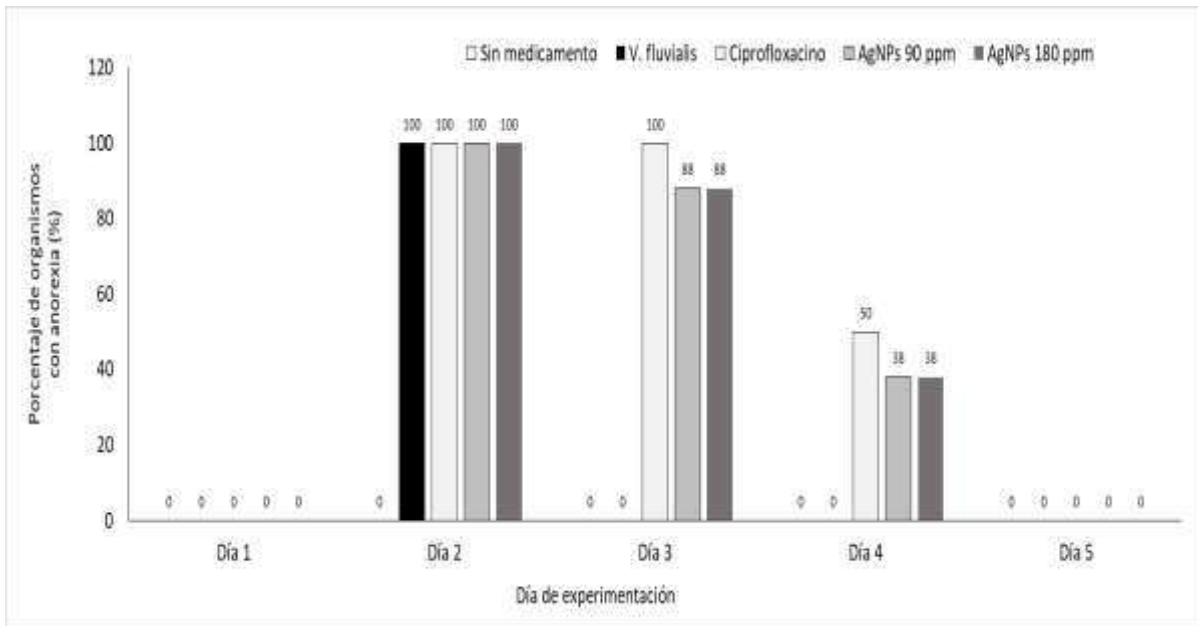


Fig. 16 Porcentaje de organismos con anorexia

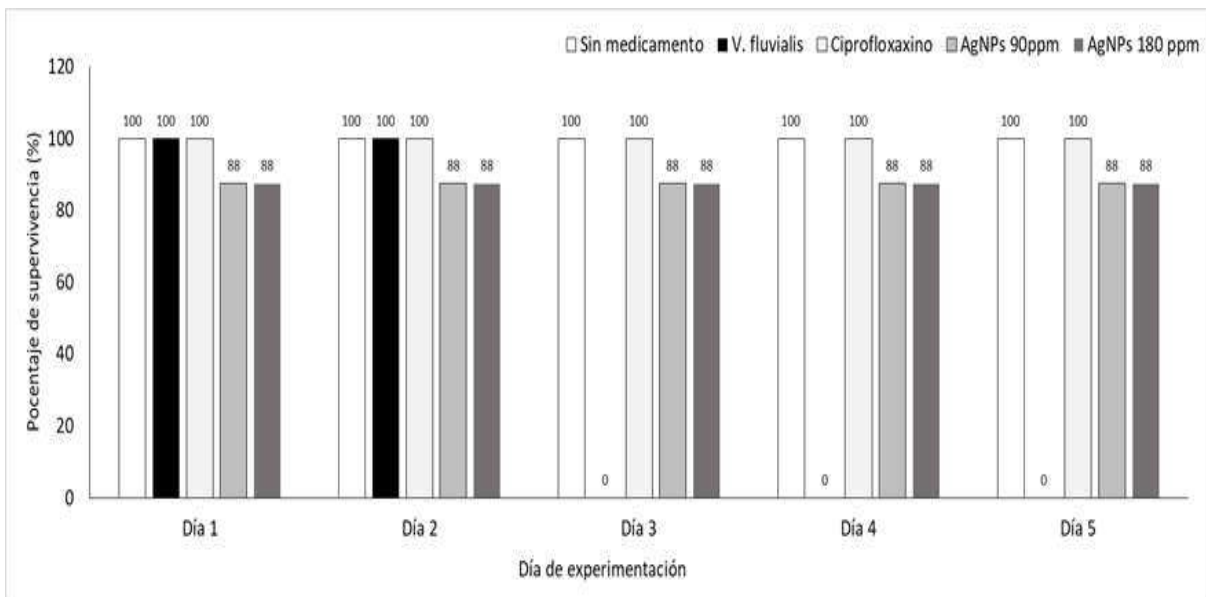


Fig. 17 Porcentaje de supervivencia de *P. scalare* ante el tratamiento con las AgNPs

7.4.2. Toxicidad de los peces:

El efecto de las concentraciones de AgNPs en *P. scalare* mostró que no hubo mortalidad al contacto con ellas. Posteriormente a que pasaran las 96 h del experimento, no se observó ningún daño en aletas, ojos y escamas.

Tabla 8. Actividad toxicológica de las AgNPs sobre juveniles de *P. scalare*

Concentración (ppm)	Mortalidad (%)				
	24h	48h	72h	96h	Total
180	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0

En la disección de *P. scalare*, se observó que no hubo ningún daño en órganos internos. En las figuras 17 y 18 se muestran dichos resultados.



Fig. 17 y 18 Imagen de la disección de *P. scalare* (con infección y con AgNPs) a las 96 h

9. Discusión

Síntesis y Caracterización de AgNPs

En este estudio se llevó a cabo una síntesis química, la cual es el método más común para la obtención de AgNPs (Natsuki, *et al*, 2015) y requiere equipo sencillo para su elaboración. Utilizamos como agente reductor citrato de sodio, al igual que Pacioni *et. al.*, en 2016, mencionan que una de las ventajas de utilizar esta sal para la síntesis de las AgNPs es que actúa tanto para reducir los cationes metálicos como para estabilizar las nanopartículas resultantes.

La caracterización de las AgNPs es necesaria, porque las propiedades fisicoquímicas de la partícula podrían tener un impacto significativo en su efecto biológico (Lin, *et al*, 2014). La espectroscopia de absorción de UV-Vis, ayuda a detectar las bandas de absorción que se relaciona con el diámetro y la relación de aspecto de las nanopartículas de plata (Smitha, *et al*, 2008). Los resultados de esta investigación mostraron un pico de plasmon entre los 422 y 427 nm en las AgNPs de 90 y 180 ppm respectivamente. Algunos autores como Pillai y Kamat, en 2004, señalan que el citrato de sodio controla el tamaño y la forma de AgNPs. Los autores indican que, utilizando el método de ebullición con diferentes concentraciones de citrato, el plasmon absorbancia máxima de las AgNPs se presenta a partir de 420 nm. Mientras que, en este estudio se determinó que la distribución de tamaño de las AgNPs varía entre 60.7 y 155.8 nm cuando la concentración es de 90 ppm y entre 63.3 y 170.8 nm cuando la concentración es de 180 ppm. Los resultados de la observación en SEM permitieron observar un tamaño de partícula entre 4 y 15 nm a una concentración de 90 ppm y en su mayoría de forma circular y a 180 ppm el tamaño de partícula fue entre 13 y 20 nm en su mayoría de forma cubica. Un punto a destacar es que se observó la formación de conglomerados, esto también ha sido reportado por Šileikaitė *et al.*, en 2009. Evaluando los nanomateriales sintetizados utilizando técnicas analíticas (Sapsford, *et al*, 2011) definimos que nuestras AgNPs entran dentro del rango nanométrico, por lo que pueden ser utilizadas para evaluar su efecto antimicrobiano.

Actividad Antimicrobiana *in vitro*

Los resultados obtenidos en la prueba de inhibición *in vitro* por el método de difusión en placa mostraron que la concentración de 180 ppm tiene un mayor efecto antimicrobiano contra *V. fluvialis* con un halo de inhibición de 14.3 mm a comparación de las AgNPs de 90 ppm. Sivaramasamy *et al.*, en 2016 evaluaron la actividad antimicrobiana de AgNPs obtenidas por síntesis biológica utilizando *Bacillus subtilis* para la inhibición de *V. parahaemolyticus*, observaron halos de inhibición de 19.27 mm. Por otro lado Wang *et al*, en 2016 utilizaron

AgNPs obtenidas por síntesis verde utilizando *Cordyceps militaris* a una concentración de 10 mM para el control de *V. anguillarum*, se obtuvieron halos de inhibición de 16.4 mm y para *V. alginolyticus* de 13.6 mm.

La CMI obtenida en este estudio fue de 45 ppm (equivalente a 45 µg/mL), para ambas concentraciones lo cual es cercano a lo reportado por Dananjaya y col, en 2014 quienes reportaron para el caso, *V. tapetis* una CMI de 50 µL/mL y para *Aliivibrio salmonicida* de 50 µg/mL (Dananjaya, et al, 2016). Ambas AgNPs se realizaron por síntesis química utilizando NaOH y recubriéndolas con quitosano.

El efecto antimicrobiano de las AgNPs parece estar conferido por su pequeño tamaño y el aumento de la superficie de contacto, lo que les permite destruir la membrana bacteriana y atravesar al interior del microorganismo efectuando daños intracelulares (Knetsch y Koole, 2011). Se ha reportado que dependiendo en método de obtención de las nanopartículas, su forma, tamaño y estructura es su potencial antimicrobiano, tal como lo señalan He, *et al*, (2010) y Hajipour,*et al*, (2012).

Actividad Antimicrobiana in vivo

Con relación a la prueba de toxicidad, se pudo observar que no hay efectos adversos en los peces en ninguna de las concentraciones utilizadas, ya que no se observaron signos y lesiones de daño en piel, tejido y órganos internos, tampoco se observaron cambios en su comportamiento, esto concuerda con lo reportado por Juárez- Moreno,(2017), donde evaluaron el efecto de nanopartículas en *Litopenaeus vannamei* durante 96 horas de exposición, la supervivencia del camarón fue más del 90% para todos los tratamientos. La tasa de consumo de oxígeno y el recuento total de hemocitos permanecieron inalterados, lo mismo sucedió en este estudio ya que al efectuar la disección los órganos internos se encontraban intactos y en condiciones normales y tampoco se observó cambio en su comportamiento. En otros estudios como el de Scown *et al*. en 2010, evaluaron el efecto de la exposición de nanopartículas en la trucha arcoíris con concentraciones de 10 y 100 µg L⁻¹ de AgNPs con un periodo de tratamiento de 10 días donde tampoco se observaron efectos adversos ni daño tóxico. Destacando que los periodos de exposición pueden variar al igual que las dosis administradas. También depende la especie con la que se esté trabajando por lo que se tiene que considerar evaluar constantemente la toxicidad de las AgNPs.

Los resultados de la prueba de inhibición *in vivo*, demostraron una respuesta positiva al utilizar las nanopartículas de plata para el control de *Vibrio fluvialis*, obteniendo porcentajes de supervivencia de 89 y 93% con las concentraciones de 90 y 180 ppm respectivamente, estos resultados superan lo reportado por Sivaramasamy, *et al* (2016), al utilizar nanopartículas de plata en el camarón, obteniendo porcentajes de

supervivencia de 40.6% en el tratamiento de 0.1 mg de AgNPs, en un periodo de 60 días donde utilizaron una concentración 106 UFC mL^{-1} de *V. parahaemolyticus*. Del mismo modo Vaseeharan, *et al*, (2010) obtuvo 71% de supervivencia en el tratamiento de 10 μg de AgNPs, donde utilizaron una concentración de 104 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mL^{-1} de *V. harveyi* en un periodo de 14 días. Cabe resaltar que en nuestra investigación sólo usamos una dosis única de AgNPs, obteniendo resultados positivos a los 4 días del tratamiento, donde se observó que los peces ya no mostraron ningún tipo de lesión o signo de la enfermedad. Por lo que las AgNPs son una alternativa al uso de antibióticos ya que se sabe que el caso de los antibióticos usados en la acuicultura, cuando las dosis del fármaco es alta y el tratamiento es muy largo, existe un peligro de toxicidad en el pez, frecuentemente causando daño en hígado, riñón y en algún otro órgano, esto puede generar un daño reversible. Por otro lado si la dosis del fármaco es muy baja y el periodo de tratamiento fue muy corto, la bacteria no será eliminada e incrementa el riesgo de que desarrolle resistencia ante el antibiótico (Yanong, 2013). Es por ello que las dosis de AgNPs y el periodo de exposición se deberán continuar estudiando en otras especies de peces de ornato.

10. Conclusiones

- Se sintetizaron y caracterizaron AgNPs dos concentraciones de 90 y 180 ppm con tamaño de nanopartícula de 4-15 nm y 13-20 nm con una forma esférica y cúbica, respectivamente con formación de conglomerados obtenido en el SEM, la identificación de elementos presentes en las AgNPs a través del espectro IR y un pico de plasmon de 423 y 427 nm obtenido en el espectro UV-Visible
- En las pruebas *in vitro* se determinó que las dos concentraciones de AgNPs muestran efecto antimicrobiano contra *V. fluvialis*.
- En las pruebas *in vivo* la aplicación de las AgNPs en *P. scalare* sanos, son seguras y no presentan ningún efecto toxicológico.
- Las AgNPs mostraron un efecto antimicrobiano al contacto con peces enfermos por *V. fluvialis*, disminuyendo sus signos y lesiones de la enfermedad obteniendo altos porcentajes de supervivencia.
- La utilización de las AgNPs para controlar infecciones provocadas por *V. fluvialis* en cultivos de *P. scalare*, puede ser una nueva alternativa como agente antimicrobiano para la salud y producción de esta especie.

11. Bibliografía

- Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. (2013). Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. SAGARPA. 311p.
- Armijo, R. (1994). Epidemiología básica en atención primaria de la salud. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España. 170 pp.
- Arredondo JL y Lozano, SL. (2003). La acuicultura en México. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. México. 266 pp.
- Barrioluengo, L., (2012) Caracterización del perfil de expresión de genes inmunorreguladores en trucha en respuesta a la vacunación con una vacuna atenuada de *Aeromonas hydrophila*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. México, Universidad De León. Departamento De Biología Molecular. Facultad De Ciencias Biológicas y Ambientales, 12-29.
- Cámara de Diputados (2018), Ley General De Pesca y Acuicultura Sustentables
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43), 13608-13619.
- Carnevia, D., Letamendía, M., Perretta, A., E. Delgado (2010). Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay. *Veterinaria* 46: 27-32.
- Carpenter, J.W., Mashima, T.Y., Rupiper, D.J. (1996). Exotic animal formulary. First ed. Greystone Publications, Manhattan, KS. 310 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Ed. CLSI, Wayne, PA, USA. M07-A9, Vol. 32, No. 2, 12-18.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility; Approved Standard, Eleventh Ed. CLSI, Wayne, PA, USA. M02-A11, Vol. 32, No. 1, 10-14.
- Código Acuático, (2006). Organización Mundial de la Salud Animal. 234p.
- CONAPESCA (2017), Peces ornamentales, un negocio con amplias perspectivas de desarrollo en México: (En línea) Disponible en; <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/peces-ornamentales-un-negocio-con-amplias-perspectivas-de-desarrollo-en-mexico-conapesca>, (Accesada 18 de mayo de 2017)
- CONAPESCA (2018), Peces de ornato, más que belleza acuícola (En línea), Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/peces-de-ornato-mas-que-belleza-acuicola>, (Accesada, 29 de mayo, 2018)
- CONAPESCA, (2005). Estado actual y perspectivas de la producción y comercialización de peces de ornato en México. 61p.

CONAPESCA. (2013). Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México.

Dananjaya, S. H. S., Godahewa, G. I., Jayasooriya, R. G. P. T., Chulhong, O. H., Jehee, L., Mahanama, D. Z. (2014). Chitosan silver nano composites (CAGNCs) as potential antibacterial agent to control *Vibrio tapetis*. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 5(5), 209.

Dananjaya, S. H. S., Godahewa, G. I., Jayasooriya, R. G. P. T., Lee, J., De Zoysa, M. (2016). Antimicrobial effects of chitosan silver nano composites (CAGNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio (Vibrio) salmonicida*. *Aquaculture*, 450, 422-430.

Daniel, S. K., Sironmani, T. A., Dinakaran, S. (2016) Nano formulations as curative and protective agent for fish diseases: Studies on red spot and white spot diseases of ornamental gold fish *Carassius auratus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*; 4(4): 255-261.

Darwish, A.M., Ismaiel, A.A. (2003). Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. *Journal of Aquatic Animal Health* 15, 209-214.

Dawes, J., (2008). International experience in ornamental marine species management. Part 1: perspectives (Online). *Ornamental Fish International Journal*, availed in <http://www.ornamental-fish-int.org/marinespecies1.htm>

Del Río, R. E. (2004). Enfermedades de animales acuáticos: Una amenaza para la sostenibilidad de la acuicultura costera en México. *El Manejo Costero en México*. Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad de Quintana Roo, 561-572.

Diario Oficial de la Federación, (2012). Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola. Segunda sección. INAPESCA. 33- 112 pp.

Díaz del Castillo Rodríguez, F. (2012). Introducción a los Nanomateriales. *Lecturas de Ingeniería, UNAM, México*.

EcuRed, (2013) "La acuicultura". EcuRed Conocimiento con todos y para todos. [En Línea]. Cuba, disponible en: <http://www.ecured.cu/index.php/Piscicultura> (Accesada el día 03 de octubre de 2016).

FAO (2002), Residuos de Antibióticos en Productos de Acuicultura, (En línea) disponible en <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s06a.htm> (Accesada el 9 de octubre de 2016)

FAO (2004). Pesca Conservación de los Peces: Problemas y recomendaciones. Informe de la consulta de expertos sobre recursos Acuícolas de los peces. 217 pp.

FAO (2014) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 253p.

FAO, (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma 235 p,

FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2001) Prevención y Tratamiento de Enfermedades de los Peces (En línea) disponible en http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6709s/x6709s15.htm (Accesada el día 3 de octubre de 2016).

- Foladori, G., Invernizzi, N. (2006). La nanotecnología: una solución en busca de problemas. *Comercio Exterior*, 56(4), 326-335.
- Fuentes, J., J. Pérez. (1998). Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista Veterinaria México* 29(1): 117- 119.
- Fundación Produce Morelos, (2011). Agenda de innovación tecnológica del Estado de Morelos. México, Fundación Produce Morelos.48p.
- Gong P, Li H, He X, Wang K, Hu J, Tan W, (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄ Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, 18: 604–11.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499-511.
- Handy, R. D., Al-Bairuty, G., Al-Jubory, A., Ramsden, C. S., Boyle, D., Shaw, B. J., & Henry, T. B. (2011). Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*, 79(4), 821-853.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657-3666.
- Huang, D., Zhou, H., Gao, J. (2015). Nanoparticles modulate autophagic effect in a dispersity-dependent manner. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 5, 14361
- Huang, S., Wang, L., Liu, L., Hou, Y., Li, L. (2015). Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 369-400.
- Inglis, V., Roberts, R. J., & Bromage, N. R. (1993). *Bacterial diseases of fish*. Blackwell Scientific Publications. pp. 257-283.
- Invernizzi, N., Foladori, G. (2006). Nanomedicine, poverty and development. *Development*, 49(4), 114-118.
- Juárez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C. H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A. D., Vazquez-Felix, E. F., Bogdanchikova, N. (2017). Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 169, 716-724.
- Juárez-Palacios, R.R. (1987). La acuicultura en México, importancia social y económica. En: Desarrollo pesquero mexicano 1986-1987. *Secretaría de Pesca. México*. LII: 219-232.
- Kinkelin, P., Michel, C. y Ghittino, P. (1985). *Tratado de las enfermedades de los peces*. Editorial Acribia Zaragoza S.A. España. 353 pp.
- Knetsch, M. L., , Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366.
- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtapan-Turrent, L., Singh, D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 1-8.

- Lee, P. C., Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391-3395.
- Luna-Figueroa J., (2003) *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae): Influencia de alimento vivo en la reproducción y el crecimiento. *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura* 20:55-65.
- Mallick, S., Sharma, S., Banerjee, M., Ghosh, S. S., Chattopadhyay, A., Paul, A. (2012). Iodine-stabilized Cu nanoparticle chitosan composite for antibacterial applications. *ACS Applied Materials & interfaces*, 4(3), 1313-1323.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mendoza Uribe, G., Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles latinoamericanos*, 15(29), 161-186.
- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 33-41). Real Sociedad Española de Química.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Natsuki, J., Natsuki, T., & Hashimoto, Y. (2015). A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. *International Journal of Materials Science and Application*, 4(5), 325-332. doi: 10.11648/j.ijmsa.20150405.17
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959-8964.
- Negrete, P., Valencia, D., Villegas, G., Romero, J., (2002) Bacteriosis por estrés ambiental en granjas acuícolas rurales del Estado de México, *Sociedades Rurales, Producción y Medio ambiente*, 3(1), 49-58.
- Negrete Redondo, P., Romero Jarero, J., Arredondo Figueroa, J. L. (2004). Resistencia a antibioticos y presencia de plasmidos en: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Veterinaria México*, 35(1).
- Noga, E.J. (2010). Fish disease: diagnosis and treatment. 2nd edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, MO. 367 pp.
- Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993, para regular la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos.

Norma Oficial Mexicana Nom-128-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Que Establece La Aplicación De Un Sistema De Análisis De Riesgos Y Control De Puntos Críticos En La Planta Industrial Procesadora De Productos De La Pesca.

O.I.E. Organización Internacional de Epizootias. (2009). Manual de protocolos de diagnóstico para animales acuáticos. Sexta edición. *Organización Mundial de la Salud Animal*. 1-60 pp.

Oberdörster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267(1), 89-105.

Pacioni, N. L., Borsarelli, C. D., Rey, V., Veglia, A. V. (2015). Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles. In *Silver Nanoparticle Applications* (pp. 13-46). Springer, Cham.

Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Park, K. (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in vitro*, 24(3), 872-878.

Pérez C. (2002) Frecuencia de desove de diferentes variedades del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Pises: Cichlidae). *Revista Aquatic* (en línea). México. (Accesado el 25 de octubre de 2016) disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1603/pezangel.htm>.

Pérez, C. E.; Morales, S. I. y Olvera, Q. H. (2002). Frecuencia de desove de diferentes variedades del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae). *AquaTIC*2002. 16:1-7.

Pidgeon, N., Porritt, J., Ryan, J., Seaton, A., Tendler, S., Welland, M., & Whatmore, R. (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *The Royal Society, The Royal Academy of Engineering*, 29(07), 2004.

Pillai, Z. S., & Kamat, P. V. (2004). What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3), 945-951. doi: 10.1021/jp037018r

Post, G. 1987. *Textbook of fish health*. TFH Publications, Inc., Neptune City, NJ. 288 pp.

Quintana, A. (2001). Riesgo sanitario asociado al comercio de animales acuáticos. *Revista Aquatic*, 14(1), 36-41.

Ramírez-Martínez, C., R. Mendoza-Alfaro y C. Aguilera González. (2010). Estado actual y perspectivas de la producción de peces de ornato en México. *INAPESCA/UANL*. México. 116p.

Ribeiro, F.; Rodrigues, L., Fernandes, J. 2007. Desempenho de juvenis de Acará- Bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 33(2), 195-203

Rioja, F. C. (1998). Bioagresores de los Peces de Acuario. *Revista AquaTIC*, (5)1-8.

Roberts, H. E., Palmeiro, B., & Weber, E. S. (2009). Bacterial and parasitic diseases of pet fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 12(3), 609-638.

Samanidou, V. F., Evaggelopoulou, E. N. (2007). Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *Journal of Separation Science*, 30(16), 2549-2569.

- Sapsford, K. E., Tyner, K. M., Dair, B. J., Deschamps, J. R., Medintz, I. L. (2011). Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical chemistry*, 83(12), 4453-4488.
- Savage, N., Thomas, T. A., Duncan, J. S. (2007). Nanotechnology applications and implications research supported by the US Environmental Protection Agency STAR grants program. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(10), 1046-1054.
- Scown, T. M., Santos, E. M., Johnston, B. D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Van, Van Aerle, R. (2010). Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, 115(2), 521-534.
- Seil, J. T., Webster, T. J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767-2781.
- Shalan, M., Saleh, M., El-Mahdy, M. El-Matbouli, M. (2016). Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 701-710.
- Šileikaitė, A., Puišo, J., Prosyčevs, I., Tamulevičius, S. (2009). Investigation of silver nanoparticles formation kinetics during reduction of silver nitrate with sodium citrate. *Materials Science (Medžiagotyra)*, 15(1), 21-27.
- Singh G, Joyce EM, Beddow J, Mason TJ (2012) Evaluation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles coated sonochemically on to textile fabrics. *Journal of Microbiology Biotechnology Food and Science* 2(1):106–120
- Sivaramasamy, E., Zhiwei, W., Li, F., Xiang, J. (2016). Enhancement of Vibriosis Resistance in *Litopenaeus vannamei* by Supplementation of Biomastered Silver Nanoparticles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanomedicine Nanotechnology*, 7(352), 2.
- Smitha, S. L., Nissamudeen, K. M., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2008). Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(1), 186-190.
- Sniezko, S. (1973). Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to disease of fishes. *Advances in veterinary science and comparative medicine*. C.A. Brandy and C. E. Cornelius, eds. Academic Press, New York, 291- 314 pp.
- Soltani, M., Ghodrathnema, M., Ahari, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Atee, M., Dastmalchi, F., Rahmánya, J. (2009). The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, International. *Journal of Veterinary Research*, 3(2), 137-142.
- Soriano-Salazar, M. B. y Hernández-Ocampo, D. 2002. Tasa de crecimiento del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Universitaria*. 12:28-33.
- Stoskopf, M.K. (1988). "Fish chemotherapeutics". In *Veterinary clinics of North America, Small Animal Practice: Tropical Fish Medicine*. March. M. Stoskopf (ed). W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. pp. 331-
- Suzán, G., Galindo, F., Ceballos, G., (2000). La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Veterinaria*. México, 31(3), 223-230.

- Swain, P., Nayak, S. K., Sasmal, A., Behera, T., Barik, S. K., Swain, S. K., Jayasankar, P. (2014). Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2491-2502.
- Thomas, K. G., Kamat, P. V. (2003). Chromophore-functionalized gold nanoparticles. *Accounts of chemical research*, 36(12), 888-898.
- Tuševljak, N., Dutil, L., Rajić, A., Uhlund, F. C., McClure, C., St-Hilaire, S., McEwen, S. A. (2013). Antimicrobial use and resistance in aquaculture: findings of a globally administered survey of aquaculture-allied professionals. *Zoonoses and public health*, 60(6), 426-436.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Chen, J. C. (2010). Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. *Letters in applied microbiology*, 50(4), 352-356.
- Vásquez, M., Rondón, I., Restrepo, L. y P. Eslava. (2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. *Orinoquia* 14(1): 33-44.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Waldner, J. B. (2013). *Nanocomputers and swarm intelligence*. John Wiley & Sons.
- Wang, L., Liu, C. C., Wang, Y. Y., Xu, H., Su, H., Cheng, X. (2016). Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesized using *Cordyceps militaris* extract. *Current Applied Physics*, 16(9), 969-973.
- Yanong, R. P. (2003). Use of antibiotics in ornamental fish aquaculture. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS 1-7.
- Zafra, A., Vela, K. (2015). Producción de semilla de *Pterophyllum scalare* "pez ángel" en sistema cerrado, Trujillo-Perú. *Revista Rebiol*, 35(1), 91-98.

12. Anexo 1

Título: Uso de nanopartículas de plata para el control de *Vibrio fluvialis* en el cultivo de *Ptephyllum scalare*

Julio César Meneses Márquez¹, Aida Hamdan Partida¹, María del Carmen Monroy Dosta², Jorge Castro Mejía², Abraham Faustino Vega³ [Elizabeth...](#)⁴ Jaime Amadeo Bustos¹ Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Departamento de Atención a la Salud, ²Laboratorio de Alimento Vivo y Análisis Químico del Departamento del Hombre y su Ambiente ³ Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada del Departamento de Sistemas Biológicos ⁴[Instituto de Carodiología...](#)
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960

1. **Abstract:**

La nanotecnología ha tenido un avance significativo debido a sus múltiples aplicaciones; una de ellas es su uso como agente antimicrobiano en cultivos acuícolas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (AgNPs) contra *Vibrio fluvialis* en el cultivo de *Ptephyllum scalare*. Las AgNPs fueron sintetizadas en diferentes concentraciones (90 y 180ppm). A través de la espectroscopia UV-Vis se confirmó la formación de AgNPs con absorbancia máxima de 427 y 422 nm, la distribución de tamaño de la población de las AgNPs fue entre 60.7 y 155.8 nm a 90 ppm y entre 63.3 y 170.8 a 180 ppm. El resultado de SEM indica que el tamaño de partícula de 13-20 y 4-15 nm, con formas cubicas y circulares. En las pruebas para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* se obtuvo una CMI de 45 ppm y halos de inhibición de 14.3±1.15 mm a 180 ppm y 8.66±0.57 mm a 90 ppm. En la cinética de *V. fluvialis* al contacto con las concentraciones de AgNPs, se observó que a partir de las 6 horas de exposición se inicia el proceso de inhibición del crecimiento bacteriano. La prueba de toxicidad, las AgNPs demostró que uno hubo evidencia de daño en los ojos, aletas, escamas y órganos internos, teniendo el 100% de supervivencia. En la prueba *in vivo* se observó una supervivencia de 88 y 93% para los tratamientos con nanopartículas en comparación con el tratamiento control, donde solo se inoculó el patógeno ya que los peces no sobrevivieron las 48 horas de la infección experimental. En este estudio concluye que las AgNPs tuvieron una actividad antimicrobiana contra *V. fluvialis*, dando una nueva alternativa para controlar las enfermedades microbianas en cultivo de *P. scalare*. Sin embargo, se debe de continuar investigando del efecto de AgNPs en otros microorganismos patógenos y en otras especies de peces ornamentales.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, enfermedades de peces, *Vibrio fluvialis*, efecto antimicrobiano

Key words: silver nanoparticles, fish disease, *Vibrio fluvialis*, antimicrobial effect

2. **Introduction:**

La acuicultura engloba todas las actividades que tienen por objeto la producción, desarrollo y comercialización de organismos acuáticos en ecosistemas controlados como estanques o en sistemas abiertos que incluyen lagos, ríos, presas, lagunas y el mar. Dicha actividad juega un papel importante en la producción de organismos con diferentes finalidades, desde la producción de alimentos hasta la actividad ornamental y es una industria con un alto potencial económico para México.

De acuerdo con CONAPESCA en 2018, la producción anual es de alrededor de 60 millones de peces de ornato, siendo el estado de Morelos como principal productor y anualmente produce 30 millones de organismos de 100 variedades dentro de las que destaca la producción de *Pterophyllum scalare* (pez ángel), especie que ha sido ampliamente comercializada debido a que tiene una llamativa estética y amplia aceptación en el mercado mundial de la acuariofilia (CONAPESCA, 2017). Sin embargo; la intensificación en la producción de esta especie y la falta de control del comercio internacional de los peces ha provocado la movilización de gran cantidad de organismos y, como consecuencia, el transporte de microorganismos patógenos que en condiciones ambientales diferentes pueden desencadenar procesos infecciosos, impacto ambiental y pérdidas económicas para los productores (Verschuere et al., 2000).

Entre las enfermedades más comunes en los peces se encuentra la Vibriosis causada por bacterias Gram negativas de la especie *Vibrio fluvialis* (Lee, et al, 2002, Redondo, et al, 2004) La enfermedad generalmente se presenta como una septicemia generalizada, en la cual se pueden observar hemorragias en la base de las aletas, ojos, branquias y en órganos internos como el hígado, bazo y riñón.

Para el tratamiento y la prevención de las enfermedades en los peces se utilizan una gama de compuestos químicos y antibióticos los cuales pueden tener un alto impacto en el ambiente y el personal que maneja a los peces (Cabello, 2004), ya que el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos ha propiciado resistencia bacteriana que se transmite en la progenie de estas, de forma directa a través de los genes, y de forma indirecta a través de la adquisición de plásmidos-R entre especies. Debido a ello, en la actualidad se están investigando alternativas para el control de enfermedades sin el uso de antibióticos (FAO, 2014). Una tecnología novedosa que en años recientes ha llamado la atención en el sector acuícola, es el uso de nanopartículas ya que se han reportado efectos positivos en el desarrollo de vacunas para la protección de la carpa asiática usando complejos nanoencapsulados contra la bacteria *Listonella anguillarume*, de igual manera se han utilizado en el control del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarones (Handy, 2011).

Las nanopartículas son compuestos, generalmente de forma esférica, con dimensiones entre 1 y 100 nm, que pueden ser sintetizadas a partir de metales nobles como el oro, plata, platino, cobre y paladio (Díaz del

Castillo, 2012; Dananjaya, et al., 2016). Recientemente la plata (Ag), tiene especial interés debido a su efecto bactericida en su forma iónica (Ag^+). Las nanopartículas permiten la liberación de los iones de Ag^+ que se unen a las proteínas de la membrana celular causando una ruptura lo que lleva a muerte a las células bacteriana o también pueden unirse al citocromo y a los ácidos nucleicos dañándolos e inhibiendo la división celular (Huang et al., 2015). Por lo anterior, esta tecnología puede ser aprovechada en el control de enfermedades en acuicultura.

3. **Materials and Methods:**

3.1. **Síntesis y Caracterización de AgNPs**

Las AgNPs fueron preparadas utilizando el método de reducción química basados en la técnica de Lee y Meisel (1982) utilizando dos concentraciones a 90 y 180 ppm (EMDAR MERCK). Para caracterizar las AgNPs se realizó un barrido espectrofotométrico de las soluciones a una longitud de onda de 300 nm a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Visible marca Beckman Coulter DU730. Se determinó los tipos de vibraciones que pudieran aparecer entre las nanopartículas de plata y el precursor de Ag (AgNO_3). Se realizó en un equipo IRAffinity-1S, Shimadzu®, modelo 4350. Se utilizó el aditamento ATR (Attenuated Total Reflection) para muestras líquidos. Se determinó la absorbancia en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} , empleando 40 escaneos para cada medición. Se analizó AgNO_3 y AgNPs para hacer las comparaciones. El tamaño y la morfología de las AgNPs fueron analizadas por SEM en un equipo marca Jeol modelo JSM-7401f. De igual manera se determinó la distribución del tamaño de partícula por difracción de luz láser (Horiba, Partica LA 950).

3.2. **Actividad antimicrobiana *in vitro*:**

Se realizó la prueba de susceptibilidad por el método Kirby-Bauer de difusión en disco, de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012) (M02-A11). Se preparó un inóculo de *Vibrio fluvialis* ajustando a una concentración de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC mL^{-1}) utilizando un equipo Densimat (Biomérieux), y se sembró estriando toda la superficie de las placas con medio agar Müller-Hinton. Se prepararon las soluciones de AgNPs de las concentraciones que se probaron y se colocaron sensidiscos de 0.6 cm de diámetro previamente impregnados con la suspensión de cada concentración de AgNPs sintetizadas, así como los sensidiscos para la solución de referencia de AgNO_3 a las mismas concentraciones. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Se determinó el tamaño del halo de inhibición, que fue proporcional a la sensibilidad de la bacteria *Vibrio fluvialis*. Para determinar la concentración mínima inhibitoria de las AgNPs se utilizó el método de macrodilución de acuerdo al Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI, 2012), (M07-A9). Se preparó un inóculo *V. fluvialis* ajustando a una concentración de 0.5 McFarland utilizando un

equipo Densimat (Biomérieux). Se realizaron diluciones seriadas de las soluciones de AgNPs en 8 tubos con 1 mL de caldo Müller Hinton; posteriormente se le agregó 1 mL del inóculo de la bacteria a una dilución (1:150) a cada uno. Se dejaron incubar a 37°C por 24 h, después de la incubación, estos fueron examinados para observar el crecimiento microbiano.

Para determinar la cinética de crecimiento de *V. fluvialis* en contacto con las AgNPs, se inoculó *V. fluvialis* al medio caldo TBS (Marca Becton Dickson) y se dejó incubar durante 24 h a 37°C. Posteriormente se ajustó la concentración a 1×10^8 UFC mL⁻¹ y se adicionó 50 µl de las soluciones AgNPs de 90 y 180 ppm a los tubos. El crecimiento de la bacteria fue monitoreado por un equipo Densimat, durante 24 h.

3.3. Actividad Antibacterial *in vivo*:

Los peces requeridos para esta investigación se obtuvieron de un centro productor de peces ornamentales de la Ciudad de México. 150 peces juveniles de la especie *P. scalare* se mantuvieron por un periodo de aclimatación de 15 días, bajo las siguientes condiciones en la calidad del agua: pH 7, oxígeno disuelto 5 mg mL⁻¹ y 0.3 ppm de nitratos y nitritos. Los peces fueron alimentados diariamente con una dieta comercial para la especie. Los peces fueron distribuidos al azar en acuarios de 40 L de capacidad (8 organismos /acuario.) El experimento contó con un tratamiento control (sin nanopartículas) un control negativo (sólo con inóculo de la bacteria), un control positivo tratado con el antibiótico (Ciprofloxacino, Dosis 500 mg/40L) y dos tratamientos con nanopartículas a diferentes concentraciones (180 y 90 ppm Dosis 50 mL/40 L), cada tratamiento se llevó por triplicado. Previo al tratamiento se indujo la infección experimental en los peces inoculando la cepa *V. fluvialis* a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ Una vez inoculado el patógeno se procedió al monitoreo y caracterización del cuadro clínico presentado por los peces mediante el registro de los signos y lesiones de la enfermedad que desarrollaron los organismos en experimentación durante siete días, según lo reportados por Vásquez *et al.*, 2010; Fuentes y Pérez, 1998; Carnevia *et al.*, 2010 (Tabla 1).

3.4. Toxicidad de las AgNPs en los peces:

Para determinar los efectos de la exposición de los peces a las nanopartículas de plata se llevó a cabo un ensayo de toxicidad en donde 60 peces juveniles fueron expuestos a una concentración de 90 y 180 ppm durante un periodo de 96 h. A partir de la exposición, los organismos fueron monitoreados con el fin de observar un cambio en el comportamiento o algún daño a nivel externo y en órganos internos

4. Results:

4.1. Síntesis y Caracterización de AgNPs

Se obtuvieron nanopartículas de plata de dos concentraciones de 90 ppm y 180 ppm, por el método de reducción química, presentando las soluciones diferentes tonalidades de color que nos indica la formación de AgNPs, como se muestra en la figura 1.

En la figura 2 se observan los picos del plasmon del espectro del UV- Visible de las AgNPs. En el caso de las AgNPs de 90 ppm, se obtuvo un pico de plasmon a los 422 nm y en las AgNPs de 180 ppm fue a los 427 nm. En la figura 3, se muestra el espectro IR de las AgNPs de cada concentración, al igual que el espectro de las soluciones de referencia y la solución de citrato de sodio. Esta prueba detectó la formación de las diferentes interacciones vibracionales que presentan los elementos de las AgNPs. La caracterización por dispersión de luz láser indicó que la distribución de tamaño de la población de las AgNPs a una concentración de 90 ppm varía entre 60.7 y 155.8 nm y cuando la concentración es de 180 ppm varía entre 63.3 y 170.8 nm. SEM determinó que las AgNPs a una concentración de 90 ppm tienen en su mayoría una forma esféricas, formando conglomerados aunque también se observan algunas nanopartículas de forma cubica y con tamaños entre 4 y 15 nm (figura 4), en comparación con las AgNPs de 180 ppm que mostraron forma cúbica y algunas con forma circular y con tamaños entre 13 y 20 nm (figura 5).

4.2. Actividad *in vitro* de las AgNPs contra *V. fluvialis*

En la figura 6 se muestra la actividad antimicrobiana de las dos concentraciones de AgNPs sobre *V. fluvialis*. Las AgNPs de 90 ppm de 8.66 mm y en las de 180 ppm un halo de inhibición de 14.3 mm. Las soluciones de AgNO₃ de 90 y 180 ppm no presentaron ninguna actividad. En la figura 6 se observa el resultado de la cinética de crecimiento en contacto con las AgNPs. Se mantuvo en monitoreo el tiempo de crecimiento de *V. fluvialis* en contacto con las concentraciones de AgNPs durante 8 h continuas y un monitoreo a las 24 mostrando que ambas concentraciones a partir de la 5 h inhiben el crecimiento de *V. fluvialis*, en menos de la mitad que el crecimiento que presenta el control. Mostrando que las AgNPs tienen un efecto bacteriostático, lo cual significa que inhiben el crecimiento de *V. fluvialis*, alrededor del 50%.

4.3. Actividad *in vivo* de las AgNPs contra *V. fluvialis*

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición *in vivo*, mostraron que a partir de las 24 h después de la inoculación del patógeno, se observaron todos los signos y lesiones característicos de la Vibriosis en *P. scalare* (Fig.7-12), como son nado errático, boqueo, anorexia, hemorragias en aletas y cola. Posteriormente se administraron los tratamientos con nanopartículas quedando con una concentración de las AgNPs a 90 ppm de 1.125×10^{-4} ppm y las AgNPs a 180 ppm de 2.25×10^{-4} ppm. En los acuarios donde sólo se inoculó el patógeno y no se aplicó ningún tratamiento, se observó que a las 48 h posteriores a la inoculación, el 100%

de los peces murieron (Fig. 8-12), en comparación con los tratamientos con nanopartículas y con antibiótico que mostraron una mejoría a las 48 h (Fig. 8-12).

En los tratamientos con AgNPs y antibiótico a las 96 h los peces ya no mostraron ningún tipo de signo ni lesión, obteniendo una supervivencia entre el 88 y el 100 % (Fig. 12).

4.4. Toxicidad de los peces

La prueba de toxicidad no mostró efectos negativos al contacto con las AgNPs a en las dos concentraciones utilizadas en este estudio. En la figura 13 se muestra que no hubo daño en aletas, ojos, branquias y escamas, tampoco se observó lesiones en órganos internos, ni el comportamiento de los *P. scalare*, obteniendo el 100 % de supervivencia. La fig. 14 es una imagen de cómo se observa un *P. scalare* infectado con *V. fluvialis*, el cual nos ayudó a comparar los órganos con los peces con los que se elaboró la prueba de toxicidad.

5. Discusión

Síntesis y Caracterización de AgNPs

En este estudio se llevó a cabo una síntesis química, la cual es el método más común para la obtención de AgNPs (Natsuki, *et al*, 2015) y requiere equipo sencillo para su elaboración. Utilizamos como agente reductor citrato de sodio, al igual que Pacioni *et. al.*, en 2016, mencionan que una de las ventajas de utilizar esta sal para la síntesis de las AgNPs es que actúa tanto para reducir los cationes metálicos como para estabilizar las nanopartículas resultantes.

La caracterización de las AgNPs es necesaria, porque las propiedades fisicoquímicas de la partícula podrían tener un impacto significativo en su efecto biológico (Lin, *et al*, 2014). La espectroscopia de absorción de UV-Vis, ayuda a detectar las bandas de absorción que se relaciona con el diámetro y la relación de aspecto de las nanopartículas de plata (Smitha, *et al*, 2008). Los resultados de esta investigación mostraron un pico de plasmon entre los 422 y 427 nm en las AgNPs de 90 y 180 ppm respectivamente. Algunos autores como Pillai y Kamat, en 2004, señalan que el citrato de sodio controla el tamaño y la forma de AgNPs. Los autores indican que, utilizando el método de ebullición con diferentes concentraciones de citrato, el plasmon absorbancia máxima de las AgNPs se presenta a partir de 420 nm. Mientras que, en este estudio se determinó que la distribución de tamaño de las AgNPs varía entre 60.7 y 155.8 nm cuando la concentración es de 90 ppm y entre 63.3 y 170.8 nm cuando la concentración es de 180 ppm. Los resultados de la observación en SEM permitieron observar un tamaño de partícula entre 4 y 15 nm a una concentración de

90 ppm y en su mayoría de forma circular y a 180 ppm el tamaño de partícula fue entre 13 y 20 nm en su mayoría de forma cubica. Un punto a destacar es que se observó la formación de conglomerados, esto también ha sido reportado por Šileikaitė *et al.*, en 2009. Evaluando los nanomateriales sintetizados utilizando técnicas analíticas (Sapsford, *et al.*, 2011) definimos que nuestras AgNPs entran dentro del rango nanométrico, por lo que pueden ser utilizadas para evaluar su efecto antimicrobiano.

Actividad Antimicrobiana *in vitro*

Los resultados obtenidos en la prueba de inhibición *in vitro* por el método de difusión en placa mostraron que la concentración de 180 ppm tiene un mayor efecto antimicrobiano contra *V. fluvialis* con un halo de inhibición de 14.3 mm a comparación de las AgNPs de 90 ppm. Sivaramasamy *et al.*, en 2016 evaluaron la actividad antimicrobiana de AgNPs obtenidas por síntesis biológica utilizando *Bacillus subtilis* para la inhibición de *V. parahaemolyticus*, observaron halos de inhibición de 19.27 mm. Por otro lado Wang *et al.*, en 2016 utilizaron AgNPs obtenidas por síntesis verde utilizando *Cordyceps militaris* a una concentración de 10 mM para el control de *V. anguillarum*, se obtuvieron halos de inhibición de 16.4 mm y para *V. alginolyticus* de 13.6 mm.

La CMI obtenida en este estudio fue de 45 ppm (equivalente a 45 µg/mL), para ambas concentraciones lo cual es cercano a lo reportado por Dananjaya y col, en 2014 quienes reportaron para el caso, *V. tapetis* una CMI de 50 µL/mL y para *Aliivibrio salmonicida* de 50 µg/mL (Dananjaya, *et al.*, 2016). Ambas AgNPs se realizaron por síntesis química utilizando NaOH y recubriéndolas con quitosano.

El efecto antimicrobiano de las AgNPs parece estar conferido por su pequeño tamaño y el aumento de la superficie de contacto, lo que les permite destruir la membrana bacteriana y atravesar al interior del microorganismo efectuando daños intracelulares (Knetsch y Koole, 2011). Se ha reportado que dependiendo en método de obtención de las nanopartículas, su forma, tamaño y estructura es su potencial antimicrobiano, tal como lo señalan He, *et al.*, (2010) y Hajipour, *et al.*, (2012).

Actividad Antimicrobiana *in vivo*

Con relación a la prueba de toxicidad, se pudo observar que no hay efectos adversos en los peces en ninguna de las concentraciones utilizadas, ya que no se observaron signos y lesiones de daño en piel, tejido y órganos internos, tampoco se observaron cambios en su comportamiento, esto concuerda con lo reportado por Juárez- Moreno, (2017), donde evaluaron el efecto de nanopartículas en *Litopenaeus vannamei* durante 96 horas de exposición, la supervivencia del camarón fue más del 90% para todos los tratamientos. La tasa

de consumo de oxígeno y el recuento total de hemocitos permanecieron inalterados, lo mismo sucedió en este estudio ya que al efectuar la disección los órganos internos se encontraban intactos y en condiciones normales y tampoco se observó cambio en su comportamiento. En otros estudios como el de Scown *et al.* en 2010, evaluaron el efecto de la exposición de nanopartículas en la trucha arcoíris con concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs con un periodo de tratamiento de 10 días donde tampoco se observaron efectos adversos ni daño tóxico. Destacando que los periodos de exposición pueden variar al igual que las dosis administradas. También depende la especie con la que se esté trabajando por lo que se tiene que considerar evaluar constantemente la toxicidad de las AgNPs.

Los resultados de la prueba de inhibición *in vivo*, demostraron una respuesta positiva al utilizar las nanopartículas de plata para el control de *Vibrio fluvialis*, obteniendo porcentajes de supervivencia de 89 y 93% con las concentraciones de 90 y 180 ppm respectivamente, estos resultados superan lo reportado por Sivaramasamy, *et al* (2016), al utilizar nanopartículas de plata en el camarón, obteniendo porcentajes de supervivencia de 40.6% en el tratamiento de 0.1 mg de AgNPs, en un periodo de 60 días donde utilizaron una concentración 106 UFC mL^{-1} de *V. parahaemolyticus*. Del mismo modo Vaseeharan, *et al*, (2010) obtuvo 71% de supervivencia en el tratamiento de 10 μg de AgNPs, donde utilizaron una concentración de 104 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mL^{-1} de *V. harveyi* en un periodo de 14 días. Cabe resaltar que en nuestra investigación sólo usamos una dosis única de AgNPs, obteniendo resultados positivos a los 4 días del tratamiento, donde se observó que los peces ya no mostraron ningún tipo de lesión o signo de la enfermedad. Por lo que las AgNPs son una alternativa al uso de antibióticos ya que se sabe que el caso de los antibióticos usados en la acuicultura, cuando las dosis del fármaco es alta y el tratamiento es muy largo, existe un peligro de toxicidad en el pez, frecuentemente causando daño en hígado, riñón y en algún otro órgano, esto puede generar un daño reversible. Por otro lado si la dosis del fármaco es muy baja y el periodo de tratamiento fue muy corto, la bacteria no será eliminada e incrementa el riesgo de que desarrolle resistencia ante el antibiótico (Yanong, 2013). Es por ello que las dosis de AgNPs y el periodo de exposición se deberán continuar estudiando en otras especies de peces de ornato.

Conclusions

Se sintetizaron y caracterizaron AgNPs dos concentraciones de 90 y 180 ppm con tamaño de nanopartícula de 4-15 nm y 13-20 nm con una forma esférica y cúbica, respectivamente con formación de conglomerados obtenido en el SEM, la identificación de elementos presentes en las AgNPs a través del espectro IR y un pico de plasmon de 423 y 427 nm obtenido en el espectro UV-Visible. En las pruebas *in vitro* se determinó

que las dos concentraciones de AgNPs muestran efecto antimicrobiano contra *V. fluvialis*. En las pruebas *in vivo* la aplicación de las AgNPs en *P. scalare* sanos, son seguras y no presentan ningún efecto toxicológico. Las AgNPs mostraron un efecto antimicrobiano al contacto con peces enfermos por *V. fluvialis*, disminuyendo sus signos y lesiones de la enfermedad obteniendo altos porcentajes de supervivencia. La utilización de las AgNPs para controlar infecciones provocadas por *V. fluvialis* en cultivos de *P. scalare*, puede ser una nueva alternativa como agente antimicrobiano para la salud y producción de esta especie.

6. **References**

Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001-1006.

Carpenter, J.W., Mashima, T.Y., Rupiper, D.J. (1996). Exotic animal formulary. First ed. Greystone Publications, Manhattan, KS. 310 p.

CONAPESCA (2017), Peces ornamentales, un negocio con amplias perspectivas de desarrollo en México. Consultado el 12, Agosto, 2018 de <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/peces-ornamentales-un-negocio-con-amplias-perspectivas-de-desarrollo-en-mexico-conapesca>

Carnevia, D., Letamendía, M., Perretta, A., E. Delgado (2010). Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay. *Veterinaria* 46: 27-32.

CONAPESCA (2018), Peces de ornato, más que belleza acuícola, Consultado el 12, Agosto, 2018, de <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/peces-ornamentales-un-negocio-con-amplias-perspectivas-de-desarrollo-en-mexico-conapesca>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Ed. CLSI, Wayne, PA, USA. M07-A9, Vol. 32, No. 2, 12-18.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility; Approved Standard, Eleventh Ed. CLSI, Wayne, PA, USA. M02-A11, Vol. 32, No. 1, 10-14.

Dananjaya, S. H. S., Godahewa, G. I., Jayasooriya, R. G. P. T., Chulhong, O. H., Jehee, L., Mahanama, D. Z. (2014). Chitosan silver nano composites (CAgNCs) as potential antibacterial agent to control *Vibrio tapetis*. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 5(5), 209. doi: 10.4172/2157-7579.1000209

Dananjaya, S. H. S., Godahewa, G. I., Jayasooriya, R. G. P. T., Lee, J., De Zoysa, M. (2016). Antimicrobial effects of chitosan silver nano composites (CAgNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio (Vibrio) salmonicida*. *Aquaculture*, 450, 422-430. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.023

Díaz del Castillo Rodríguez, F. (2012). Introducción a los Nanomateriales. *Lecturas de Ingeniería, UNAM, México*.55-59

FAO (2014) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. *Roma*. 253p.

Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856-8874. doi: [10.3390/molecules20058856](https://doi.org/10.3390/molecules20058856)

Fuentes, J., J. Pérez. (1998). Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista Veterinaria México* 29(1): 117- 119.

Handy, R. D., Al-Bairuty, G., Al-Jubory, A., Ramsden, C. S., Boyle, D., Shaw, B. J., & Henry, T. B. (2011). Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *Journal of Fish Biology*, 79(4), 821-853. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03080.x>

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499-511. doi: [10.1016/j.tibtech.2012.06.004](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004)

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657-3666. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.01.065](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065)

Huang, D., Zhou, H., Gao, J. (2015). Nanoparticles modulate autophagic effect in a dispersity-dependent manner. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 5, 14361 | [Doi: 10.1038/srep14361](https://doi.org/10.1038/srep14361)

- Juarez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C. H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A. D., Vazquez-Felix, E. F., Sanchez-Castrejon, E. Mota-Morales J. D., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. (2017). Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 169, 716-724. doi:[10.1016/j.chemosphere.2016.11.054](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.054)
- Knetsch, M. L., Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366. doi:[10.3390/polym3010340](https://doi.org/10.3390/polym3010340)
- Lee, K. K., Liu, P. C., & Chuang, W. H. (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology*, 4(3), 267-277. Doi. 10.1007/s10126-0002-0018-9
- Lee, P. C., Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391-3395. doi: 10.1021/j100214a025
- Lin, D., Wu, J., Ju, H., Yan, F. (2014). Nanogold/mesoporous carbon foam-mediated silver enhancement for graphene-enhanced electrochemical immunosensing of carcinoembryonic antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 153-158. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.051>
- Natsuki, J., Natsuki, T., & Hashimoto, Y. (2015). A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. *International Journal of Materials Science and Application*, 4(5), 325-332. doi: 10.11648/j.ijmsa.20150405.17
- Pacioni, N. L., Borsarelli, C. D., Rey, V., Veglia, A. V. (2015). Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles. In *Silver Nanoparticle Applications* (pp. 13-46). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-11262-6_2
- Pillai, Z. S., Kamat, P. V. (2004). What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3), 945-951. doi: 10.1021/jp037018
- Redondo, P. N., Jarero, J. R., Figueroa, J. L. A. (2004). Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Veterinaria México*, 35(1), 21-30.

- Sapsford, K. E., Tyner, K. M., Dair, B. J., Deschamps, J. R., Medintz, I. L. (2011). Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical chemistry*, 83(12), 4453-4488. doi: 10.1021/ac200853a
- Scown, T. M., Santos, E. M., Johnston, B. D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., et al, (2010). Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, 115(2), 521-534. doi: [10.1093/toxsci/kfq076](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq076)
- Šileikaitė, A., Puišo, J., Prosyčėvas, I., Tamulevičius, S. (2009). Investigation of silver nanoparticles formation kinetics during reduction of silver nitrate with sodium citrate. *Materials Science (Medžiagotyra)*, 15(1), 21-27.
- Sivaramasamy, E., Zhiwei, W., Li, F., Xiang, J. (2016). Enhancement of Vibriosis Resistance in *Litopenaeus vannamei* by Supplementation of Biomastered Silver Nanoparticles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 7(352), 2. doi 10.4172/2157-7439.1000352
- Smitha, S. L., Nissamudeen, K. M., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2008). Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(1), 186-190. doi: [10.1016/j.saa.2007.12.002](https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.12.002)
- Stoskopf, M.K. 1988. "Fish chemotherapeutics". In *Veterinary clinics of North America, Small Animal Practice: Tropical Fish Medicine*. March. M. Stoskopf (ed). W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. pp. 331-348.
- Vásquez, M., Rondón, I., Restrepo, L. y P. Eslava. (2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. *Orinoquia* 14(1): 33-44.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671. doi: 10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000
- Wang, L., Liu, C. C., Wang, Y. Y., Xu, H., Su, H., Cheng, X. (2016). Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesized using *Cordyceps militaris* extract. *Current Applied Physics*, 16(9), 969-973. doi:[10.1016/j.cap.2016.05.025](https://doi.org/10.1016/j.cap.2016.05.025)

Yanong, R. P. (2003). *Use of antibiotics in ornamental fish aquaculture*. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS

7. Tables and Figure legends:

Tabla 1. Lesiones y signos para caracterizar el cuadro clínico de los peces

Signos	Lesión
<ul style="list-style-type: none">• Nado errático,• Abdomen distendido• Anorexia	<ul style="list-style-type: none">• Hemorragias en las aletas• Hemorragias en los ojos• Aletas deshilachadas• Furúnculos• Lesiones en escamas

Vásquez *et al.*, 2010; Fuentes y Pérez, 1998; Carnevia *et al.*, 2010.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de AgNPs sobre *V. fluvalis*, Difusión en disco

Tratamiento	Halo de inhibición
AgNPs 90 ppm	8.66±0.57 mm
AgNPs 180 ppm	14.3±1.15 mm
Sol. AgNO ₃ 90 ppm	0 mm
Sol. AgNO ₃ 180 ppm	0 mm

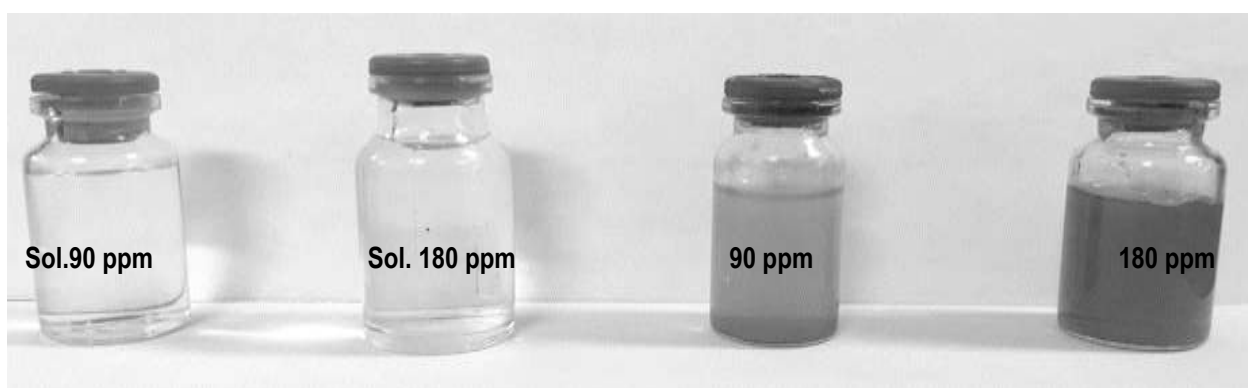


Figura 1. Imagen de soluciones de AgNPs en diferentes concentraciones.

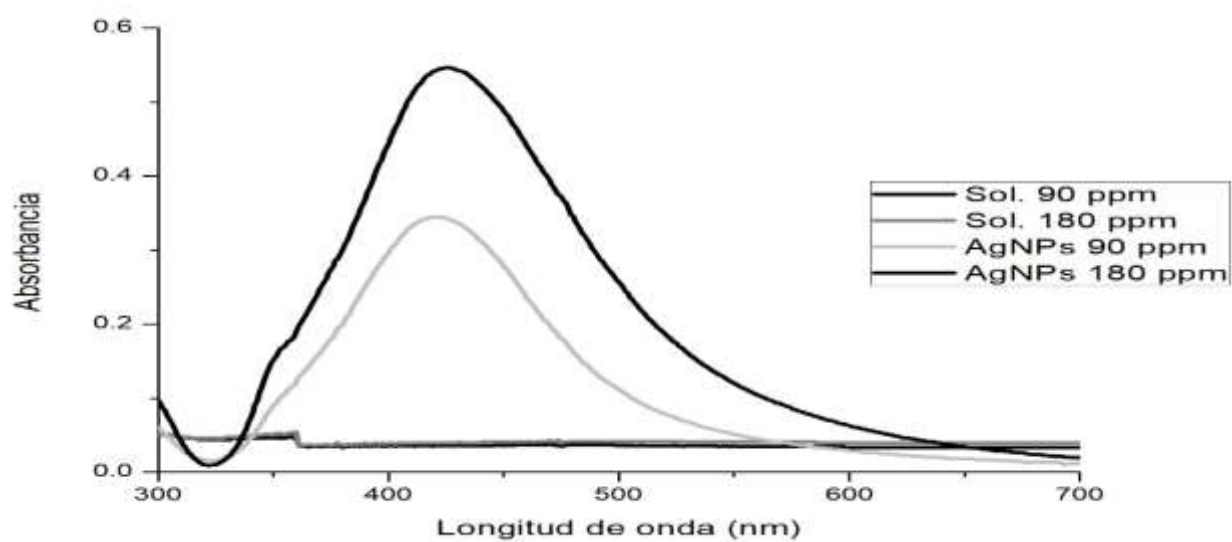


Fig. 2. Espectro UV-Visible de las Soluciones de Ag a 90 y 180 ppm y las AgNPs a 90 y 180 ppm

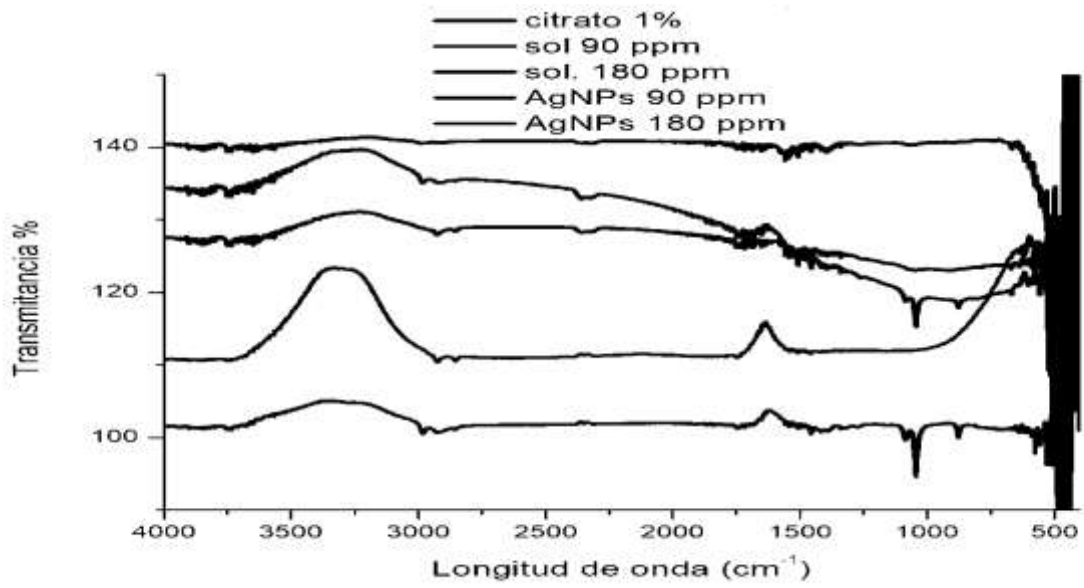


Fig.3 Espectro IR de las soluciones de referencia, solución de citrato de sodio y AgNPs de 90 y 180 ppm.

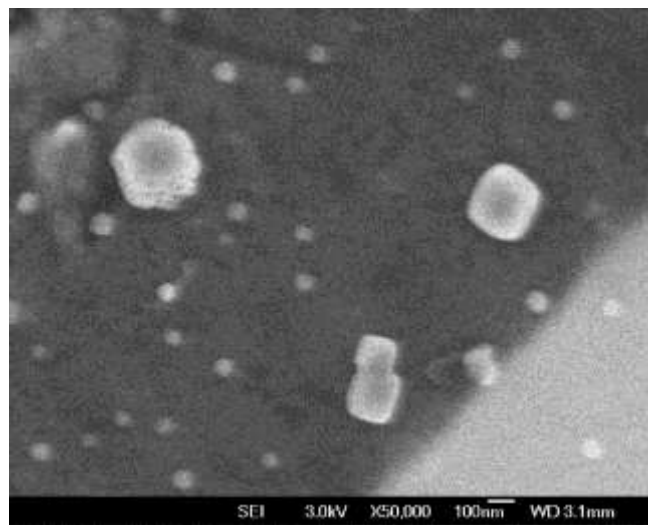


Fig. 4 Imagen de SEM de las AgNPs a 90 ppm

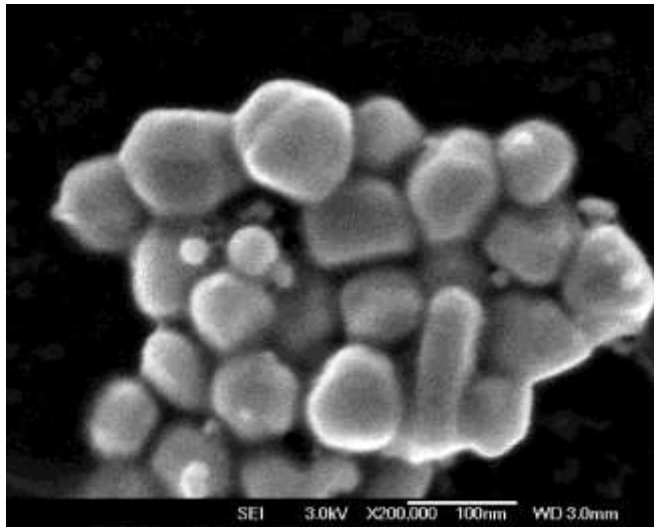


Fig. 5 Imagen de SEM de las AgNPs a 180 ppm

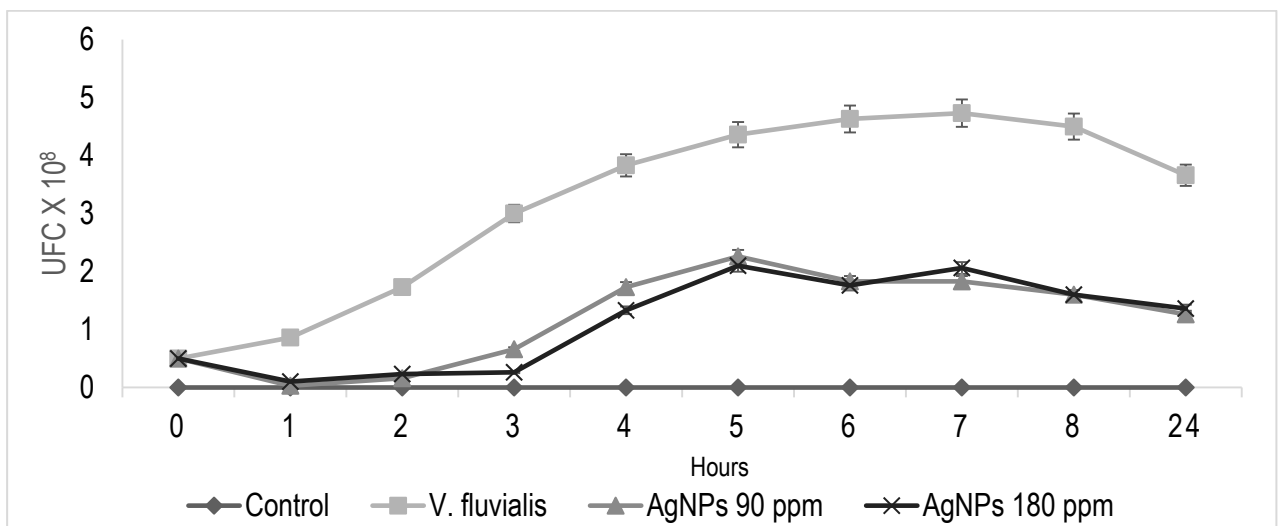


Fig. 6 Cinética de crecimiento de *V. fluvialis* en contacto con AgNPs. The bars indicate the mean \pm S.D. (n=3)

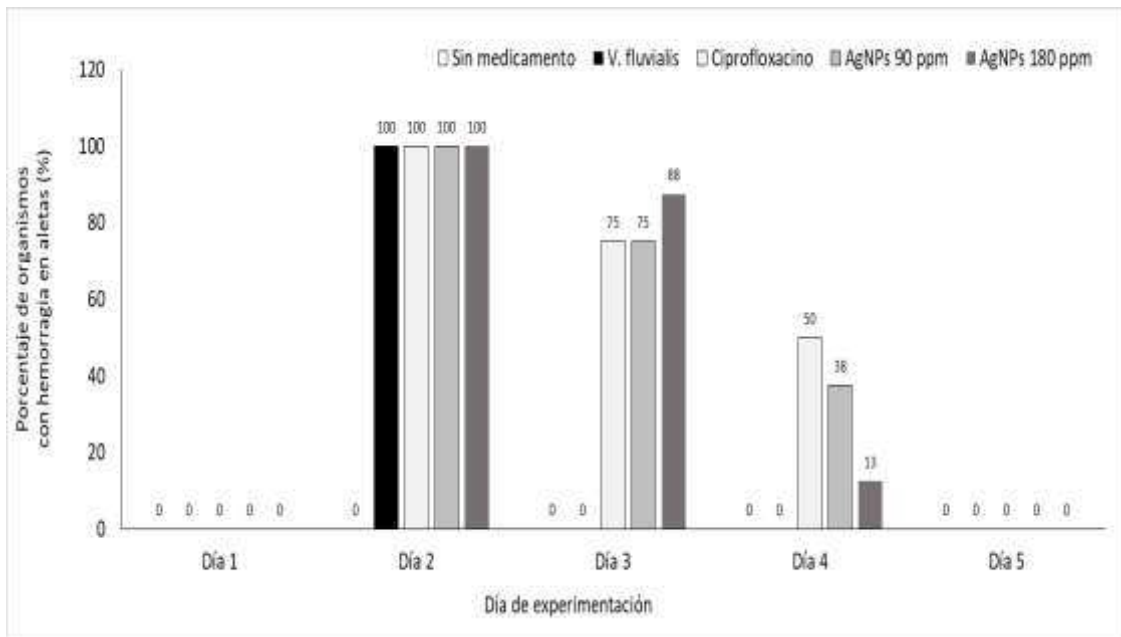


Fig. 7 Porcentaje de organismos con hemorragias en aletas

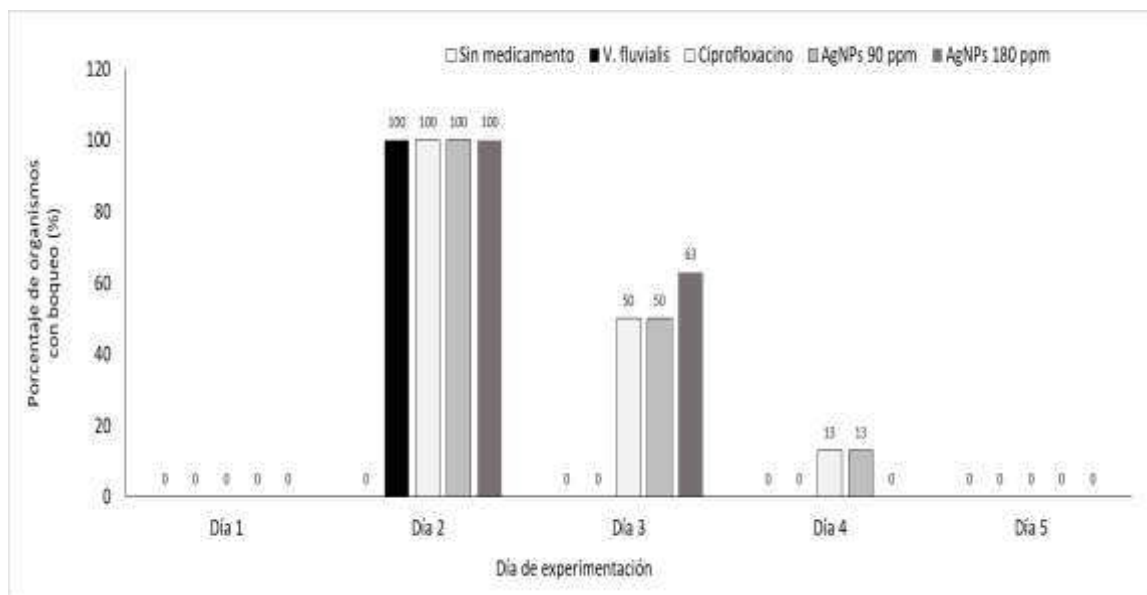


Fig. 8 Porcentaje de organismos con boqueo

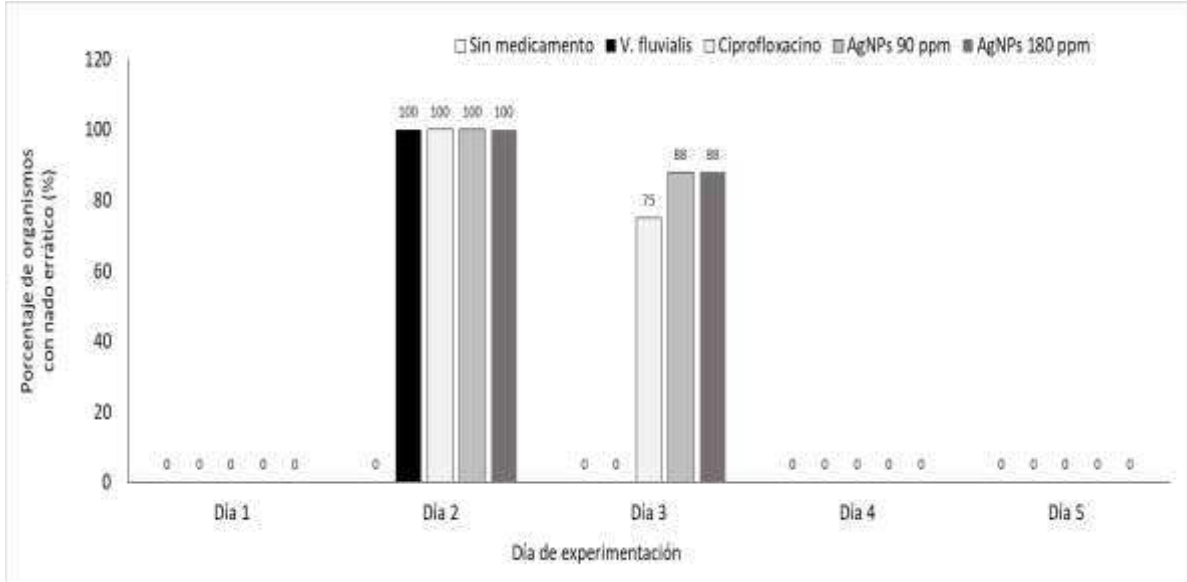


Fig. 9 Porcentaje de organismos con nado errático

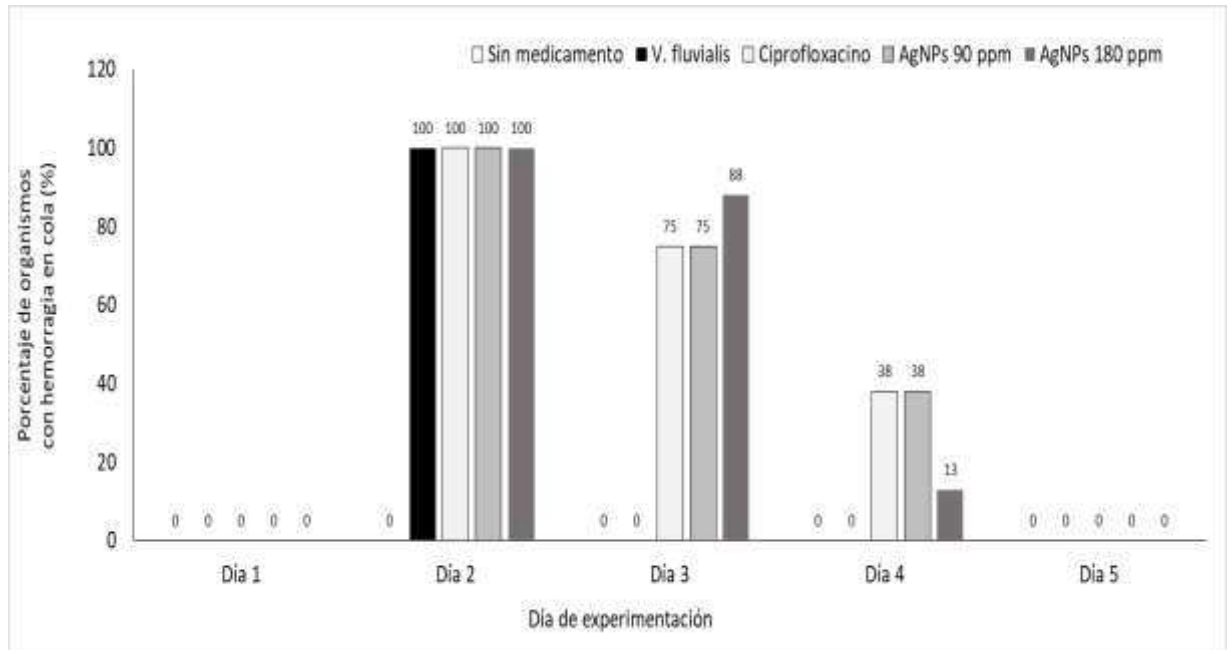


Fig. 10 Porcentaje de organismos con hemorragia en cola

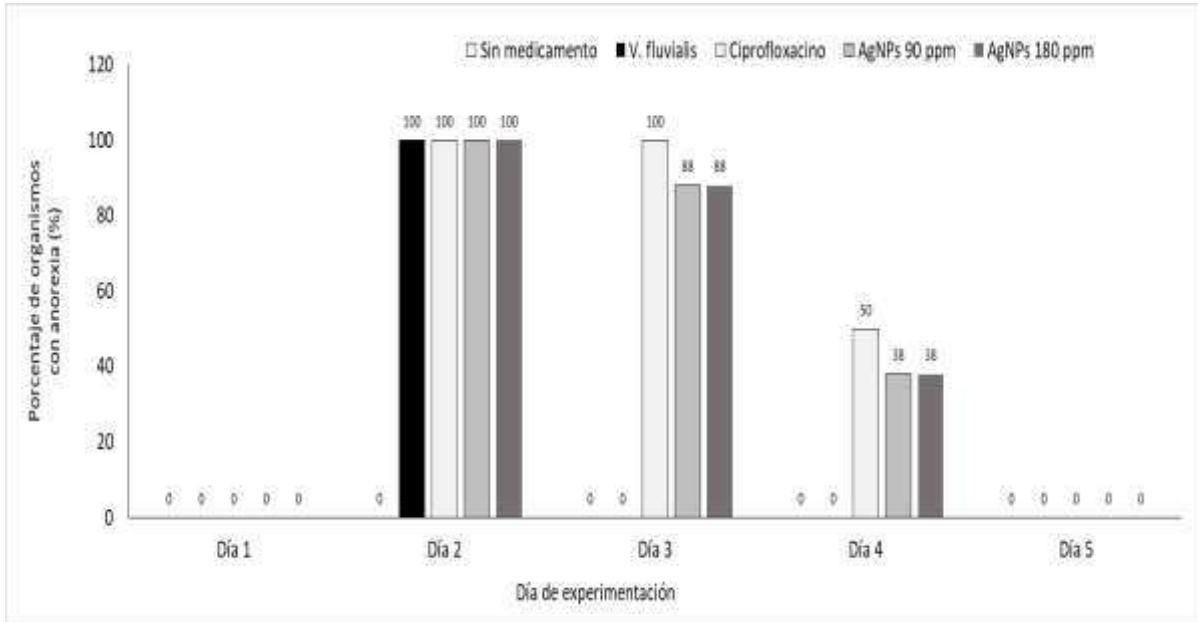


Fig. 11 Porcentaje de organismos con anorexia

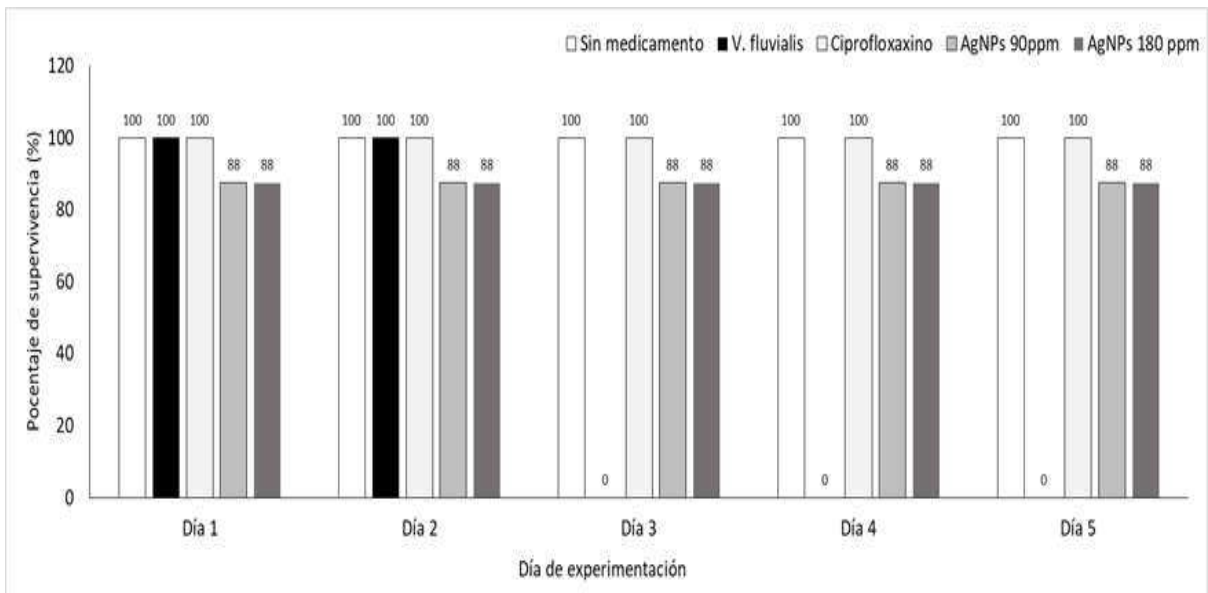


Fig. 12 Porcentaje de supervivencia de *P. scalare* ante el tratamiento con las AgNPs

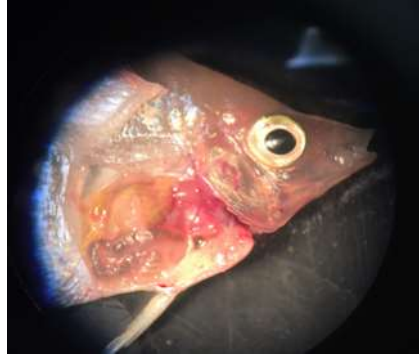




Fig. 13 Imagen de la disección de *P. scalare* con AgNPs a las 96 h



Fig. 14 Imagen de la disección de *P. scalare* infectado de *V. fluvialis*

 XIV encuentro
Participación de la
Mujer
en la
Ciencia

17-19 MAYO 2017 León, Guanajuato


 **CFO**
CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN OPTICA, A.C.


Orga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:


**Meneses Márquez Julio , Monroy Dosta Carmen, González García Samuel,
Bustos-Martínez Jaime y Hamdan-Partida Aida**

**Utilización de nanopartículas de plata como agente antibacteriano sobre Vibrio
fluvialis**

Por el trabajo:


Dra. Ma. Eugenia Sánchez
Representante del Comité Organizador


Dr. Elder de la Rosa Cruz
Director General del CFO


Matilde Montoya

ISSN 2448-5063



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa Universitario de Estrategias para la Sustentabilidad

otorga la presente

CONSTANCIA

a: **Julio César Meneses Márquez**

por haber asistido al curso

**Estudios de riesgo ecológico enfocados a nuevas tecnologías:
fracking, nanotecnologías y contaminantes emergentes**

que se impartió del 16 al 19 de mayo de 2017
con una duración de 16 horas
Ciudad Universitaria, Ciudad de México

M. en C. Mireya Imaz Gispert

Directora

Programa Universitario de
Estrategias para la Sustentabilidad



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Área de Investigación Estrategias Biológicas para el Aprovechamiento de los
Recursos Naturales Acuáticos de la
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y
Cuerpo Académico "Manejo Biotecnológico de Recursos Acuáticos" de la
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAEM


Otorgan la presente constancia a:

Julio Cesar Meneses Márquez

Por su participación como ponente

En el "2° Foro de Acuicultura Ornamental en México, Retos y Perspectivas"
efectuado el 15 y 16 de junio de 2017, en la ciudad de Cuernavaca Morelos


Dra. Maria del Carmen
Monroy Dosta
Presidenta del Comité
Organizador UAM-X


Dr. Jorge Castro Mejia
Jefe del Área de
Investigación: Estrategias
Biológicas para el
Aprovechamiento de los
Recursos Acuáticos

INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2017 ON AGROBIO NANOTECHNOLOGY

Se Otorga el Presente

Reconocimiento

A: *Julio César Meneses Márquez, Aida Hamdán Partida, María del Carmen Monroy Dosta, Jorge Castro Mejía y Abraham Faustino Vega,*

Por su participación con la ponencia oral titulada:

“Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata sobre vibrio fluvialis”

H. L. Salazar
Dr. Ricardo Hugo Liza Salazar
Organizadores General Symposium

Dr. Elvira Santiago Rodríguez Ferrández
Directora General del CIOA

Dr. Jesús Valentín García
Rector de la UAGUA



Saltillo, Coah., México, 27 de Octubre, 2017



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Secretaría de Educación Continua

Otorgan la presente

Constancia

a

Julio César Meneses Márquez

Quien participó como Ponente en las:

5^{as} Jornadas de Organismos Acuáticos

Con el Tema:

Aplicación de las nanopartículas de plata en acuicultura

Impartido en esta Institución

Del 2 al 4 de abril de 2018

Con una duración de 30 minutos



GEN/014/18

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, cd. Mx., a 4 de abril de 2018

Dr. Francisco Suárez Gilmer
Director de la FMVZ

MVZ Marifin Beatriz Trejo Salas
Secretaría de Educación Continua



Certificate of Appreciation

Awarded to

Prof. / Dr. / Mr. / Ms. **Julio Cesar Meneses**, Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Mexico
for presenting poster on **Silver Nanoparticles as Antibacterial Against Fish Bacterial Diseases**

at

Nano World Conference (NWC-2018)

April 23-25, 2018, San Francisco, CA

Claudio Ando Nicolini
President & Chairman
NanoWorld Conference-2018





23-25 MAYO 2018 León, Guanajuato



*Orga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:*

**Julio Meneses Marquez, Aida Hamdan Partida, Maria del Carmen Monroy Dosta,
Jorge Castro, Jaime Bustos Martinez**

Por el trabajo:

EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN LA ACUICULTURA



Dra. Gloria Verónica Vázquez García
Representante del Comité Organizador



Dr. Elder de la Rosa Cruz
Director General del CIO

